

Procedimiento general para purificar a pequeña escala las fimbrias expresadas por cepas porcinas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas

A general procedure for small-scale purification of fimbriae expressed by porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* strains

Ana Cristina Campal Espinosa¹, Jesús Arturo Junco Barranco¹, Niurka Onexis Arteaga Moré¹, María Dolores Castro Santana¹, Sonia Casas Suárez¹, Licette León Barreras¹, Guillermo Barreto Arguilagos², Guillermo Pardo Cardoso²

Resumen

La fimbriación en cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas es un proceso complejo controlado por varios mecanismos: reguladores globales y locales de la transcripción y el control postranscripcional, e influenciado por factores como velocidad de crecimiento bacteriano, composición del medio de cultivo, temperatura y pH, entre otros. Estas características propician que la expresión fimbrial se pierda con alta frecuencia. De allí que se requieran procedimientos de cultivo que favorezcan el mantenimiento de dicha expresión. Con ese objetivo, en el trabajo la población bacteriana fimbriada se enriqueció mediante cultivo estático en caldo Mueller-Hinton. Luego, la expresión fimbrial se mantuvo mediante el crecimiento en forma consecutiva en agar CFA, y el caldo Minca o Mínimo, según el tipo fimbrial, en los que se alcanzó la máxima expresión a las 4-5h de cultivo. Las fimbrias se extrajeron mediante tratamiento térmico y se precipitaron con sulfato de amonio al 40%. La purificación se realizó mediante exclusión molecular y el tratamiento con deoxicolato de sodio. La metodología propuesta integra procedimientos conocidos en un proceso simple y reproducible para la obtención de las fimbrias F4, F5, F6 y F41 en cantidades suficientes para su posterior uso en la generación de anticuerpos, el desarrollo de inmunoensayos y otros estudios a escala de laboratorio, que necesiten de preparaciones con una pureza superior al 80%, que mantengan su estructura nativa.

Palabras clave: *Escherichia coli* enterotoxigénica, fimbria, Minca, medio mínimo, CFA.

Abstract

Fimbriae expression by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains is a complex process which is controlled by global and local transcriptional regulators and post-transcriptional control. It is influenced by factors such as bacterial growth rate, culture medium composition, pH and temperature. Fimbrial expression could thus frequently become lost. Bacterial culture procedures favouring fimbrial expression are thus needed. The

1 Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey, Cuba. ana.campal@cigb.edu.cu

2 Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Camagüey, Cuba. guillermo.barreto@reduc.edu.cu

fimbriated bacterial population was therefore enriched by static culture in Mueller–Hinton broth. Fimbrial expression was then maintained by making it grow consecutively in agar CFA and Minca or minimal broth according to the fimbrial serotype. Maximum fimbrial expression was reached after 4h or 5h in culture. The fimbriae were extracted by heat -shock treatment and precipitated with 40% ammonium sulphate. Further purification was carried out by molecular exclusion and sodium deoxycholate treatment. This methodology integrates known procedures in a simple and reproducible process for obtaining F4, F5, F6 and F41 fimbriae in sufficient quantities for their subsequent use in producing antibodies, immunoassays and other studies (at laboratory level) requiring high-purity preparations (80%) to maintain their native structure.

Key words: Enterotoxigenic *Escherichia coli*, fimbriae, Minca, minimal medium, CFA.

Recibido: febrero 28 de 2008

Aprobado: mayo 8 de 2008

Introducción

Las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas (ECET), de origen porcino, expresan fimbrias de los tipos F4 (K88), F5 (K99), F6 (987p), F41 y F18 que posibilitan la adhesión a receptores intestinales del hospedero (DeRoy y Maddox, 2001), paso imprescindible para la ulterior liberación de enterotoxinas causantes de colibacilosis en animales neonatos, y al destete (Bertschinger et ál., 1999) en explotaciones porcinas de todo el mundo (Ngeleka et ál., 2003). La naturaleza proteica de estas fimbrias, sus características poliméricas y elevada talla han posibilitado su diferenciación serológica y el que se les prefiera en las estrategias para el diseño de vacunas y sistemas de diagnóstico rápido (Francis, 2002).

Sin embargo, la biosíntesis fimbrial implica un complejo proceso controlado, entre otros, por los reguladores globales y locales de la transcripción, y los controles postranscripcionales (Verdonck et ál., 2004a). Además, está influenciada por las fases de crecimiento (Van der Woude et ál., 1990a), la composición del medio de cultivo (Girardeau et al., 1982a; 1982b), la temperatura (Van der Woude et ál., 1990b), el pH y la osmolaridad (Schwan et ál., 2002). Como si lo descrito no fuera suficiente, estos factores también inciden en la variación de fase, fenómeno que provoca el “encendido”

y “apagado” de la expresión fimbrial en cepas de ECET F6⁺ y Tipo I⁺ de origen natural (Honnarvar et ál., 2003). En consecuencia, la fimbriación en cepas de ECET es inestable y sus niveles son heterogéneos.

Existen diversos procedimientos para la obtención de fimbrias a partir de ECET, a pequeña y gran escala (Jacobs y De Graaf, 1985; De Graaf y Roorda, 1986; Vázquez et ál., 1996; 2006). Los mismos, al aplicarse a tipos fimbriales particulares, difieren en cuanto a medios de cultivo utilizados y métodos de extracción, clarificación y purificación de dichas fimbrias. El presente trabajo propone un procedimiento general para el cultivo de ECET (F4⁺, F5⁺, F6⁺ y F41⁺) que propicia la expresión fimbrial en cantidades suficientes para su purificación y ulterior utilización en la generación de anticuerpos y el desarrollo de inmunoensayos.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

En los experimentos se utilizaron las cepas de ECET: G7(O8:K87, K88ab) y B44 (O9:K30, K99, F41:H-) (donadas por el doctor Antonio Talavera Coronel del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Censa, Cuba), y K88ac (O149:K91, K88ac), 431 (O101:K30, K99:

MN), MO5 (O101:K30:F41), MO6 (O101:K30: F41), 637 (O101:K89:F41), 987p-2 (O9:K103) y 987p-1, (donadas por el doctor Jorge Blanco Álvarez, del Laboratorio de Referencia de *E. coli*, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, España). Las cepas se conservaron a 4 °C, en medio semisólido (Blanco et ál., 1993).

Anticuerpos policlonales (AcP)

Los anticuerpos se obtuvieron mediante la inmunización subcutánea de conejos New Zealand White, y carneros, machos (Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio, Cenpalab, La Habana, Cuba) con 100 µg y 500 µg, respectivamente, de las fimbrias F4ab, F5, F6 y F41 purificados, según el caso. Los animales se inmunizaron cuatro veces, en intervalos de quince días. En la primera inmunización se empleó adyuvante completo de Freund (Sigma, USA), y en las restantes, incompleto (Sigma, USA). La presencia de anticuerpos inespecíficos en los sueros hiperinmunes se eliminó según el método de Vázquez et ál. (1996). Los anticuerpos obtenidos en conejos se purificaron por afinidad a través de Proteína A – Sepharosa CL-4B - CNBr (Amersham – Pharmacia, UK), según el procedimiento de Ey et ál. (1978). Mientras que antisueros ovinos se purificaron por intercambio iónico con DEAE – Sephacel (Amersham – Pharmacia, UK), con tampón 0,1 mol/L de Tris – HCL pH 8 / 150 mmol/L de NaCl.

Establecimiento de las condiciones de cultivo

Enriquecimiento de la expresión fimbrial

Las cepas se cultivaron en paralelo: a) en tubos con caldo Minca (Guineé et ál., 1976), durante 18 h a 37 °C, con agitación; b) de forma estática en caldo Mueller-Hinton (CMH) (Oxoid, UK) a 37 °C durante 5 días (Blanco et ál., 1993). A partir de los mismos se realizaron siembras en placas de agar Minca que se incu-

baron durante 18 horas a 37 °C. Las colonias obtenidas se resuspendieron en 5 mL de tampón de extracción (tampón fosfato 50 mmol/L con 2 mol/L de urea, pH 7,2) que se calentaron a 60 °C por 20 minutos para extraer las fimbrias (Korhonen et ál., 1980). Los extractos se analizaron en Elisa de captura para cuantificar las fimbrias. Para cada tipo fimbrial se utilizaron dos cepas. El experimento se realizó con tres réplicas.

Mantenimiento de la fimbriación mediante cultivos con agar

Las cepas se inocularon en agar Minca (Guineé et ál., 1976) o CFA (Evans et ál., 1977), durante 18 h a 37 °C. Para estimar los niveles de expresión fimbrial se tomaron tres colonias bacterianas bien definidas, a partir de las mismas se realizaron diluciones en base 10, en PBS, y se analizaron por Elisa. Para cada tipo fimbrial se utilizaron dos cepas. El experimento se realizó con tres réplicas.

Escalado del cultivo de las cepas de ECET en zaranda

A partir de los crecimientos correspondientes en agar CFA, se inocularon colonias a los medios Minca y medio mínimo hasta una densidad óptica (DO) de 0,02 de la siguiente forma: cepas F4⁺ y F41⁺ en Minca suplementado con 10 g/L y 1 g/L, respectivamente, de extracto de levadura, y las cepas F6⁺ y F5⁺ en medio mínimo (Van der Woude et ál., 1990b), con 2 g/L y 1 g/L, respectivamente, de glucosa. Todas se cultivaron durante 6-8 h a 37 °C con agitación continua a 250 rpm en una zaranda termostataada (New Brunswick, USA). Cada hora se midió la DO de los cultivos a 530 nm en un espectrofotómetro (Amersham - Pharmacia, UK). La expresión fimbrial se detectó mediante aglutinación con los AcP anti – fimbrias. Para estimar la intensidad de la aglutinación se tomó como criterio la inspección visual: 0 – no aglutinación; 0,5 – dudosa; 1 – fina (a los 3 minutos); 2 – fina (a los 2 minutos); 3 –intensa (a los 2 minutos) y 4 – intensa, casi

instantánea. Al tiempo de mayor expresión se colectaron 3 mL del cultivo y se extrajeron las fimbrias. Se realizaron tres ensayos separados. Para cada tipo fimbrial se utilizaron dos cepas.

Extracción y purificación de las fimbrias

Los cultivos bacterianos se centrifugaron a 4.000 rpm por 30 minutos. Los sedimentos se resuspendieron en el tampón de extracción a una absorbancia de 60/DO. Todas las fimbrias, excepto la F6, se extrajeron por tratamiento térmico a 60 °C, durante 20 minutos, en tampón de extracción (Vázquez et ál., 1996). Las fimbrias F6 se extrajeron de igual forma, dos veces, en tampón Tris-HCL 10 mmol/L/ 0,9% de NaCl, pH 7,5, lo que modifica el procedimiento descrito por Choi y Schifferli (2001). Los extractos se centrifugaron a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. Las fimbrias presentes en el sobrenadante se precipitaron con sulfato de amonio al 40% (p/v), durante 8 horas, a 4 °C. El material se centrifugó 30 minutos a 10.000 rpm. El sedimento se resuspendió y dializó en tampón fosfato 50 mmol/L, pH 7,4. Las fimbrias se purificaron por cromatografía de exclusión molecular en Sephacryl S-1000 (Amersham – Pharmacia, UK). Las fracciones eluidas se dializaron en tampón fosfato 5 mmol/L con 0,5% (p/v) de deoxicolato de sodio durante 72 horas, y se centrifugaron a 10.000 rpm 30 minutos (Korhonen et ál., 1980). El sobrenadante se dializó contra tampón fosfato 5 mmol/L para eliminar el deoxicolato residual.

Métodos de análisis

La cuantificación de las fimbrias se realizó mediante Elisa. Para ello, las placas de microtitulación (Nunc, Maxisorp, Denmarck) se recubrieron con 5 µg/mL de los AcP de carnero anti-fimbria correspondientes, diluido en tampón carbonato/bicarbonato de sodio 0,05 mmol/L, pH 9,6, y se incubaron 3 horas a 37 °C. A continuación se adicionaron los extractos y las fimbrias purificadas. Estas últimas en diluciones

seriadas de base 5 en tampón fosfato salino (PBS)/0,5% (p/v) de leche descremada (Oxoid, UK). Las muestras controles se adicionaron en concentraciones desde 160 ng/mL – 1,25 ng/mL. Luego de 3 horas a 37 °C, a cada placa se adicionó el AcP anti-fimbria correspondiente, obtenido en conejo y marcado con peroxidasa. Transcurrida 1 hora, a 37 °C, se añadió el sustrato cromogénico (ortofenilendiamina (OPD), 4,62 mmol/L; H₂O₂, 5,56 mmol/L; Na₂HPO₄ 0,05 mol/L y ácido cítrico 0,02 mol, pH 5). Entre cada paso las placas se lavaron cinco veces con PBS/0,05% (v/v) de Tween – 20 (Merck, Alemania). La DO se midió a 492 nm en un lector de placas Multiskan Titertek MC 340 nm-492 nm. Los datos se analizaron por el software Elisa III (CIGB Camagüey).

La concentración de proteínas totales se estimó acorde a lo propuesto por Lowry et ál., (1951). La pureza de las preparaciones se estableció por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5%, con presencia de dodecilo sulfato de sodio (SDS – PAGE) (Laemmli, 1970).

Procesamiento estadístico

Para el procesamiento estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS 11.5 para Windows. La normalidad de los datos se estimó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov, previo a la realización del análisis de varianza. La homogeneidad de las varianzas se estableció por prueba de Duncan (1955).

Resultados

Las cepas crecidas en CMH mostraron una mayor concentración fimbrial promedio que las cultivadas en medio Minca; efecto que es independiente del tipo fimbrial (tabla 1). Cuando se colectó el halo bacteriano que creció en la superficie del caldo y se inoculó en los medios agarizados, se obtuvieron colonias de tamaño homogéneo.

Solo las cepas F5⁺, cultivadas en agar CFA, presentaron valores de absorbancia superiores a los obtenidos a partir de agar Minca (tabla.2).

Tabla 1. Influencia del caldo Mueller-Hinton y el caldo Minca en la expresión fimbrial de cepas de ECET mantenidas en conservación. Los datos corresponden a tres experimentos con al menos dos cepas diferentes que expresan el mismo tipo fimbrial.

| Medio | Promedio concentración fimbria (mg/L) | Fimbria | Promedio concentración fimbria promedio (mg/L)* (ambos medios) |
|----------------|---------------------------------------|---------------|--|
| Mueller-Hinton | 4,140 | F4 | 3,266 ^{a,b} |
| Minca | 1,924 | F5 | 2,495 ^{a,b} |
| | | F6 | 1,572 ^b |
| | | F41 | 4,029 ^a |
| ES | ± 0,3368 | ES | ±0,3368 |
| Significación | p< 0,05 | Significación | p< 0,05 |
| CV | 76,8% | CV | 76,9% |

* Letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan, 1955).

Tabla 2. Efecto sobre el mantenimiento de la expresión fimbrial del cultivo en agar Minca y en agar CFA. Los datos corresponden a tres experimentos con al menos dos cepas diferentes que expresan el mismo tipo fimbrial.

| Fimbrias | Agar Minca | Agar CFA |
|---------------|---|---|
| | Promedio absorbancia (muestras no diluidas) | Promedio absorbancia (muestras no diluidas) |
| F4 | 3,512 ^c | 3,974 ^c |
| F5 | 1,350 ^a | 2,091 ^b |
| F6 | 3,406 ^c | 3,581 ^c |
| F41 | 1,293 ^a | 0,7518 ^a |
| ± ES | 0,1894 | 0,1894 |
| Significación | P < 0,05 | P < 0,05 |

* Letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan, 1955).

Para las restantes, el tipo de medio no influyó significativamente en su expresión fimbrial.

El estudio sobre la relación existente entre la cinética del crecimiento bacteriano y la expresión fimbrial (figuras 1A - 1C) puso de manifiesto que, excepto en el caso de la cepa 987p-2, donde se observó una aglutinación fina luego de transcurridas 3 horas de cultivo (figura 1D), en todos los restantes casos la moda mostró que la máxima expresión fimbrial estuvo entre las 4 y 5 horas de cultivo,

previo al comienzo de la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, momento en el que se inicia el descenso de la expresión fimbrial (figura 1).

Los extractos obtenidos en el momento óptimo de expresión fimbrial mostraron una alta reactividad, hasta 1/10.000, frente a los antisueros específicos. En la dilución 1/1000 se observaron diferencias significativas, siendo mayor la inmunorreactividad para F4 y menor para F6 (figura 2).

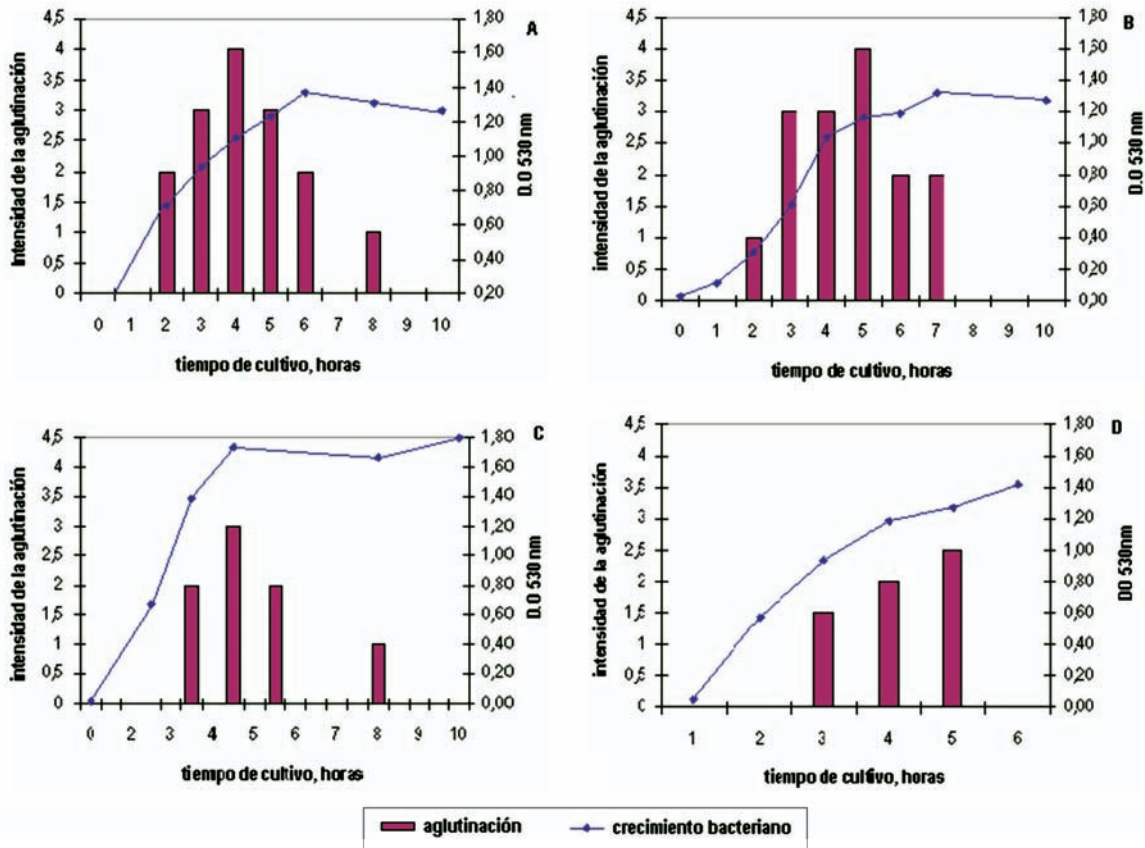


Figura 1. Relación entre la cinética del crecimiento bacteriano leída a 530 nm e intensidad de la aglutinación observada al hacer reaccionar células del cultivo con anticuerpos policlonales anti-fimbrias obtenidos en conejo. A. Cepa G7; F4ab +. B. Cepa B44; F5 +. C. Cepa MO5; F41+. D. Cepa 987p-2; 987p+.

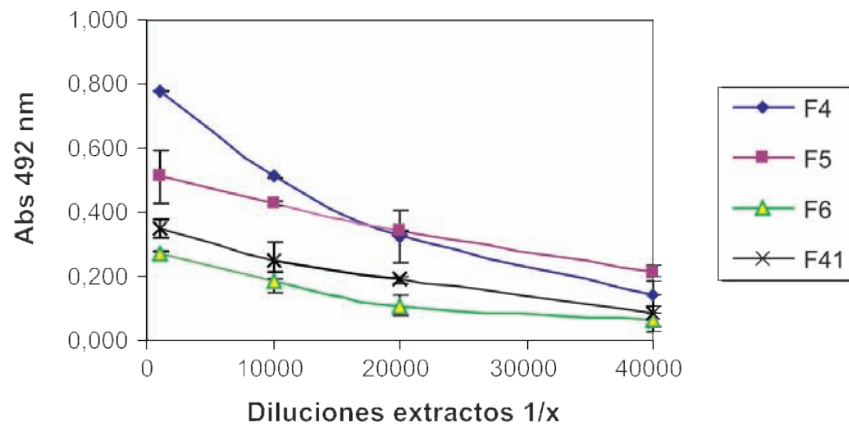


Figura 2. Inmunorreactividad de extractos obtenidos al momento de la mayor expresión de las fimbrias.

Las fimbrias, extraídas y precipitadas con sulfato de amonio, poseían entre el 30 y el 40% de pureza (figura 3 A-1). Entre sus principales contaminantes había: componentes de la pared celular y de la membrana externa bacteriana que, en su mayoría, se eliminaron mediante cromatografía de exclusión molecular, y tratamiento de las fracciones con deoxicolato de sodio. Ambos pasos posibilitaron los altos porcentajes de pureza finales, superiores a los 80% (figuras 3A-2, 3B y 3C).

Luego de la extracción y purificación se obtuvieron entre 3-13 mg de fimbrias por litro de cultivo, en dependencia de la cepa. Los menores rendimientos se obtuvieron con la cepa 987P-2 (3,5 mg/L) y los mayores con la cepa G7 (13 mg/L), que en su totalidad se pueden considerar satisfactorios por tratarse de cepas de origen natural.

Discusión

La obtención de las fimbrias procedentes de cepas naturales de ECET de origen porcino, a escala de laboratorio, presenta problemas asociados con la pobre expresión, los bajos re-

cobrados y el insuficiente equipamiento para realizar escalados. El mantenimiento de la expresión fimbrial constituye el punto más crítico en el proceso de cultivo de las cepas de ECET, sobre todo las que han sido sometidas a pases sucesivos en el laboratorio (Sjöling et ál., 2007). Diversos autores sugieren el cultivo directo de las cepas procedentes de medios de conservación o aislamientos en agar Minca (Guineé et ál., 1976); en Agar suplementado con sangre ovina (5%) (Osek, 1999), o en medios líquidos como el caldo Minca (Guineé et ál., 1976) o el Soya – Triptona (Verdonck et ál., 2004b), con agitación. Sin embargo, cuando se emplearon estas condiciones para cepas conservadas por largos periodos de tiempo su expresión fimbrial resultó pobre e inestable debido a la coexistencia de poblaciones fimbriadas y afimbriadas.

El CMH es un medio que posee factores que estimulan una eficiente multiplicación bacteriana (Gould et ál., 1944), y el mantenimiento de la fimbriación (Vázquez et ál., 1996). A la fimbriación también contribuye el cultivo estático y sin aireación de las cepas de ECET (Gally et ál., 1993). Ambas condiciones de cultivo de conjunto con la alta hidrofobicidad de las

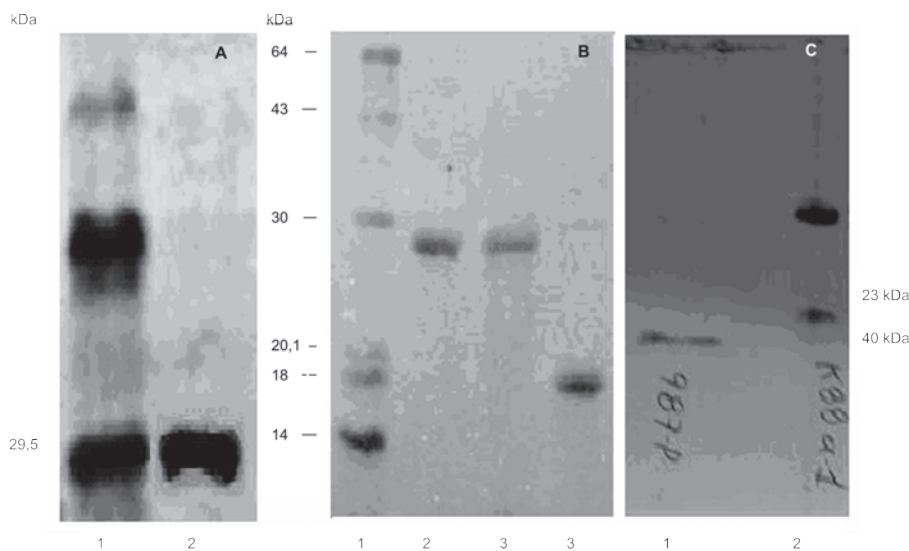


Figura 3. Electroforesis de las fimbrias. A-1. Extracto F41 (30% de pureza); A-2. Fimbria F41 purificada y tratada con deoxicolato de sodio (80% de pureza, producto final); B y C. Electroforesis producto final; B-1. Marcador de peso molecular. B-2 Fimbria F4ab; B-3. Fimbria F4ac; B-4. Fimbria F5; C-1. Fimbria F6; C-2. Anticuerpo monoclonal IgG utilizado como marcador de peso molecular.

fimbrias (Brinton, 1965), facilitan la obtención de poblaciones de ECET con alta fimbriación que flotan en la superficie del CMH formando un halo de fácil colecta. Por tanto, se asegura la selección de poblaciones fimbriadas antes de emprender los pasos posteriores de cultivo. Los resultados experimentales indican que el cultivo en CMH también contribuye a disminuir, en las cepas F6+, el efecto negativo del fenómeno de variación de fase.

En ocasiones, el cultivo estático en CMH es insuficiente para garantizar el mantenimiento de la expresión de F6. En esos casos, Schifferli et ál. (1987), recomiendan un paso adicional por agar Sangre (5% de sangre de chivo). Esta variante tiene la ventaja de que posibilita la selección de las colonias de ECET F6+ por su morfología y color grisáceo característico (Brinton, 1965).

Luego del paso por CMH, el cultivo de las bacterias en agar CFA contribuye a mantener una alta expresión fimbrial en las cepas de ECET ensayadas, fundamentalmente en las F5+. Aunque las causas de este fenómeno se deben determinar, varios autores proponen que la presencia de glucosa en los medios de cultivo provoca la represión catabólica de la expresión de la fimbria K99 en algunas cepas de ECET F5+ (Girardeau et ál., 1982b; Isaacson et ál., 1983). Los factores que determinan una respuesta diferenciada a la glucosa entre las cepas no están identificados. Aunque no aparece en la tabla 2, la expresión fimbrial de la cepa B44, disminuyó en el medio Minca, mientras que con la cepa 637 esto no sucedió.

En sentido general, la composición de los medios de cultivo, el pH y las condiciones de crecimiento son determinantes para la expresión de las fimbrias. Se conoce que el medio mínimo es superior al Minca para favorecer la expresión de F5 (Van der Woude et ál., 1990a), pero su utilidad para el cultivo y mantenimiento de la expresión fimbrial en cepas F6+ se reporta por vez primera. En éstas, es posible que el mantenimiento de valores de pH cercanos al fisiológico durante el cultivo, los bajos conte-

nidos de aminoácidos y de carbohidratos, y la presencia de iones de amonio sean importantes para asegurar el crecimiento bacteriano y la expresión fimbrial.

La cinética de expresión de las fimbrias F4, F5, F41 y F6, se comportó como describieron Jacobs y De Graaf (1985), quienes determinaron que la biosíntesis de las mismas depende de la fase del crecimiento bacteriano, que se incrementa durante la fase exponencial del cultivo, y alcanza el máximo al final de la misma. Posterior a ello, la expresión fimbrial decrece de forma continua. Este fenómeno se acentúa en los cultivos en zaranda como consecuencia del decrecimiento del pH del medio propiciado por los productos del metabolismo bacteriano y por el agotamiento de los nutrientes al transcurrir el tiempo del cultivo. En el caso de la cepa 987P-2, la expresión de la F6 se detectó más tarde que en el resto de las fimbrias, debido quizás a la existencia de poblaciones afimbriadas como resultado de la variación de fase.

Para extraer a las fimbrias de las células bacterianas se han sugerido métodos como la agitación mecánica (Korhonen et ál., 1980), la sonicación (Clements y Filkenstein, 1979) y el tratamiento térmico (Vázquez et ál., 1996; 2006). En el trabajo se comprobó que con el último se obtienen fimbrias que poseen una alta inmunorreactividad frente a anticuerpos policlonales específicos, indicativas de la presencia de un elevado número de fimbrias que mantienen su estructura nativa. En el caso de la F6 el uso de otro tampón, y la necesidad de repetir el paso de extracción, podrían ser consecuencia de la existencia de fuertes interacciones entre las subunidades fímbricas y la proteína de la membrana externa FasD, que dificultan su extracción de la célula. Esta característica, unida a la variación de fase, da lugar a una concentración final de la fimbria por litro de medio cultivo inferior al resto de las cepas.

La precipitación y purificación de las fimbrias se realizaron por los procedimientos conocidos (De Graaf y Roorda, 1982; Jacobs y

De Graaf, 1985; Vázquez et ál., 1996; 2006), pero se incluyó el tratamiento con deoxicolato de sodio, el que se ha empleado previamente en la purificación de las fimbrias P de *Escherichia coli* uropatogénica por Korhonen et ál. (1980), pero nunca para las fimbrias F4, F5, F6 y F41. Con este paso se desagregan las interacciones entre fimbrias, y de éstas con las vesículas de membrana. Las últimas se insolubilizan y se pueden eliminar con facilidad mediante la centrifugación de las preparaciones (Korhonen et ál., 1980). Ello permite obtener fimbrias con alta pureza. Los rendimientos finales obtenidos entre 3-13 mg/L, son satisfactorios al tratarse de cepas naturales.

En resumen, la metodología establecida, a partir de procedimientos conocidos, es simple y reproducible para la obtención a baja escala de las fimbrias expresadas por cepas de ECET. La misma se basa en la selección de medios y tiempos de cultivo para elevar las poblaciones de células fimbriadas en las preparaciones. Así como en la utilización de los métodos de extracción y purificación que garantizan un recobrado adecuado de las fimbrias purificadas. El procedimiento es apropiado para el uso en laboratorios donde se realicen estudios con fimbrias y se requiera la obtención rápida de preparaciones con elevada pureza.

Referencias bibliográficas

- Bertschinger, H. E.; Fairbrother, M. 1999. *Escherichia coli* infections. In: Straw, B. E., D' Allafre, B.; Mengeling, W. L.; Taylor, D.J. (editors). Diseases of swine. 8 edition. Iowa: Iowa State University Press. p. 131-134.
- Blanco, J.; Blanco, M.; Wong, I.; Blanco, J. 1993. Haemolytic *Escherichia coli* strains isolated from stools of healthy cats produce cytotoxic necrotizing factor type 1 (CFN1). *Vet. Microbiol.*, 38: 157-165.
- Brinton, C. C. 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria, *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 27: 1003-1054.
- Choi, B-K.; Schifferli, D. M. 2001. Characterization of FasG segments required for 987p fimbria – mediated binding to piglet glycoprotein receptors. *Infect. Immun.* 69 (11): 6625-6632.
- Clemens, J. D.; Filkenstein, R. A. 1979. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 24: 760-769.
- DeRoy, C.; Maddox, C. W. 2001. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. Conference of Research workers in Animal Diseases. *Animal Health Research Reviews.* 2: 129-140.
- De Graaf, F. K.; Roorda, I. 1982. Production, Purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infect. Immun.* 36 (5): 752-758.
- Duncan, D. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.* 11 (1): 1-42.
- Evans, D. G.; Evans, D. J.; Tjoa, W. 1977. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: Correlation with colonization factor. *Infect Immun.* 18 (2): 330-337.
- Ey, P. L.; Prowse, S. J.; Jenkin, C. R. 1978. Isolation of pure IgG1, IgG2a, and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A – Sepharose. *Biochemistry.* 15: 429-436.
- Francis, D. H. 2002. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. *Swine Health Prod.* 10 (4): 171-175.
- Gally, D. L.; Bogan, J. A.; Eisenstein, B. I.; Blomfield, I. C. 1993. Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol.* 175 (19): 6186-6193.
- Girardeau, J. P.; Dubourguier, H. C.; Gouet, P. 1982a. Inhibition of K99 synthesis by L – alanine in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 463-470.
- Girardeau, J. P.; Dubourguier, H. C.; Gouet, P. 1982b. Effect of the glucose and amino acids on expression of K99 antigen in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2243-2249.
- Gould, G.; Lewia W. K.; Mueller, J. H. 1944. On the growth requirements of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 47 (3): 287-292.
- Guineé, P. A. M.; Jansen, W. H.; Agterberg, C. M. 1976. Detection of the K99 antigen by means of agglutination and immunoelectrophoresis in *Escherichia coli* isolates from calves and its correlation with enterotoxigenicity. *Infect. Immun.* 13 (6): 1369-1377.

- Honarvar, S.; Choi, B.-K.; Schifferli, D. M. 2003. Phase variation of the 987P-like CS18 fimbriae of human enterotoxigenic *Escherichia coli* is regulated by site-specific recombinases. *Mol. Microbiol.* 48 (1): 157-171.
- Isaacson, R. E. 1983. Regulation of expression of *Escherichia coli* pilus K99. *Infect. Immun.* 40: 633-639.
- Jacobs, A. A. C.; De Graaf, F. K. 1985. Production of K88, K99 and F41 fibrillae in relation to growth phase and rapid procedure for adhesion purification. *FEMS Microbiol. Lett.* 26 (1): 15.
- Korhonen, T. K.; Nurmiäho, E.-L.; Ranta, H.; Svanborg Edén, C. 1980. New method for isolation of immunologically pure pili from *Escherichia coli*. *Infection and Immunity.* 27 (2): 569-575.
- Laemmli, E. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lowry, O. H.; N. J. Rosebrough, A. L.; Farr, A. I.; Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Ngeleka, M.; Pritchard, J.; Appleyard, G.; Middleton, D. M.; Fairbrother, J. M. 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA – I / Stb, rather than EAST-1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15: 242-252.
- Osek, J. 1999. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet. Microbiol.* 68: 209-217.
- Rippinger, P.; Bertschinger, H. U.; Imberechts, H. 1995. Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhea and from oedema disease. *Vet. Microbiol.* 45: 281-295.
- Schifferli, D. M., Abraham, S. N.; Beachey, E. H. 1987. Use of monoclonal antibodies to probe subunit and polymer – specific epitopes of 987p fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 55: 923-930.
- Schwan, W. R.; Lee, J. L.; Lenard, F. A.; Matthews, B. T.; Beck, M. T. 2002. Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 20: 559-566.
- Sjöling, A.; Wiklund, G.; Savarino, S. J.; Cohen, D. I.; A. M. Svennerholm. 2007. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. *J. Clin. Microbiol.* 45 (10): 3295-3301.
- Van der Woude, M. W.; Arts, P. A.; Bakker, D.; Van Verseveld, H. W.; De Graaf, F. K. 1990a. Growth rate dependent synthesis of K99 fimbrial subunits is regulated at the level of transcription. *J. Gen. Microbiol.* 136: 897-903.
- Van der Woude, M. W.; Braster, M.; Van Verseveld, H. W.; De Graaf, F. K. 1990b. Control of temperature dependent synthesis of K99 fimbriae. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 183-188.
- Vázquez, F.; González, E. A.; Garabal, J. I.; Blanco, J. 1996. Fimbriae extract from enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of bovine and porcine origin with K99 and/or F41 antigens. *Vet. Microbiol.* 48: 231-241.
- Vázquez, F.; González, E. A.; Garabal, J. I.; Blanco, J. 2006. Characterization of fimbriae extracts from porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* strains carrying F6 (987P) antigen. *International Microbiology.* 9: 241-246.
- Verdonck, F.; Cox, E.; Goddeeris, B. M. 2004a. F4 fimbriae expressed by porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*, an example of an eccentric fimbrial system? *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7: 155-169.
- Verdonck, F.; Cox, E.; Schepers, E.; Imberechts, H.; Joensuu, J.; Goddeeris, B. M. 2004b. Conserved regions in the sequence of the F4 (K88) fimbrial adhesion FaeG suggest a donor strand mechanism in F4 assembly. *Vet. Microbiol.* 102: 215-225.