
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



PURIFICACION DE ANTIGENOS FIMBRIALES DE
Escherichia coli ENTEROTOXIGENICA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

SERGIO NAVARRO FIERROS

GUADALAJARA, JALISCO.

1993



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección

Expediente

Número

SR. SERGIO NAVARRO FIERROS
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis PURIFICACION DE ANTIGENOS FIMBRIALES DE Escherichia coli ENTEROTOXIGENICA", para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como su Director de dicha Tesis el M. en C. Luis Gustavo Villa Manzanares.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA "
"AÑO LIC. JOSE GUADALUPE ZUNO HERNANDEZ"
Guadalajara, Jal., a 3 de Julio de 1991
EL DIRECTOR



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE

EL SECRETARIO

M. EN C. MARTIN PEDRO TENA MEZA

c.c.p. El Director de Tesis. M. en C. Luis G. Villa M. Pret.-
c.c.p. El expediente del Alumno. -

' gpg


Al contestar este oficio cítese fecha y número

M.en.C Juan L.Cifuentes Lemus
Director de la Facultad de ciencias Biológicas
Universidad de Guadalajara

Por medio de este conducto, manifiesto a usted que una vez revisada la tesis "PURIFICACION DE ANTIGENOS FIMBRIALES DE Escherichia coli ENTEROTOXIGENICA". Presentada por el SR. Sergio Navarro Fierros pasante de la Licenciatura en Biología y habiendo realizado las observaciones pertinentes, considerando que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad de Ciencias Biológicas a su digno cargo para que continúe con los trámites respectivos para la obtención de su grado de licenciatura.

Sin otro particular y agradeciendo las atenciones prestadas a la presente, quedo de usted:

ATENTAMENTE



M.en.C. Luis G. Villa Manzanares.

Director de tesis

Guadalajara Jal. 20 de octubre 1992

T I T U L O

Purificación de antígenos fimbriales de ESCHERICHIA COLI enterotoxigénica.

O B J E T I V O G E N E R A L

Purificar los antígenos fimbriales(K88,K99,987P)de ES-
CHERICHIA COLI enterotoxigénica(ECET).

O B J E T I V O S P A R T I C U L A R E S

- 1-Obtener antisueros monoespecíficos para los antígenos fimbriales(K88,K99,987P).
- 2-Purificar los antígenos fimbriales(K88,K99,987P) de ES-
CHERICHIA COLI.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
HIPOTESIS	5
JUSTIFICACION	6
MATERIAL Y METODOS	7
RESULTADOS	10
TABLAS	12
FOTOGRAFIAS K99	13
FOTOGRAFIAS K88	14
FOTOGRAFIAS 987P	15
DISCUSION	16
CONCLUSIONES	17
BIBLIOGRAFIA	18

INTRODUCCION

ANTECEDENTES

Dentro de las actividades pecuarias la porcicultura tiene un relevante papel en la economía de nuestro país. Los factores que han limitado fuertemente el aumento de productividad son los relativos a los problemas de salud destacando aquellos que afectan a los lechones neonatos(2). En nuestro país entre el 20-30% de los cerditos que nacen mueren antes del destete(1,2).

Las enfermedades diarreicas son una de las causas más importantes de pérdidas económicas en el ganado porcino. En los lechones estos problemas se presentan principalmente durante la lactancia y después del destete. Las causas que provocan diarrea en lechones son numerosas pudiendo ser algunas de carácter infeccioso(3). Entre los agentes etiologicos más frecuentes que provocan diarrea se encuentran diversos virus (ROTAVIRUS, CORONAVIRUS) y bacterias (ESCHERICHIA COLI, CLOSTRIDIUM PERFRINGENS, CAMPYLOBACTER COLI). Algunos parásitos también están relacionados con procesos diarreicos en lechones(3).

En los cerdos, como en muchas otras especies es extremadamente peligroso la presencia de enfermedades inmediatamente después del nacimiento, en contraste con la situación de los humanos. Los lechones al nacimiento están completamente vacíos de inmunoglobulinas maternas porque no trasfiere la placenta macromoléculas(4). El calostro constituye la única fuente de anticuerpos maternos para el cerdito recién nacido (5,6). El calostro de la cerda contiene 15grs. de proteína por 100ml. El 60-70% de las proteínas son inmunoglobulinas (6). Estas inmunoglobulinas del calostro pasan intactas a la circulación a través del intestino el cual permanece permeable durante las primeras 36 hrs después del nacimiento que es cuando sucede el cierre intestinal, por lo tanto el cerdito recién nacido depende de su madre para sobrevivir a los múltiples retos infectocontagiosos que se ve expuesto(7,8).

ESCHERICHIA COLI se ha reconocido como un microorganismo potencialmente enteropatógeno en animales y humanos desde la década de 1930 al asociar ciertos serotipos con la diarrea intestinal (9). Aunque ESCHERICHIA COLI es parte de la microbiota normal del intestino de mamíferos ciertas cepas que causan diarrea han sido agrupadas dentro de tres diferentes clases de acuerdo a sus mecanismos patogénicos.

1) ESCHERICHIA COLI enterotoxigénica (ECET)

A) enterotoxina termolábil LT, parecida a cólera (actúa por estimulación de adenilatociclasa)

B) enterotoxina termoestable STA (actúa por estimulación de guanilatociclasa)

C) enterotoxina termoestable STB (nucleótido no cíclico relacionado a secreción de anión)

2) ESCHERICHIA COLI enteroinvasiva (ECEI)

D) ESCHERICHIA COLI invasiva

3) ESCHERICHIA COLI enteropatógena (ECEP)

E) ECEP (clase 1)

F) ECEP citotoxigénica parecida a la toxina de shiga (asociada con colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico).

ESCHERICHIA COLI es una bacteria perteneciente a la familia de las enterobacterias, su clasificación se fundamenta en ciertas características bioquímicas y serológicas. Son bacilos Gram negativos, móviles aerobios y anaerobios facultativos, catalasa positivos, oxidasa negativos atacan a los azúcares fermentativamente se produce gas normalmente, citrato negativo, kcn negativo (11). Además de la demostración serológica de algunos de sus componentes antigenicos, la tipificación completa de ESCHERICHIA COLI incluye la determinación de los antígenos :o somático,h flagelar y capsular (12,13).

La colonización de la mucosa epitelial del intestino está mediada por adhesinas específicas y es mediante éstas que las células bacterianas pueden resistir la acción del peristaltismo y la secreción de fluidos en el lumen intestinal (10). Los antígenos de superficie del glucocálix también llamadas adhesinas son las responsables de la unión entre las células de la mucosa intestinal y la bacteria(14). Algunos de los antígenos de superficie que confieren propiedades adhesivas a las cepas de ESCHERICHIA COLI (ECET), son de naturaleza protéica y están codificados por un plásmido(14). Se identifican como apéndices filamentosos cortos, rectos y menos rígidos que los flagelos teniendo un rango de 3 a 25nm. De diámetro y de 200 a 1000nm de longitud, a diferencia de los flagelos que son apéndices filamentosos de aproximadamente de 100nm. De diámetro y son los órganos de locomoción para las bacterias que los poseen(14). La existencia de este tipo de antígenos superficiales en diferentes bacterias ha sido reportado por Anderson y Hovwink en 1949; y Van Iterson en 1950, Briton y col 1954 introdujeron el término pili a estos apéndices; en 1959 Duguid y Wright sugirieron el nombre a estos apéndices como fimbrias(20).

El primer antígeno de superficie fué por primera vez descrito en 1961 procedentes de un número de cepas de ESCHERICHIA COLI, aisladas en suinos con la enfermedad de edema y enteritis(15). En esta época se reconocía que la diarrea neonatal porcina estaba caracterizada por la colonización de ciertos serotipos de ESCHERICHIA COLI en el intestino delgado y que poseían un antígeno de superficie al que denominaron K88.

Posteriormente Nagy y Col. Representaron la colonización del intestino delgado del cerdo por cepas de ESCHERICHIA COLI que carecían del antígeno K88, pero que poseían una adhesina distinta a la que llamaron 987P(18). Poco después Schneider y Sam reportaron cepas de ESCHERICHIA COLI enterotoxigénicas que expresaban ambos antígenos 987P y K88(16).

En 1972, Smith y Lingood reportaron un trabajo hecho por Sojka que cepas de ternero y carnero poseían diferentes antígenos o, pero que tenían estrecha relación con el antígeno K que denominaron antígeno común K "kco"; posteriormente Drs Kou y col. Lo llamaron antígeno de superficie K99. Moon y col. Reportaron el aislamiento del antígeno K99 en cepas de ESCHERICHIA COLI enterotoxigénicas aisladas en cerdos(17).

La colonización y adhesión del intestino delgado es un requisito necesario de ESCHERICHIA COLI enterotoxigénica para causar enfermedad. Este proceso es mediado por fimbrias (adhesinas) que forman un puente entre bacterias y enterocitos. La expresión de la fimbria (k99, k88, 987p) ocasiona virulencia(19). Las fimbrias aparecen bajo el microscopio electrónico como filamentos radiando alrededor de la bacteria -

estos filamentos varían en longitud y peso molecular(4).987P está compuesta por una subunidad proteica con un peso molecular de 17.184 daltons(26).K88 es una proteína polimérica compuesta por dos subunidades aproximadas de 23,000 daltons(4).K99 está compuesta por dos subunidades, la mayor con un peso molecular de 29,500 daltons y la menor con un peso molecular de 22,500 daltons (25).

La inmunidad contra la colibacilosis de lechones proviene del calostro de la madre(5,6,21);Es por este motivo que se inmuniza a las cerdas gestantes con bacterinas preparadas con diferentes cepas de ESCHERICHIA COLI, que contienen generalmente algunos de los factores de adherencia(fimbrias) como son (K88,K99,987P)(21).

Las bacterias que más se han utilizado son las preparadas con la bacteria inactivada y mezcladas con un adyuvante, generalmente de hidróxido de aluminio y recientemente con adyuvantes oleosos y sintéticos(21).Estas bacterinas se inyectan por vía intramuscular a las cerdas gestantes ,entre los 79 y 86 días de gestación y una segunda aplicación entre los 93 y 100 días.Los resultados que se han obtenido en la reducción del número de lechones diarreicos o en la mortalidad ,son variables (21).

Baljer (1983)inmunizo a cerdas con ESCHERICHIA COLI 08:K88 inactivadas con calor,obteniendo poca efectividad (22).

En un estudio hecho con 270 cerdas,Boyadzhizu(1983) redujo la mortalidad de lechones de 8.5% en el grupo control a 1.8% en el grupo inmunizado(21).

En otro experimento Awad(1984) logro disminuir la mortalidad de los lechones del 8% en el grupo control a 5.5% en el grupo inmunizado(23).

Por otra parte,Baars(1984)en Europa experimento con un compuesto formado por LT(toxoide) y los antígenos K88ab,K88ac,K99,987P obtenidos a base de ingeniería genética y emulsificados con aceite mineral como adyuvante reduciendo en 18% la mortalidad de los lechones(24).

En México Izeta(1988) utilizó una bacterina autóloga preparada a partir de ESCHERICHIA COLI aislada del estomago de lechones enfermos de la granja,obteniendo una reducción en el porcentaje de cerdos diarreicos durante la lactancia en un promedio de 18.5%(21).Todos estos experimentos que se han mencionado anteriormente tienden a lograr una disminución de la mortalidad de los lechones de una u otra forma el logro obtenido es mérito. De esta manera lo poco que se ha hecho en nuestro país recientemente al administrar la bacteria completa a los lechones tiene sus carencias de efectividad es decir por una parte la bacteria administrada pudiera carecer de uno u otro antígeno fimbrial,estó reduce la posibilidad de eficacia,por otra parte el administrar la bacteria completa podria desencadenar en el lechón reacciones adversas con posibilidad a ser consideradas tóxicas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La colibacilosis es una enfermedad infecciosa con una morbi-mortalidad muy alta en nuestro medio que afecta principalmente a los lechones recién nacidos, ocasionando pérdidas económicas considerables. Para combatirla se han utilizado bacterinas para inmunizar cerdas gestantes inactivando a la bacteria completa por medios físico-químicos, resulta tóxico, por lo que utilizar solo los antígenos fimbriales purificados es más efectivo.

H I P O T E S I S

Los principales factores de adherencia en *ESCHERICHIA COLI* causantes de diarrea en porcinos son los antígenos fimbriales (K88, K99, 987P). Existen en nuestro medio, fármacos conteniendo los antígenos fimbriales obtenidos por ingeniería genética, pero consideramos que es posible purificar los antígenos fimbriales con un equipo menos sofisticado y de una manera más sencilla y más económica.

J U S T I F I C A C I O N

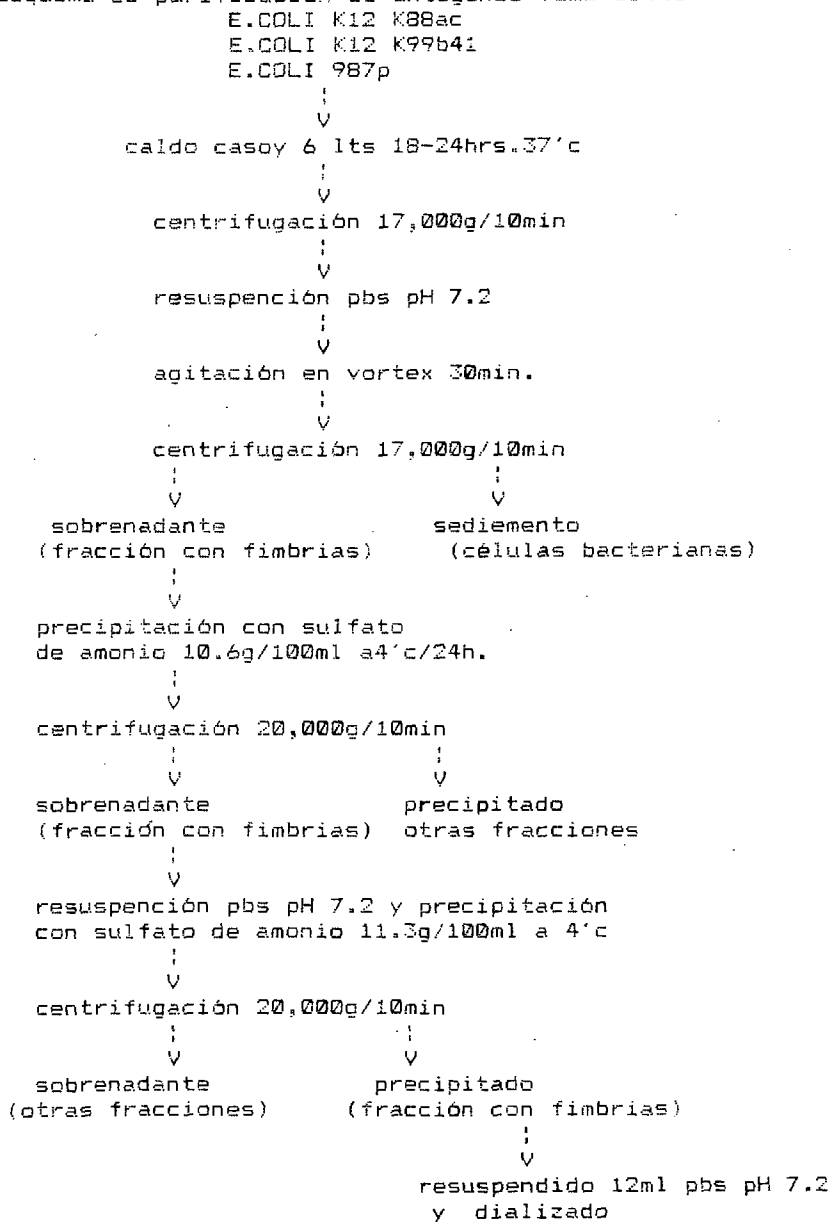
Por el alto indice de mortalidad de los lechones neonatos desde el nacimiento hasta el destete en nuestro pais por causa de la colibacilosis, se efectuara la presente investigación con el propósito de dar una alternativa a todas aquellas personas que se dediquen a esta actividad pecuaria tan importante en nuestro país.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

Las cepas de *ESCHERICHIA COLI* de referencia K88, K99, 987P y K12C se obtuvieron de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N.

La purificación de los antígenos fimbriales se realizó por el método de Isaacsón :

Esquema de purificación de antígenos fimbriales



Se sembraron las cepas de ESCHERICHIA COLI de referencia en caldo casoy y se incubó a 37 grados centígrados por 24 horas, se centrifugó a 17,000g durante 10 minutos y se resuspendió el sedimento en buffer de fosfatos, pH 7.2(PBS) . Después se homogenizó con el vortex por un periodo no mayor de 30 minutos, luego se centrifugó a 17,000g durante 10 minutos. Se utilizó solamente el sobrenadante y se precipitó con sulfato de amonio(10.6g\100ml) lentamente, volúmen a volúmen a 4 grados centígrados con constante agitación después se mantuvo en refrigeración por 24 horas. Se centrifugó 10,000 g por 10 minutos utilizando solo el sobrenadante. Esté se precipito con Sulfato de Amonio (11.3g\100 ml) de la forma descrita con anterioridad, después se centrifugó a 20,000g por 20 minutos, se obtuvo el sedimento y se resuspendió con PBS, después se congeló por un periodo de 24 horas y luego se dializó por 24 horas(25).

La proteína obtenida se cuantifico por el método de Lowry utilizando suero de albumina como control(28).

Para la detección de antígenos fimbriales se utilizó la técnica de doble difución de Duchterlony.

Prueba de aglutinación con antisueros

Para la producción de antisueros se utilizaron cepas de ESCHERICHIA COLI de referencia K88,K99,987P. Los antisueros se obtuvieron mediante el método de Evans y Col , se inmunizaron conejos con las cepas de ESCHERICHIA COLI de referencia, se inocularon en caldo Casoy e incubaron a 37 grados centígrados se cosecharon a las 24 horas en solución reguladora de Fosfatos (PBS). Se inactivaron con formol al 0.05% y se ajustaron a aproximadamente 10'000,000 bacterias \ ml y se continuó con el siguiente calendario de inmunización con aplicación endovenosa(27):

Dosis	día
0.5	1
0.5	3
1.0	6
1.0	12
1.0	15

Posteriormente se procedió a obtener un volúmen mínimo de sangre para verificar el título del antisuero por medio de aglutinación en tubo(28).

En caso de que resultaran bajos los títulos de anticuerpos se procedio aplicar 2 dosis de 1.0 ml después de la última aplicación. Después de una semana se sangró para obtener el suero.

El suero se absorbió con un paquete bacteriano de la cepa K12C ESCHERICHIA COLI de referencia que se inoculó en caldo casoy para incubarse a 37 grados centígrados por 18 horas, se cosechó e inactivó el paquete con formol al 0.05% dicho paquete se mezcló a razón de 1 volúmen por 5 volúmenes de suero e incubándose a 37 grados por 2 horas posteriormente de 12 a 18 horas permanecio en refrigeración a 4 grados y después se centrifugó para separar dicho paquete bacteriano del suero. Se probaron los sueros una vez adsorbidos con las cepas de referencia K88,K99.

Para adsorber el suero de la cepa 987P de referencia se utilizó a una cepa negativa que no exprese este antígeno inoculándola en caldo casoy e incubando a 18 grados centigrados(10,16) para proseguir con la metodología antes mencionada .

La técnica que se utilizó para detectar antígenos fimbriales es la de doble difusión de Ouchterlony. Que consistió en disolver en solución reguladora de Fosfatos (PBS) agar noble 1% y .1% de azida sódica una vez que solidificó dicho agar se procedió a perforarlo. Los orificios no excedieron de 7mm de diámetro la distancia no fué mayor de 10 mm de un orificio a otro. El orificio del centro se lleno con antisuero monoespecifico y los orificios del alrededor con antígenos fimbriales purificados y al paso de los días se busco líneas de precipitación en el espacio del orificio del centro y los orificios de alrededor siendo esta una detección positiva(28,29).

RESULTADOS

Los antisueros se obtuvieron mediante el método de Evans y col. Se inmunizaron varios conejos con las cepas de referencia (K99, K88, 987P) con el fin de obtener el antisuero de cada cepa con los más altos títulos y la mayor monoespecificidad posible.

Los resultados de los títulos obtenidos de los antisueros seleccionados se presentan en la tabla número 1. La cepa más inmunogénica fue la K99 al producir el antisuero con los más altos títulos de anticuerpos. Contrasta en estos resultados el título producido por la cepa 987P, arrojando el antisuero con menor título de anticuerpos. La cepa K88 produjo una cantidad regular de anticuerpos.

La monoespecificidad de los antisueros fue comprobada gracias a la técnica de doble difusión de Duchterlony, como se observa en las fotografías 1, 3, 5 respectivamente. Se confirmó la monoespecificidad de cada uno de los antisueros que se utilizaron para detectar antígenos fimbriales. Se aprecia como el antisuero reacciona específicamente con el antígeno fimbrial correspondiente. En la fotografía número 1 tenemos en el orificio de el centro el antisuero K99 y en los orificios de alrededor los antígenos fimbriales K99, K88, 987P nótese las líneas de precipitación que se forman en el espacio que comprende el orificio de el centro al orificio que está lleno con el antígeno fimbrial K99. En la fotografía número 3 tenemos en el orificio de el centro el antisuero K88 nótese que en los orificios que corresponden a las fimbrias K99, 987P existen vestigios de reacción pero en el orificio que corresponde a K88 se forma una gran línea de precipitación. En la fotografía número 5 el orificio de el centro fue llenado con el antisuero 987P por lo cual ocasiona una débil línea de precipitación en el orificio que corresponde a la fimbria 987P y observándose negativo en los otros dos orificios.

Proceso de purificación

Se cuantificó el rendimiento de proteína con la técnica de Lowry en las principales etapas de el proceso de purificación de cada una de las cepas de referencia. Como se puede observar en la tabla número 2 el rendimiento de proteína obtenida en el proceso de purificación, es muy similar al inicio de el proceso de las 3 cepas es decir hasta la primera precipitación, pero en la segunda precipitación el rendimiento discrepa a favor de K99 obteniendo la mayor cantidad de proteína de los 3 procesos de purificación. En la tabla número 3 observamos la cantidad final de proteína obtenida, al finalizar cada uno de los procesos de purificación siendo la cepa con mayor cantidad de proteína K99.

Por otra parte con la técnica de doble difusión de Duchterlony se detectaron antígenos fimbriales en las principales etapas de cada uno de los procesos de purificación siendo estas las siguientes etapas de el proceso: Sobrenadante de la

1era precipitación(SD1),precipitado de la 1era precipitación (PF1),sobrenadante de la 2nda precipitación(SD2),precipitado de la 2nda precipitación(PF2),testigo positivo y testigo negativo.En la fotografia numero 2 tenemos el proceso de purificación correspondiente a la cepa K99 y podemos observar líneas de precipitación muy marcadas en los orificios llenados con el sobrenadante de la 1era precipitación y con el precipitado de la 2nda precipitación esto significa la detección de fimbrias en estas dos etapas de el proceso.Por otro lado en la fotografia numero 4 podemos observar en el proceso de purificación de la cepa K88 líneas de precipitación más tenues pero totalmente claras y con esto determinamos la existencia de fimbrias tambien en este proceso.Por ultimo en la fotografia numero 6 observamos el proceso de purificación de la cepa 987P este es un caso muy similar si hacemos referencia a los casos anteriores(K99,K88)de esta manera confirmamos la existencia de fimbrias en las mismas etapas de purificación como en los procesos anteriores.En resumen en los tres procesos de purificación se pueden observar líneas de precipitación en las siguientes etapas de cada proceso:Sobrenadante de la primera precipitación y precipitado de la segunda precipitación.

Cepa	Título del antisuero
K99	10240
K88	5120
987P	2560

tabla#1 títulos de antisueros seleccionados con la técnica de aglutinación en tubo.

ETAPA DE PURIFICACION

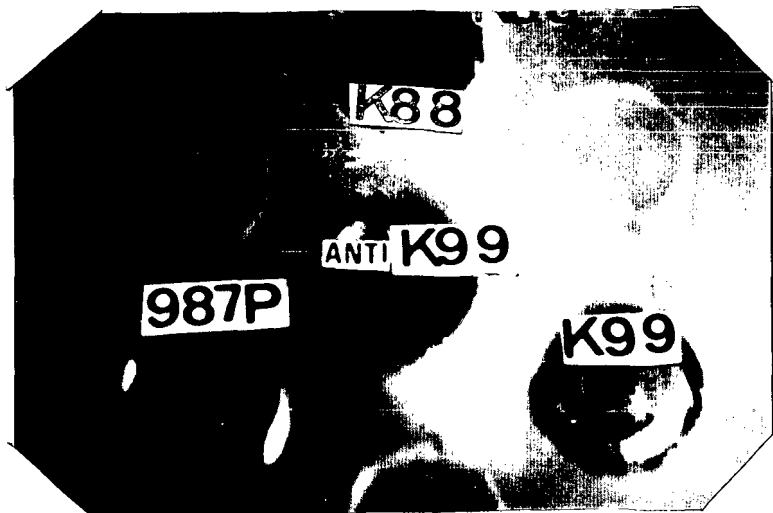
CEPA	agitación liera		precipitación	2nda precipitación	
	V(30)	SE(1)	SO(50)	SE(12)	SO(100)
K99	205,500	4,350	196,000	26,760	163,000
K88	201,600	2,350	124,000	20,640	86,000
987P	200,400	2,880	118,000	18,840	73,000

cantidad total de proteína en microgramos

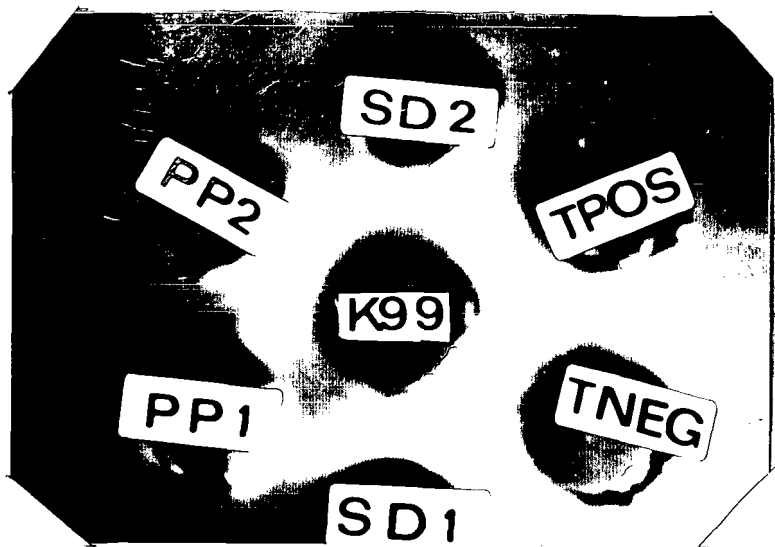
tabla #2 rendimiento de proteína en los tres procesos: observese qué al iniciarse el proceso de purificación las cantidades de proteína son muy similares ,pero apartir de la primera precipitación las cantidades difieren,obteniendo la más alta cantidad de proteína el proceso de purificación de la cepa K99.El numero entre parentesis indica la cantidad en mililitros.nomenclatura:vortex(v) ,sedimento(se),sobrenadante(so).

Cepa	Microgramos \Mililitro
K99	2230
K88	1720
987P	1570

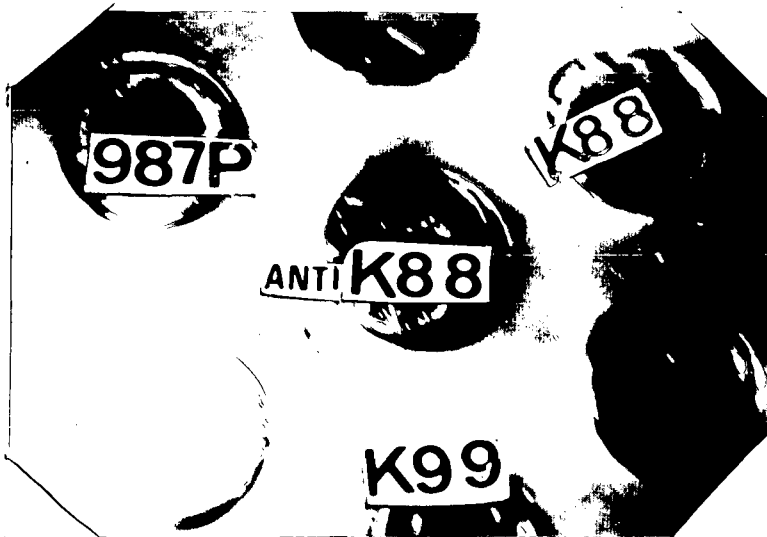
Tabla # 3 Cantidad obtenida de proteína al final de el proceso de purificación.



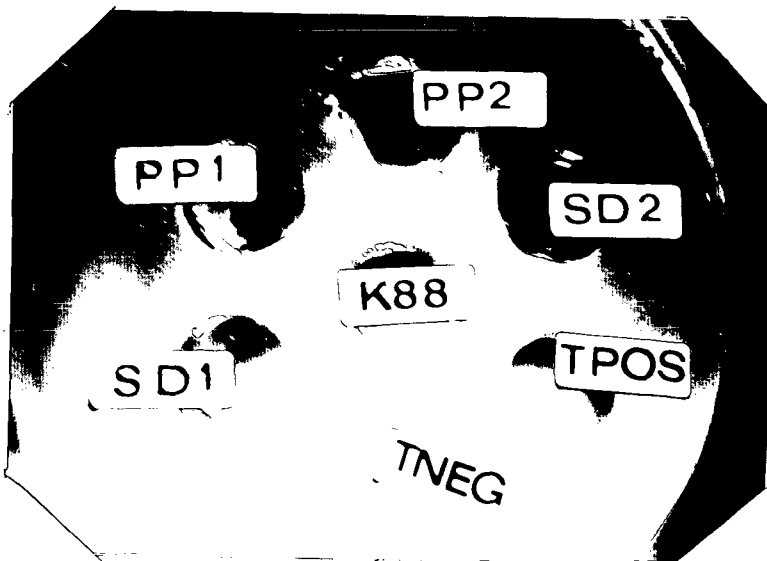
FOTOGRAFIA No 1 con la tecnica de Ducherlonv se confirno la moespecificidad de el antisuero K99.Los orificios fueron lle-
nados con antigenos fimbriales purificados K99,K88.987P,se
puede observar lineas de precipitación muy marcadas en el
orificio qué corresponde al antigeno K99.



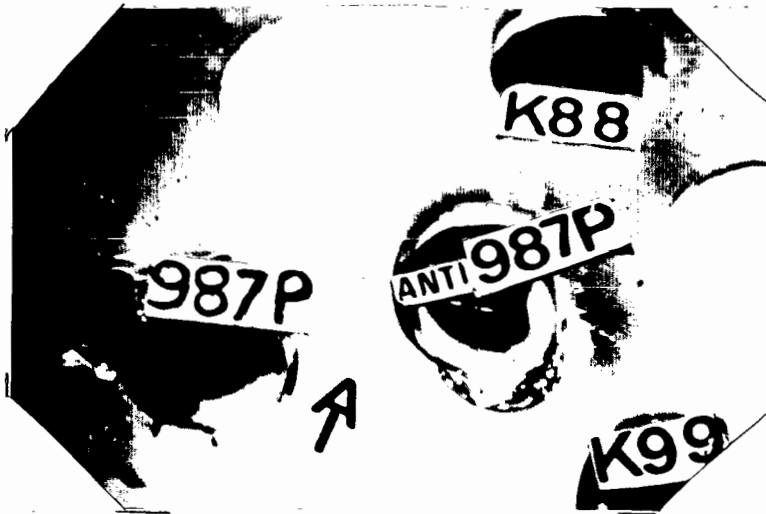
FOTOGRAFIA No 2 detección de antigenos fimbriales de la capa
K99 en el proceso de purificación.Observese las lineas muy
marcadas en los orificios qué corresponden al sobrenadante de
la primera precipitación y al precipitado de la segunda pre-
cipitación.



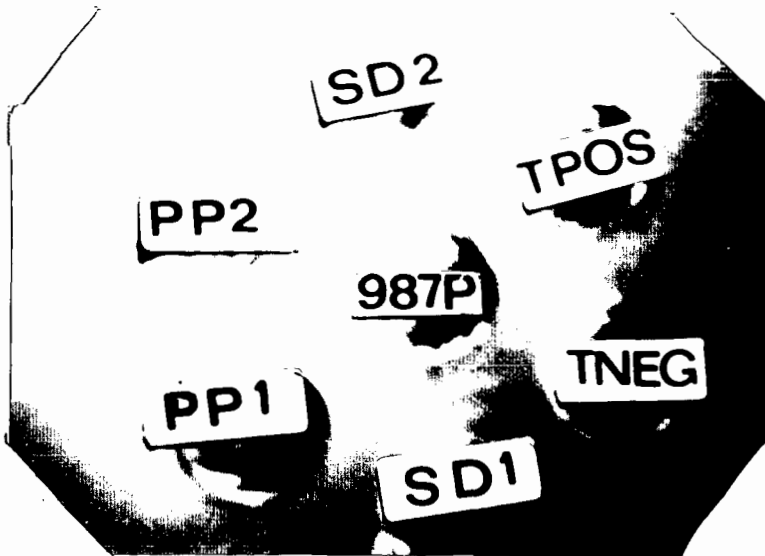
FOTOGRAFIA No 3 prueba para demostrar la mono especificidad de el antisuero K88. Notese que los orificios que corresponden a K99, 987P existen vestigios de reaccion, pero al orificio que corresponde al antigeno K88 la linea de precipitacion es muy notable.



FOTOGRAFIA No 4 deteccion de antigenos fimbriales de la cepa K88 en el proceso de purificacion, notese las lineas de precipitacion que se forman en los orificios llenados con el sobrenadante de la primera precipitacion y el precipitado de la segunda precipitacion.



FOTOGRAFIA No 5 prueba para confirmar la monoespecificidad de el antisuero 987P. Observese que en los otros orificios no existen vestigios de reaccion.



FOTOGRAFIA No 6 detección de antígenos fimbriales de la cepa 987P en las principales etapas de el proceso de purificación.

D I S C U S I O N

Para el control de la diarrea porcina se utilizan diversas bacterinas comerciales que contienen los factores de adherencia, que son los que confieren a la bacteria junto con la producción de enterotoxinas la posibilidad de ser patógenas. Por otro lado con ingeniería genética se ha logrado conformar un compuesto conteniendo las fimbrias de las tres cepas.

En este trabajo se purificarón los antígenos fimbriales de las cepas K99, K88 y 987P con un método físico-químico, resultando esta metodología económica y accesible. Para que esto fuera posible se inmunizarón conejos con las cepas de referencia (K99, K88, 987P) para poder obtener antisueros específicos para cada una de las cepas, esto se logró gracias a que los antisueros fueron absorbidos con cepas que no expresaron dichos antígenos. Al contar con los antisueros se pudo detectar antígenos fimbriales con la técnica de Duchterlony (28, 29).

En los tres procesos de purificación de los antígenos fimbriales se obtuvieron características generales diferentes. Los antígenos fimbriales K99, K88, 987P fueron obtenidos con la misma técnica (25). Los resultados obtenidos nos indican que el antígeno fimbrial K99 arrojó un rendimiento mayor de proteína en el proceso de purificación, en comparación de los otros dos procesos de purificación de los antígenos fimbriales K88, 987P. La purificación de antígenos fimbriales con la técnica de Issacson solo ha sido reportada en la cepa K99, en este sentido los resultados obtenidos a comparación de lo obtenido por Issacson (1977) difieren en lo que respecta a cantidad de proteína obtenida en la cepa K99 siendo menor el rendimiento proteína. Por otro lado con respecto a las cepas K88, 987P no existen reportes de la purificación de estas cepas con esta misma técnica, en consecuencia el rendimiento de proteína de estas cepas es mucho menor si se compara con lo obtenido en la cepa K99. Creemos que esta diferencia es consecuencia de las concentraciones de sulfato de amonio en las dos respectivas precipitaciones.

Con respecto a los resultados obtenidos con la técnica de Duchterlony se comprobó la eficacia de esta misma para la detección de antígenos fimbriales, por otro lado también existieron diferencias a lo que se refiere grosor y tamaño de las líneas de precipitación.

CONCLUSIONES

- 1-La eficiencia en la obtención de las proteínas fimbriales fue menor que la obtenida por Issacsón.
- 2-La técnica utilizada es útil para la purificación de fimbrias de las cepas K99, K88, 987P.
- 3-Se comprobó la eficacia de la técnica de Ducherlony para detectar antígenos fimbriales.
- 4-Esta metodología es más económica y accesible a casi todos los laboratorios, que la de obtener las fimbrias por ingeniería genética.
- 5-El rendimiento de proteína fue mayor en el proceso de purificación de la cepa K99.

B i b l i o g r a f í a

- 1.-A.Uruchurtum, J.M Doborto.1975.Mortalidad en lechones estudio de recapitulativo. Veterinaria Mex.Vol 6.pag 95-106.
- 2.-Espejo P.R.1985.Aspectos economicos de la porcicultura en Mexico 1960-1985 Instituto de Investigaciones económicas UNAM.
- 3.-D.J.Taylor.1987.Enfermedades del cerdo. Manual moderno México.D.F
- 4.-Sallwood R.1984.The K88 adherence system in swine in attachment of organism to the gut mucosa Vol.1.Boedeker E.C.ED CRP PRESS.Boca Raton.Florida 22-23.
- 5.-Quiroz P.J,Olquin R.J,Garza R.1975.Anticuerpos adquiridos pasivamente en relación con mortalidad e incremento de peso de lechones. Veterinaria México.Vol 6 Pag.84-91.
- 6.-Morilla A.Correa P.1985.Avances recientes en las enfermedades del cerdo AMVEC Pag 51-57.
- 7.-Willson G.P.1982.Biología del cerdo.Ed Acribia Pag 238-241.
- 8.-Friedhelm H.1984.Inmunoprofilaxis de los animales domésticos.Ed.Acribia.
- 9.-Guerrant R.L.1985.D.New concepts in the pathogenesis of ESCHERICHIA COLI diarrhea.Microbiology 1985 .Ed Loreta Leive y Cois.American society for microbiology.Washington DC USA.Pag 67.
- 10.-Gaastra W. And F.K .De Graaf.1982.Host-Specific Fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic ESCHERICHIA COLI Strains .Microbiol.Rev 46:129-161.
- 11.-Cowan S.T.1982.Manual para la identificación de bacterias de importancia medica.CECSA 153-158.
- 12.-Silverblatt,F.J And R.Weinstein.1985.Enterobacteriaceae en :Principles and practice of infectious diseases. Mendell.Douglas.Bennet(EDS) Wiley medical.1226-1233.
- 13.-Jawest E,Melnick J.1970. Review medical microbiology 9 ED.Lange medical publications 194-195.
- 14.-Freeman,B.A.1979.The enteric bacilli chapter 18.burrows textbook of microbiology 21 EDW.B Saundersgo.Pag 21-23,504-505.
- 15.-Orskov.J.F,Orskov W.J,Sojka and J.M Leach.1961.Simultaneous occurrence of ESCHERICHIA COLI B and L.Antigens in strain S From diseased swine.Acta pathol.Microbiol scand.Sect B.53:404-422.

- 16.-Schneider, R.A., TO, S.C M. 1982. Enterotoxigenic ESCHERICHIA COLI strains that express K88 and 987P pilus antigens. *Infect. Immun.* 36:417-418.
- 17.-Moon, H.W.B., Nagy R.E., Isaccson. 1977. Occurrence of K99 antigen on ESCHERICHIA COLI isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99 enterotoxigenic ESCHERICHIA COLI from calves and pig infect. *Inmun.* 15:614-620.
- 18.-Nagy, B.H.W and R.E Isaccson. 1976. Colonization of porcine small intestine by ESCHERICHIA COLI : Ideal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigen and by some acapsular mutants infect. *Inmun* 13:1214-1220.
- 19.-Isaacson, R.E. 1984. Regulation of pilus expression in attachment organism to the gut mucosa Vol.1 Boedeker E.C.ED. Crrp press, boca raton Florida Pag 122-127.
- 20.-Edwards, P.R and W.H. Ewind. 1972. Identification of enterobacteriaceae. 3 ED. Burgess publishing co. Minneapolis. Minn.
- 21.-Izeta J, Valazco H y otros. 1988. prueba de campo de una bacterina contra ESCHERICHIA COLI conteniendo Los factores K88, K99, 987P, F41 y una bacterina autógena viva oral, sobre la frecuencia de lechones diarreicos, ganancia de peso y mortalidad durante la lactancia. *Porcira* 133:20-30.
- 22.-Baljer G, Hoerstke Michael. 1983. Comparative trials with an oral immunization against ESCHERICHIA COLI and S.TYPHIMURIUM. *Animal reserch and development.* Tubineen federal republic of Germany Vol 18:55-62.
- 23.-Awad M, Sagmeister H. 1984. Peroral immunization with autogenous vaccine to protect ESCHERICHIA COLI associated post weaning scours of pigs. *International pig veterinary society proceedings.* 8TH I.P.V.S Congress ghent, belgium.
- 24.-Baars J, Pennings A. 1984. Field and challenge experiments with vaccine containing LT-TOXID AND Pil-Antigens (K88ab, K88ac, K99, 987P). *Internacional pig veterinary society proceedings,* 8TH I.P.V.S Congress ghent. Belgium.
- 25.-Isaacson, R.E. 1977. K99 Surface antigen of ESCHERICHIA COLI. Purification and partial characterization. *Infect. Immun.* 15:272-279.
- 26.-Klaasen P, Woodwar M. 1990. The 987P Gene cluster in enterotoxigenic ESCHERICHIA COLI contains an stpA trasposon that activates 987P expression. *Infect and immun.* 38:801-806.
- 27.-Evans, D.G. and D.J. Evans, JR. 1987. new surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA\11) produced by enterotoxigenic ESCHERICHIA COLI of serogrups O6 and 8 *infect. Immun* 21:638-647.

- 28.-Garvey S.J,Cremer E.N.1977.Methods in immunology third edition addison wesley publishing company inc.
- 29.-Carpenter L.P.1982.Immunologia y serologia 2da edicion. prensa medica Mexicana S.A 485-486.