

Caracterización de dos anticuerpos monoclonales hacia las fimbrias K99

Jesús A. Junco Barranco, Ana C. Campal Espinosa, Antonio Miranda Cruz, María Dolores Castro Santana, Sonia Casas Suárez, Niurka Arteaga Moré y Lisset León Barreras

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey

e-mail: acampal@cigbcam.cigb.edu.cu

Resumen

Las fimbrias K99 son una de las proteínas encargadas de la adhesión y colonización del intestino delgado del hospedero comúnmente expresadas por cepas porcinas y bovinas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ECET). Con el objetivo de diseñar sistemas para el diagnóstico de los diferentes tipos de fimbrias expresadas por las ECET, se obtuvieron dos anticuerpos monoclonales contra el antígeno fimbrial K99. Los determinantes antigénicos reconocidos por los dos anticuerpos fueron caracterizados por ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA con antígenos relacionados, análisis de epítopes por competencia, experimentos de aglutinación con cepas referentes y Western Blot; también se les determinó la constante de afinidad. Los anticuerpos obtenidos reconocen a un epítipo conformacional presente en la fimbria nativa. Los resultados demuestran la utilidad de estos anticuerpos para el diseño de sistemas para el diagnóstico y el monitoreo de la producción del antígeno K99 presente en un preparado vacunal.

Abstract

K99 are proteins which enhance enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesion and colonization in a host small bowel. These fimbriae are commonly expressed through swine and bovine ETEC strains. Two monoclonal antibodies to eliminate K99 fimbrial antigen were obtained in order to designed a number of systems for diagnosing different fimbria types expressed through ETEC. The antigen determinants detected by the two monoclonal antibodies were characterized by immuno-enzymatic tests like ELISA using related antigens, epitope competence analysis, referential strains agglutination tests, and the Western Blot test. The antigen determinant affinity constant was also found. The antibodies so obtained can identify a conformable epitope in the original fimbria. Results proved the antibodies usefulness in designing systems for the diagnosis and control of K99 antigen production in vaccines.

Palabras claves: Fimbria, *Escherichia coli* enterotoxigénica, anticuerpos monoclonales, K99

Introducción

Las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ECET) continúan siendo una causa de mortalidad y morbilidad en cerdos y terneros neonatos y al destete en el mundo (Ascon *et al.*, 1998). Las cepas de ECET portadoras de los genes de las toxinas LTII y STII tienen la habilidad de colonizar el intestino delgado del hombre y los animales, demostrando especificidad hacia el hospedero a través de factores de colonización. Los factores de colonización K99 y K88 son importantes para la colonización del epitelio intestinal de terneros y cerdos, respectivamente (Khatib *et al.*, 2002). La expresión de la fimbria K99 (F5) está presente en la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica aisladas en terneros recién nacidos con diarreas (Moon y Bunn, 1993). Las mismas causan cuantiosas pérdidas económicas en la explotación ganadera (Wray y Woodward, 1997).

La K99 es una proteína básica, homopolimérica, constituida por subunidades repetitivas de 18,4 kDa (Lindahl *et al.*, 1991). Mediante estudios realizados de sus perfiles de hidrofiliidad han sido detectados varios segmentos que potencialmente portan los determinantes antigénicos de la subunidad; ellos están localizados entre los residuos aminoacídicos 41-48; 69-76; 82-88; 10-112 y 154-159, siendo este último el más prominente (Roosendaal *et al.*, 1984).

En ocasiones, las cepas bovinas F5 (+) de los serotipos O9 y O101 aparecen asociadas con la fimbria F41 (Anderson *et al.*, 1988; Vázquez *et al.*, 1996).

Existe una limitada homología entre las secuencias aminoacídicas de las subunidades mayores de las dos fimbrias. Sin embargo, algunos autores han reportado que los AcMs dirigidos hacia la K99, protegen a cerdos neonatos contra el reto con la F41, ello sugiere una relación antigénica aun no reconocida entre ellas (Runnels *et al.*, 1987).

En el artículo se describe la caracterización de los epítopes reconocidos por dos anticuerpos monoclonales (AcMs) dirigidos hacia la fimbria K99. Uno de ellos reconoció a un determinante antigénico presente en las subunidades mayores de las fimbrias K99 y F41. Ambos anticuerpos aglutinaron cepas F5+ y fueron útiles para la detección del antígeno K99 en muestras provenientes de fermentaciones.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Las cepas fimbriadas utilizadas para los experimentos son descritas en la tabla además de la cepa MC1061 portadora del plásmido recombinante PK098 que expresa la fimbria K99 (Borroto *et al.*, 1992), la cual se creció en Medio Mínimo a 37 °C (Van der Woude *et al.*, 1990). La inhibición de la expresión de la K99 fue lograda por crecimiento de las cepas a 18 °C en presencia de L-alanina (de Graaf 1980).

Extracción y purificación de la fimbria

La cepa referente B44 fue crecida en caldo Minca durante 4 h a 37 °C. La precipitación y resuspensión de las células, así como la extracción de la fimbria, se realizó según el método descrito por Van Zijderveld *et al.* (1989). La pili fue purificada del sobrenadante hasta 60 % de pureza por el método de de Graaf y Roorda (1982).

Anticuerpos

Los anticuerpos policlonales (AcP) anti-K99 electroeluida en carnero, anti-K99 nativa y anti-HB101 en conejos, obtenidos en nuestro laboratorio fueron utilizados como controles en los diferentes ensayos. Los AcP hacia los antígenos F41 y 987P fueron donados por el Centro Nacional de Salud Animal (Habana, Cuba). Mientras que los AcP contra las inmunoglobulinas (Igs) de ratón, carnero y conejo fueron obtenidos del Centro de Inmunoensayos (Habana, Cuba). La conjugación de los AcPs se realizó por el método de Wilson y Nakane (1978).

Inmunización de los ratones y fusión

Ratones hembras Balb/c de 8 semanas fueron inmunizados subcutáneamente (sc) con 50 µg de K99 emulsionada en adjuvante completo de Freund (Difco Laboratories, USA). A los 21 días los ratones fueron reinmunizados sc con 30 µg del antígeno diluido en adjuvante incompleto de Freund. Las dos reinmunizaciones restantes se realizaron con intervalos de 21 días por vía intraperitoneal con la misma dosis de K99 diluida en tampón fosfato salino (PBS1x). Tres días después de la última inmunización los esplenocitos del ratón con mayor título de anticuerpos en suero fueron fusionados con células de mieloma X63.Ag8, 653. La fusión, los clonajes y el cultivo se realizaron según describieron Duarte *et al.* (1987).

Ensayos inmunoenzimáticos (ELISAs) para titular los sueros de los ratones y caracterizar a los anticuerpos monoclonales

Placas de microtitulación de poliestireno fueron recubiertas durante toda la noche, a 4 °C, con 10 µg/mL de la fimbria K99 purificada y diluida en tampón de recubrimiento (carbonato/bicarbonato de sodio 0,1 M, pH 9,6). Posteriormente las placas fueron lavadas con 0,05 % Tween-20-H₂O y bloqueadas por incubación a 37 °C con 0,5 % de leche descremada diluida en PBS1x. Una hora después se adicionaron los sueros en diluidos seriadamente en solución de bloqueo y/o los sobrenadantes de cultivo. Tres horas más tarde fue adicionado el AcP anti-Igs de ratón en conejo marcado con peroxidasa (HRP) y se incubó 1 h a 37 °C. Para la inmunodetección se adicionó el sustrato (5 mg de OPD y

5 μL de H_2O_2 diluidos en 10 mL de tampón citrato pH 5). La reacción coloreada fue detenida por adición de 50 μL de H_2SO_4 2,5 M y leída a 492 nm en un lector de placas (Multiskan, MCC 340).

Caracterización y purificación de los anticuerpos

Con este fin se realizó un ensayo tipo ELISA similar al anterior, pero recubriendo con los diferentes antígenos fimbriados. Como controles positivos fueron utilizados AcP obtenidos en conejos, dirigidos contra las diferentes fimbrias. El isotipo de los anticuerpos fue determinado por el método de Ouchterlohy (1978). Los AcMs fueron purificados a partir de líquido ascítico por cromatografía de afinidad con Proteína A-Sepharosa (Pharmacia Fine Chemicals) (Anonymous, 1986). La constante de afinidad de los anticuerpos fue determinada por el método descrito por Beatty *et al.* (1987).

Ensayo de Dot-blot

La membrana de nitrocelulosa se recubrió con concentraciones del Ag K99 electroeluido en concentraciones desde 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ -0,002 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluido seriadamente $\frac{1}{2}$ en PBS 1x. La membrana se lavó con solución tampón Tris salino (Tris-HCl 10 mmol/L, 0,9 % de NaCl, pH: 7,4) (TTS 1x). Luego se bloqueó durante 90 minutos a 42 °C, con 5 % de leche descremada diluida en TTS1x. Posteriormente fueron añadidos los AcMs diluidos 1/100 en solución de bloqueo. Como segundos anticuerpos se usaron AcPs de conejo anti-IgG de ratón. La reacción fue revelada usando un conjugado proteína A-oro coloidal hasta que apareció la banda coloreada. Siempre 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).

ELISA competitivo para el análisis de los epítopes

Volúmenes de 100 μL /pozo del AcM CBC-K99.1 fueron adicionados en diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ en concentraciones desde 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en placas prerrecubiertas con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antígeno K99 purificado. Después de 1 h de incubación a 37 °C, fueron adicionados a la placa 100 μL del AcM CBC-K99.2-HRP, en la dilución óptima de trabajo y se dejó reaccionar durante 1 h a 37 °C, posterior a lo cual se le añadió la solución de sustrato. El por ciento de inhibición (%) fue calculado de la siguiente forma: $\% B = (B_t (Ab_2) - B (Ab_1)) / B_0 (Ab_2) \times 100$, $\% I = 100 \% - \% B$. Donde, B % es el por ciento de unión, B_t es el valor de absorbancia cuando la concentración del CBC-K99.1 es 0; B es el valor de absorbancia para una concentración conocida del CBC-K99.1, B_0 es el valor de absorbancia donde la concentración de CBC-K99.1 es máxima.

Ensayo de aglutinación bacteriana: El cultivo bacteriano de la cepa B44 fue centrifugado a 10 000 rpm por 15 min y la biomasa resuspendida en PBS1x. Posteriormente 50 μL de la suspensión se mezclaron con igual volumen de los AcMs en diferentes diluciones usando para ello placas de vidrio. Como controles positivos y negativos se usaron AcP obtenidos en conejos, dirigidos contra las fimbrias K88 y K99. La aglutinación fue detectada visualmente después del transcurrido 2 ó 3 minutos. Los títulos fueron estimados como la dilución máxima de los anticuerpos donde se observó aglutinación. El mismo ensayo se realizó para la cepa recombinante MC1064.

Resultados

Como resultado de la fusión realizada se obtuvieron dos líneas estables de hibridomas secretoras de anticuerpos monoclonales denominados CBC-K99.1 y CBC-K99.2. Los ensayos de reactividad cruzada, frente a las preparaciones purificadas de los diferentes antígenos fimbriales relacionados, demostraron que el AcM CBC-K99.1 reconoce un epítipo común para las subunidades fimblicas de la K99 y la F41. El CBC-K99.2, por su parte, reconoce a un determinante antigénico específico para la subunidad fimblica K99 (Fig. 1).

Mediante el ensayo de Ouchterlony (1978) se determinó que el CBC-K99.1 es un AcM de la subclase IgM, mientras que el CBC-K99.2 es del isotipo IgG1. Este

resultado se corresponde con la talla observada para ambos anticuerpos en electroforesis (Fig. 2). Sorpresivamente, ambos anticuerpos eran afines por la proteína A del *Staphylococcus aureus* lo que nos permitió purificarlos por el mismo método, con buenos rendimientos y elevados niveles de pureza (más del 90 % para el CBC-K99.2 y de un 75 % para el CBC-K99.1) según se supo por densitometría.

El ensayo de Dot Blot reveló que los dos anticuerpos son incapaces de reconocer a las fimbrias K99 nativas y recombinantes desnaturalizadas (Fig. 3). Una vez determinadas las diferencias de especificidad antigénica entre ambos anticuerpos, nos resultó interesante conocer la disposición espacial de los epítopes reconocidos en la fimbria K99. En el ensayo diseñado para ello, los dos AcMs no compitieron entre sí por el reconocimiento del antígeno, lo que demostró que los epítopes reconocidos por los respectivos anticuerpos están estructuralmente distantes (Fig. 4).

En los ensayos de aglutinación bacteriana con la cepa referente y la recombinante ambos anticuerpos monoclonales demostraron diferencias significativas en su capacidad de reacción. Con el AcM CBC-K99.2 a una concentración de 2,6 µg/mL se observó una intensa reacción positiva frente a un cultivo con $5,6 \times 10^6$ células K99+/mL. Por su parte, bajo las mismas condiciones el AcM CBC-K99.1 demostró poca capacidad aglutinante con ambas cepas.

Con el objetivo de predeterminar la utilidad de estos AcMs en el montaje de sistemas diagnósticos, fue determinada la constante de afinidad (K_d) para ambos, frente a la K99 purificada obtenida de la cepa natural (K99n) y la recombinante (K99m). La K_d calculada para el AcM CBC-K99.1 frente al antígeno K99n fue de $5,49 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$, siendo muy similar a la que se le determinó para el antígeno F41 que fue de $7,55 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$.

Es interesante que la K_d del mismo anticuerpo por la K99r fue dos órdenes inferior, o sea $7,3 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$. En el caso del AcM CBC-K99.2 la constante calculada fue $K_d(\text{K99n}) = 3,0 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ y similar para la K99r ($4,3 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$). Ninguno de los anticuerpos obtenidos resultó útil en la inmunopurificación de la K99 natural.

Discusión

En la actualidad se considera a la *Escherichia coli* como el agente etiológico de mayor importancia en la presentación de cuadros diarreicos en cerdos lactantes (Canal *et al.*, 1999). La generación de anticuerpos monoclonales hacia las fimbrias secretadas por cepas de ECET, puede ser de mucha importancia para el diseño de sistemas diagnósticos. Los dos AcMs obtenidos CBC-K99.1 y CBC-K99.2 reconocen epítopes presentes en la subunidad fimbrial de la K99. Los ensayos de especificidad realizados demostraron que el determinante antigénico reconocido por el AcM CBC-K99.1 también está presente en la subunidad mayor de la fimbria F41. Anteriormente, en estudios realizados por Anderson y Moseley (1988) había sido reportada la existencia de una limitada homología hacia el C-terminal de la secuencia aminoacídica de la subunidad mayor de la fimbria F41 con la de otras adhesinas, entre ellas la K99. Adicionalmente, otros grupos han demostrado que la inmunización pasiva de terneros con un AcM hacia la fimbria K99 es capaz de proveer protección frente al reto con cepas salvajes que coexpresan la K99 y la F41 (Paul *et al.*, 1987). Esta es una evidencia indirecta de que ambas adhesinas portan al menos un epítipo común, el que es inmunológicamente prominente. Esta hipótesis es válida si se tienen en cuenta los resultados obtenidos con nuestro anticuerpo frente a los antígenos purificados.

Los anticuerpos obtenidos también difirieron en cuanto al isotipo. Como era de esperar uno de los anticuerpos fue del isotipo IgM; este y los resultados obtenidos en experimentos de fusión anteriores con el antígeno fimbriado, K88ab, en los que la mayoría de los hibridomas obtenidos eran secretores de anticuerpos de ese isotipo (Campal *et al.*, 2003), nos indica que probablemente la fimbrias sean antígenos independientes del timo, dado su gran tamaño y

estructura polimérica. Una reafirmación de esta hipótesis son los resultados de los estudios dirigidos a caracterizar los epítopes B y T de la subunidad mayor de la K99 (FanC), utilizando la proteína recombinante fusionada FanC: PhoA (fosfatasa alcalina), la que se utilizó en los ensayos de proliferación de células T *in vitro*, demostrándose la inexistencia de epítopes para el reconocimiento de las células T en esta proteína, mientras que se demostró que los epítopes para la células B son continuos y potencialmente inmunodominantes hacia el carboxi-terminal (Ogunniyi *et al.*, 2002).

Resultó interesante que el AcM CBC-K99.1 siendo una IgM tuviera alta afinidad por la proteína A del *Staphylococcus aureus*, como se observó durante la purificación. Esta es una característica poco común para las inmunoglobulinas del isotipo IgM ya que el sitio de unión de la proteína A a las inmunoglobulinas comprende residuos glicosilados de His localizados en los dominios C γ 2-C γ 3 de la porción Fc de las IgG (Stone *et al.*, 1989). Contrariamente, la IgM posee residuos de ácido siálico en los dominios C μ 1, C μ 2, C μ 3 y residuos de manosa en el C μ 4, todos unidos a Asn (Davis y Shulman, 1989). La propiedad observada en nuestro anticuerpo quizás se deba a la presencia de mutaciones en los aminoácidos glicosilados en alguno de los dominios C μ 2 y C μ 3 de la IgM, que le propicien el reconocimiento por la Proteína A. Nosotros no hemos evaluado las propiedades efectoras de nuestro AcM, ni tampoco descartamos la posibilidad de que las condiciones escogidas tanto con respecto al pH del tampón, como a su fuerza iónica hayan propiciado, condiciones óptimas para la unión del AcM a la Proteína A, como previamente ha sido sugerido por algunos autores (Mariani *et al.*, 1991).

Los ensayos de competencia demostraron además, que los epítopes reconocidos por ambos anticuerpos en la fimbria K99 son diferentes y distantes espacialmente uno de otro. Sin embargo, para que cada epítope sea reconocido por su anticuerpo monoclonal es necesario que mantenga su estructura terciaria, tal y como lo demostró el ensayo de Western Blot. La naturaleza conformacional de los determinantes antigénicos presentes en las fimbrias, parece ser una característica común para estas proteínas según nuestros datos y lo descrito por otros autores (Van Zijderveld *et al.*, 1990, Campal *et al.*, 2003).

Resulta interesante que los altos valores de la constante de afinidad calculada para cada uno de los AcMs frente al antígeno extraído y purificado de cepas naturales fue muy similar. Sin embargo, cuando se hizo reaccionar CBC-K99.1 con la K99 purificada procedente de la cepa recombinante el valor calculado estuvo en un rango medio, dos órdenes inferior. Ello señala que la cepa transformada expresa una proteína que en el sitio reconocido por el AcM CBC-K99.1, porta un cambio estructural que puede ser debido a cambios en la secuencia aminoacídica. Sin embargo, no se han detectado cambios en su inmunogenicidad *in vivo* (datos no mostrados). Con el antígeno F41 el AcM demostró una afinidad muy cercana frente a la K99n, lo que confirma el hecho de que el epítope reconocido por el AcM en ambas proteínas es conformacionalmente idéntico y está conservado. Sería muy interesante que se realizaran estudios futuros de mapeo de epítopes, para determinar su posible importancia en la estructura y funcionamiento de estas fimbrias.

Otra característica interesante del reconocimiento antigénico de ambos AcMs se reveló en el experimento de aglutinación. En este, el determinante antigénico reconocido por el AcM CBC-K99.2 en la subunidad fímbrica purificada se conserva cuando la fimbria se encuentra, en su estructura polimérica nativa anclada a la célula bacteriana. Mientras, la capacidad aglutinante disminuida mostrada por el anticuerpo CBC-K99.1, puede ser una consecuencia de que el epítope reconocido por este anticuerpo en la subunidad purificada, se encuentre en su forma natural, en la bacteria, estructuralmente menos expuesto para la reacción con el anticuerpo lo que unido a la gran talla de la IgM pudiera dificultar, desde el punto de vista estérico, una interacción más eficiente.

Los datos obtenidos son valiosos, pero serán necesarios otros experimentos para lograr una mayor caracterización de los epítopes reconocidos por los AcMs, entre ellos los estudios con péptidos sintéticos para identificar la secuencia aminoacídica reconocida por los anticuerpos. Los ensayos de inmunoprecipitación podrían ser de gran valor para determinar si nuestros anticuerpos reconocen solo la subunidad mayor de 18 kDa con la cual se inmunizó, o si alguno de estos epítopes está también presente en algunas de las subunidades minoritarias de estas estructuras. También sería de interés conocer *in vivo* si estos anticuerpos tienen actividad neutralizante de la adhesión bacteriana al intestino del hospedero, frente al reto con cepas K99+ y F41+.

Los resultados expuestos nos permiten concluir que estos anticuerpos son útiles para la caracterización y estudio del antígeno K99 natural, así como del expresado por nuestras cepas transformadas. Está siendo evaluada su posterior aplicación en sistemas de diagnóstico, para la rápida tipificación de cepas salvajes aisladas por hisopaje en el campo.

Referencias

- ANDERSON, D. G. Y S. L. MOSELEY: *Escherichia coli* F41 Adhesin: Genetic Organization, Nucleotide Sequence and Homology with the K88 Determinant, *Journal of Bacteriology*, 170 (10): 4890-4896, 1988.
- 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.
- BORROTO, A.; R. BASALTO, M. MORENO, R. SILVA, I. WONG Y E. BOVER: Clonaje de las subunidades fímbricas K88ab y K99 e identificación de cepas de *E. coli* enterotoxigénicas aisladas de animales enfermos, *Bioteología Aplicada* 9: 148-155, 1992.
- CANAL, A. M.; V. G. CUBILLOS, J. ZAMORA, G. REINHARDT, E. PAREDES, R. IDEFONSO, A. ALBERDI Y P. MACÍAS: Técnicas inmunohistoquímicas para la identificación de antígenos fimbriables de *E. coli* enteropatógeno, *Arch. Med. Vet.*, 31 (1): 1-12, 1999.
- CAMPAL, ANA; MARÍA CASTRO, J. JUNCO Y SONIA CASAS: Caracterización parcial de un epítipo de la fimbria k88ab, *Rev. prod. anim.*, Universidad de Camagüey, Cuba (aparece en este número).
- DAVIS, A. C. Y M. J. SHULMAN: IgM- Molecular Requirements for its Assembly and Function, *Immunology Today*, 10: 122-188, 1989.
- DE GRAAF, F. K.; P. KLAASEN-BOOR Y J. E. VAN HEES: Biosíntesis of the K99 Surface Antigen is Repressed by Alanine, *Infection Immunity*, 30: 125-128, 1980.
- 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: 751-758, 1982.
- DUARTE, C.; M. E. FERNÁNDEZ-DE COSSIO, G. SIERRA E. PENTÓN, A. AGRAZ Y G. FURRAZOLA: Anticuerpos monoclonales de ratón contra el interferón recombinante alfa-2. Su empleo en la purificación y detección del antígeno, *Interferón y Bioteología*, 4: 221-232, 1987.
- KHATIB, L. A.; Y. L. TSAI Y B. H. OLSON: A Biomarker for the Identification of Cattle Fecal Pollution in Water Using the LTIIa Toxin Gene from Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Jun, 59 (1): 97-104, 2002.
- LAEMLI, U. K.: Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Laemli Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- LINDAHL, M.; R. BROSSMER T. WADSTRÖM: Carbohydrate Receptor Specificity of K99 Fimbriae of Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Infection and Immunity*, 57, 11: 3452-3457, 1987.
- MARIANI, M.; M. CIANFRIGLIA Y A. CASSONE: Is Mouse IgM Purification on Protein A possible? *Immunol. Today*, 10: 115-116, 1991.
- MOON, H. W. Y T. O. Bunn: Vaccines for Preventing Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections in Farm Animals, *Vaccine*, 11 (2): 213, 1993.

- MOSELEY, S. L.; G. DOUGAN, R. A. SCHNEIDER Y H. W. MOON: Cloning Chromosomal DNA Encoding the F41 Adhesin of Enterotoxigenic *E. coli* and Genetic Homology Between Adhesin F41 and K88, *J. Bacteriol.*, 16: 779-804, 1986.
- OGUNNIYI, A. D.; I. KOTLARSKI, R. MORONA Y P. A. MANNING: Epitope Analysis of the FanC Subunit Protein of the K99(F5) Fimbriae of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Using a Recombinant Fusion Technique, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, Sep. 6; 34 (1): 23-31, 2002.
- OUCHTERLONY, O.: Handbook of Experimental Immunology, Third Edition, p. 96, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978.
- PHARMACIA-LKB: Theory and practice, Sweeden, 1986
- ROOSENDAAAL, B.; W. GAASTRA Y F. K. DE GRAAF: The Nucleotide Sequence of the Gene Encoding the K99 Subunit of Enterotoxigenic *Escherichia coli*, *FEMS Microbiology Letters*, 22: 253-258, 1984.
- RUNNELS, P. L.; S. L. MOSELEY Y H. W. MOON: F41 Pili as Protective Antigens of Enterotoxigenic *Escherichia coli* that Produce F41, K99, or Both Pilus Antigens, *Infection and Immunity*, 55 (3): 555-558, 1987.
- STONE, G. C.; U. SJÖBRING, L. BJÖRCK, J. SJÖQUIST, C. V. BARBER Y F. A. NARDELLA: The Fc Binding Site for Streptococcal Protein G is in the C γ 2 - C γ 3 Interface Region of IgG and is Related to the Sites that Bind *Staphylococcal* Protein A and Human Rheumatoid Factors, *J. of Immunology*, 143, (2): 565-570, 1989.
- TOWBIN, H.; T. STAHELIN 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 WOUDE, M. W.; P. A. ARTS, F. DE GRAAF, H. W. VAN VERSELD Y F. K. DE GRAAF: Growth-Rate Dependent Synthesis of K99 Fimbrial Subunits is Regulated at the LEVEL of Transcription, *Journal of General Microbiology*, 136: 897-903, 1990.
- VAN ZIJDERBELD, F. G.; F. WESTENBRINK, J. ANAKOTTA, R. A. M. BROUWERS, Y A. M. VAN ZIJDERVELD: Characterization of F41 Antigen of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Using Monoclonal Antibodies, *Infection and Immunity*, 57 (4): 1192-1199, 1989.
- VAN ZIJDERBELD, F. G.; J. ANAKOTTA, R. A. M. BROUWERS, A. M. VAN ZIJDERVELD, D. BAKKER Y F. K. DE GRAAF: Epitope Analysis of the F4 (K88) Fimbrial Antigen Complex of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by Using Monoclonal Antibodies, *Infection and Immunity*, 58 (6): 1870-1878, 1990.
- VAZQUEZ, F.; E. A. GONZALEZ, J. I. GARABAL Y J. BLANCO: Fimbriae Extracts from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains of Bovine and Porcine Origin with K99 and/or F41 Antigens, *Vet Microbiol.*, Feb;48 (3-4): 231-41, 1996.
- ILSON, M. B. Y P. K. NAKANE: Immunofluorescence and Related Staining Technique, p. 215, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978.
- WRAY, C. Y M. J. WOODWARD: *Escherichia coli* Infections in Farm Animals. pp. 49-84, Ed M. Summon (ed.) *Escherichia coli* mechanism of virulence, Cambridge University Press, Cambridge, England, 1997.

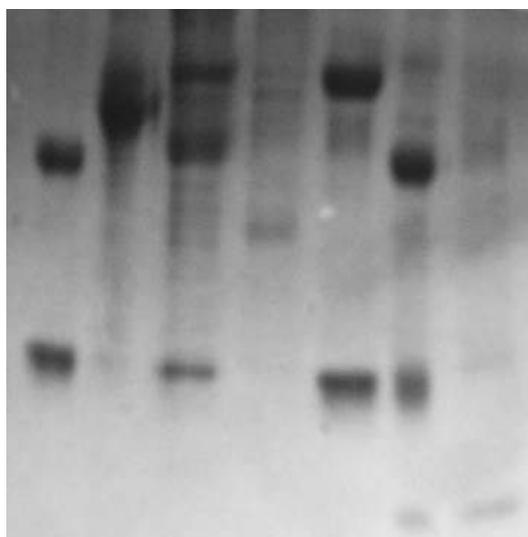
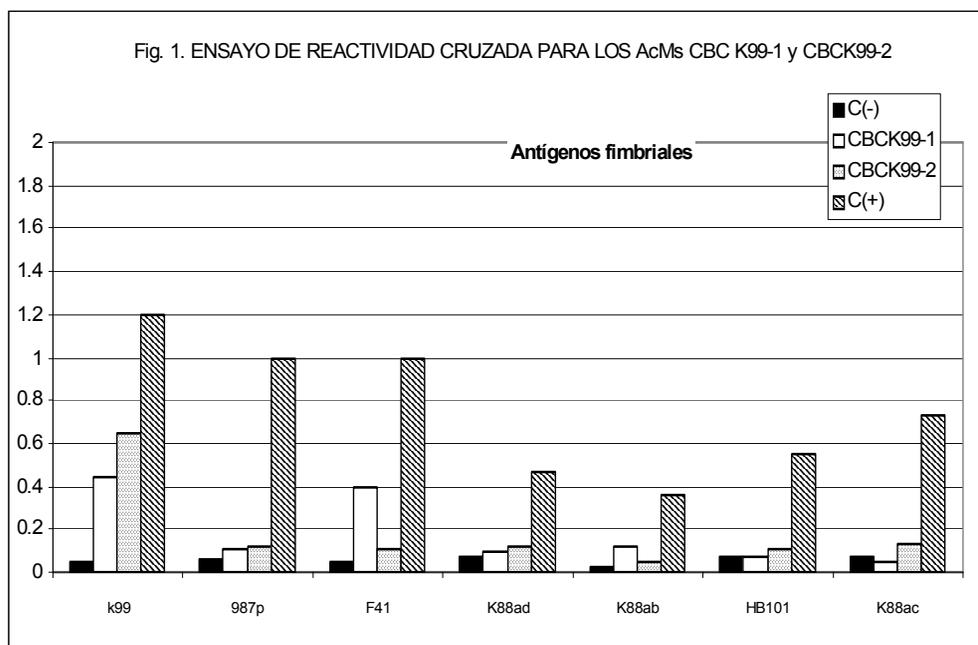


Figura 2. Electroforesis de los AcMs anti K99. Carril 1: CBEGF-2, Carril 2: Fracción no unida del CBCK99-1, Carril 3: PPM de IgG e IgM, Carril 4: Fracción no unida del CBCK99-2, Carril 5: CBCK99-1 purificado por proteína A, Carril 6: CBCK99-2 purificado por proteína A



Figura 3. Dot Blot recubriendo con el antígeno K99 desnaturalizado. A: AcP anti K99 desnaturalizada. B: AcP anti K99 nativo

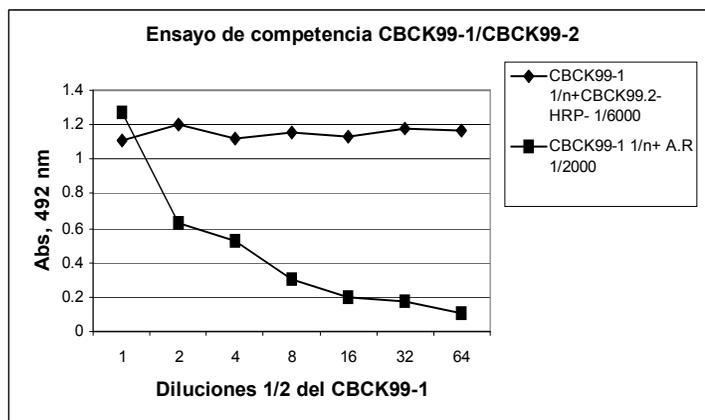


Fig. 4 Ensayo de competencia entre los AcMs CBCK99-1 y CBCK99-2.

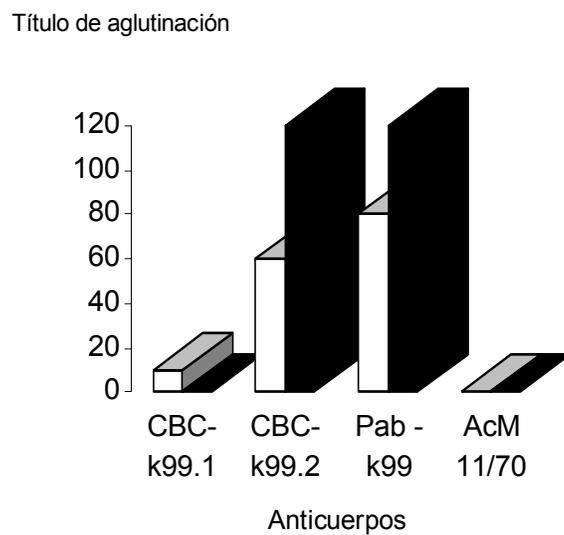


Fig. 5 El AcM CBC-K99.2 tiene una capacidad aglutinante comparada con la del AcP dirigido contra la misma fimbria. Las barras claras representan a la cepa B44 en cantidades de $2,5 \times 10^8$ células, mientras las barras oscuras representan a la cepa recombinante en cantidades de 5×10^5 células.

Cepas bacterianas usadas en los ensayos.

Denominación	Ag. fimbrial	Serotipo
G 205	K88ac	O8:K87:K88ac
G7	K88ab	O8:K87: K88ab
pr 190-56	K88 ad	O32: K87: K88ad
B44	K99	O9: K30K99,F41:H-
987p-2	p987-2	O9:K103, 987p
MC 1061		
MO5	F41	O101:K30:F41