

Epítomos continuos y comunes presentes en las fimbrias de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

Yolanda López-Vidal*

Resumen

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es un agente causal de diarrea. ETEC cuenta con factores antigénicos de colonización (CFAs y PCFs), que son importantes en la virulencia. Los anticuerpos contra los CFAs son producidos al término de la infección por ETEC y han mostrado ser protectores contra la enfermedad. Sin embargo, los epítomos en CFA/I, los cuales inducen protección, no han sido caracterizados. El objetivo de este estudio es la detección de los epítomos continuos y comunes en CFM de ETEC, a nivel molecular, que conduzcan al desarrollo de métodos para la prevención de la enfermedad causada por ETEC. Se sintetizaron octapéptidos continuos unidos a fase sólida que comprendían a toda la secuencia de CFA/I por el método de Geysen para el escrutinio, con sueros de niños infectados por ETEC, con sueros de adultos de zona endémica y no endémica con el anticuerpo monoclonal CFA/I 1.6 (Mab CFA/1.1.6) y con los sueros hiperinmunes contra CFAs y PCFs diferentes a CFA/I. Los sueros de los niños, de los adultos de zona endémica y los sueros hiperinmunes reconocieron tres epítomos continuos y comunes en CFM. El Mab CFA/1.6 no reconoció ningún epítomo continuo.

Palabras clave: *Escherichia coli* enterotoxigénica, ETEC, factores antigénicos de colonización, CFA, PCF, enterotoxinas, termolábil, LT, termoestable, ST epítomo, adherencia, anticuerpo.

Summary

Colonization factor antigens (CFAs and PCFs) are important virulence factors of *Escherichia coli* (ETEC) diarrhea. Antibodies to CFAs produced after ETEC infection are protective, however, the CFA epitopes which induce protective antibodies have not yet been characterized. This study is the characterization of the immune response to CFAs at molecular level and identification of the epitopes associated with inhibition of cell-adherence and protection that will lead to the development of methods to prevent ETEC infection and disease. The aim of this study was the characterization of the linear epitopes of CFA/I that react with sera from acute and convalescent phase of ETEC-infected children, with adult sera from endemic and non-endemic areas, with monoclonal antibodies (Mabs) and with hyperimmune antiserum to CFAs and PCFs different from CFA/I. Three linear and common epitopes were recognized among the CFA/I in child sera and adult sera from endemic areas and with hyperimmune sera against other known CFAs and putative ETEC colonization factors.

Key words: *Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC, colonization factor antigens, CFA, PCF, enterotoxins, heat-labile enterotoxins, LT, heat-stable enterotoxin, ST, linear epitope, antibodies.

* Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Correspondencia y solicitudes de sobres: Dra. Yolanda López Vidal, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C. P. 04500. Teléfono 623 2387. Fax 623 2381 y 6032416.

Introducción

La *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es una bacteria productora de enterotoxinas que infecta a humanos, cerdos y terneras. Las cepas de ETEC que son patógenas en los animales, generalmente no lo son en el humano. Un estudio ha demostrado que sólo el 25% de los voluntarios alimentado con una cepa virulenta de ETEC aislada de cerdo, se enfermó.¹ La diarrea producida por ETEC tiene una duración promedio de 3 a 7 días; su intensidad va de leve hasta síntomas parecidos a los del cólera, llevando a una severa deshidratación.² Otros síntomas de la enfermedad producidos por ETEC son: fiebre, náusea, dolor abdominal y en ocasiones vómitos.

Importancia de ETEC

La *Escherichia coli* enterotoxigénica es uno de los agentes etiológicos de diarrea de más importancia en niños menores de 5 años. Según estudios realizados en niños hospitalizados y de consulta externa en México, 16 al 83% de los episodios de diarrea aguda han sido asociados a ETEC. El pico estacional de esta infección es en el verano.³ Se calcula que en el mundo ocurren al año 650 millones de episodios de diarrea, cerca de 800 mil terminan en defunciones.⁴ La diarrea por ETEC es menos frecuente en países industrializados. Se estima que entre del 30 al 50% de las diarreas del turista que viaja a países endémicos (en vías de desarrollo) son causadas por ETEC. La mayor proporción de diarreas por este microorganismo se presentan en América latina y la menor es en Asia.⁵

Producción de enterotoxinas

Se ha postulado que ETEC causa enfermedad mediante la colonización del intestino delgado, seguida por la producción de una enterotoxina estable al calor (ST) y/o la producción de la enterotoxina lábil al calor (LT).⁶ En México hemos demostrado que un número igual de cepas de ETEC pertenecen a los siguientes perfiles toxigénicos LT+/TS+, LT-/ST y LT+/ST-.³

Función de las fimbrias (también referido como CFA)

Los determinantes antigénicos de los factores de colonización en el humano (o fimbrias) de ETEC, varían en su estructura; por ejemplo, CFNI es una sola subunidad proteica homóloga de antígeno fimbrial, mientras que CFNII y CFNIV están formados por más de un componente antigénico; estos componentes son denominados componentes de superficie estructurales, referidos como factores CS. Las nomenclaturas de los factores CFAs y CS no son síntomas, como se mencionará adelante. Las cepas de ETEC que expresan CFNII, generalmente lo hacen con CS1 o CS2, en combinación con CS3 o CS3 sólo.^{7,8} En los aislamientos de CFA/IV se expresa ya sea CS4 o CS5 junto con el antígeno fimbriado CS6. Existe un número pequeño de cepas de ETEC que sólo expresan CS2, CS5 o CS6.⁹ Los factores de colonización como el PCF09, corresponden a estructuras fibrilares más delgadas, las cuales tienden a agregarse formando grandes masas que se pueden observar con el microscopio electrónico¹⁰ (Cuadro I).

Los genes estructurales de los factores de colonización están generalmente localizados en plásmidos, con excepción de CS1 y CS2 de CFNII, los cuales se encuentran en el cromosoma.^{8, 11} Las expresiones de CS1, CS2 de CFNII, CFNI, CS4 de CFNIV, PCFO166¹² y el antígeno 2230, requieren de la presencia de los genes reguladores los cuales se encuentran en estos plásmidos de alto peso molecular.¹³

En la mayoría de las cepas de ETEC, la adherencia a la mucosa intestinal está mediada por las fimbrias de la bacteria, que a su vez actúan como antígenos de adherencia o adhesinas. La colonización del intestino delgado es un requisito indispensable para que ETEC pueda causar diarrea. Es por ello que las fimbrias son un factor de virulencia importante en ETEC para la patogénesis de la enfermedad.

Frecuencia e importancia de los factores de colonización

Los factores de colonización más frecuentes identificados en los turistas que viajan a México son

CFNI (22%), seguido por CFNIV (18%).³ Otros CFAs encontrados en niños son CFA/II,^{8,11} CFA/III,¹⁴ los factores putativos de colonización PCF0166,¹² PCF0159:H4¹⁵ y el antígeno 2230;¹³ los antígenos de superficie CS7,¹⁶ CS17,¹⁷ PCF09¹⁰ y el antígeno 8786.¹⁸ Estos cuatro últimos están asociados con otro 25% de los episodios de diarrea. Los CFAs asociados con el 35% restante de los episodios de diarrea son aún desconocidos. Svennerholm y col.¹⁹ demostraron que los factores putativos de colonización CS7, PCF09 y CS17 son capaces de promover la colonización en el intestino delgado de conejo, mediante el modelo de RITARD. Los CFAs I, II, III, IV, PCF0166 y el antígeno 2230, han sido detectados tanto en la población infantil como en los turistas.³ En general podríamos concluir que, tanto los factores de colonización como la producción de las enterotoxinas, son características de virulencia importantes en ETEC, que se asocian a la evocación de la respuesta inmune del individuo, al estar expuestos los diversos fenotipos de ETEC.

Unión específica de los CFAs y los componentes de superficie CS

Se ha postulado que el CFNI es capaz de unirse al ácido siálico, tanto en su forma libre²⁰ como unido a glicoproteínas^{21, 22} y al gangliósido GM2.^{23, 24} Wadstrom y col.²⁵ reportan que el antígeno CS2 se une específicamente al ácido N-glicolil-neuramínico. También los componentes CS de CFNII y el CS4 de CFNIV, se unen al GM1-asialo en cromatografía de capa fina.²⁶ Nessery col.²⁷ sugieren que la interacción de CS3 es con determinantes de carbohidrato presentes en las moléculas de polilactosaminoglicanos derivados del meconio huma-

En la actualidad se conoce que CS3 de CFNII se une a GM2, asialo GM1, y que la unión es específicamente inhibida por Galβ-4Gal, presente en los glicoconjugados. Es posible que los grupos de CFAs se unan al mismo receptor de las células epiteliales intestinales. Los CFAs de las cepas de ETEC de los humanos sólo reconocen glicoconjugados en la superficie de las células epiteliales. Tanto glicopéptidos como glicoproteínas han sido identificadas como sitio de unión de CFNI y CFA/II.²⁸

De la misma manera, se ha observado que CS1, CS2 y CS3 de CFNII, así como CFNI, se unen a una banda de 30-35 kDa con una identidad de glicolípido y/o glicoproteína. Sin embargo, en los ensayos de adhesión *in vitro* usando biopsias intestinales de humanos o células parecidas a los enterocitos Caco-2, se ha demostrado la unión de ETEC sólo en el borde de cepillo de estas células a -. Además, la inhibición de la adherencia utilizando factores de colonización purificados sugieren que receptores similares están involucrados en cada factor de adhesión.²⁸ (Cuadros II y III).

Una manera de estudiar la colonización del intestino es midiendo la presencia de la bacteria en las heces. Tales estudios han sido llevados a cabo en voluntarios humanos²⁹ y en el modelo animal de conejo con nudo reversible (RITARD).³⁰ Este modelo permite además estudiar la capacidad de colonización y virulencia de las cepas de ETEC. En el modelo del RITARD, las cepas de *E. coli* no patógenas se mantienen en el intestino sólo son excretadas por dos días, hasta que se eliminan completamente. Las cepas de ETEC que colonizan el epitelio intestinal, están presentes en las

Cuadro I. Características de los factores de colonización, tamaño y morfoloía.

CFA	Morfología	diámetro	P M Subunidad
CFA/I	fimbria	Nd	15074 D
CS1	fibrilar	2-3nm	15246 D
CS2	fibrilar	7nm	15421 D
CS3, CS3A	fibrilar, flexible	2-3nm	15112 D & 15246 M
CFA/III	fimbria	7-8nm	25309 D
CS4	fimbria	6-7nm	14961 M
CS5	fibrilar, flexible	5-8nm	18617 D
CS1	fibrilar	2-3nm	15246 D
CS6	indeterminada	----	15058 D % 15877 D
CS7	fibrilar helicoidal	3.5-6.5nm	21500 P
CS17	fimbria	6-7nm	17500 P
PCF09	fibrilar flexible	~	27000 P
PCF020	fimbria	7nm	25000 P
PCF0148	fibrilar curva	3nm	~
PCF0159	fimbria	6-7nm	18600 P
PCF0166	fimbria	6-7nm	15500 P & 17000 P
2230	indeterminada	----	16000 P
8786	indeterminada	----	15349 D
LONGUS	fimbria	7nm	22000 P

* Determinación del peso molecular: D, calculado de la deducción de la secuencia de aminoácidos derivado de la secuencia de ADN; M, Determinado por espectrometría de masa

(~) P, estimado por SDS-PAGE

ND, no determinada

Indeterminada, detectada en la superficie, postulada a no ser fimbria ni fibrilar.

heces hasta 8 días después de que se ha efectuado la infección experimental.^{31, 32}

Cuadro II. Características de unión de los factores de colonización de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.		
PCF/CFA	Hemaglutinación ^a	Tejido/Linea celular ^b
CFNI	Hum A, Bov, Pollo	Ent. Hum. Caco-2
CS1	Bov.	Ent. Hum. Caco-2
CS2	Bov.	Ent. Hum.
CS3, CS3a	Bov.	Ent. Hum. HT-29
CFA/III	Negativa	Ent. Hum.
CS4	Bov, Hum A	Ent. Hum.
CS5	Hum A, Bov.	Ent. Hum.
CS6	Negativa	HeLa
CS7	Hum, Bov, Gg	Ent. Hum.
CS17	Bov	Ninguno
PCFO9	Hum Pollo	Ent. Hum. Epit. bucal
PCFO20	NO	Caco-2
PCFO148	negativa	Ent. Hum.
PCFO159	negativa	N. D.
PCFO166	Hum Bov.	Ent. Hum.
2230	negativa	Ent. Hum. Caco-2
8786	Hum Bov	Ent. Hum. Caco-2

^a Hemaglutinación resistente a manosas. Hum A: Humano A; Hum B: humano B; desconoce el grupo; Bov: Bovino.

^b Ent. Hum: enterocitos humanos; caco-2: carcinoma de colon; HeLa: carcinoma de laringe humano; Epit. bucal: epitelio bucal.

Cuadro III. Componentes celulares involucrados específicamente con los factores de colonización de ETEC.		
Fimbrias	Receptores	Referencias
CFA/I	Acido siálico	8
	Ac. siálico-glicoproteína	21
	Gangliósido GM2	22, 23, 24
CS2 de CFA/II	Ac. N-acetilneuramínico	25
CFA/II y CS4 de CFNIV	Asiáto-GM1	26
CS3 de CFA/II	Carboidratos en polilactato	
	samino glicano	27
CFA/II y II	Glicolípido o glicoproteína	28

Inmunogenicidad de los CFAs y otros antígenos superficiales de ETEC

La respuesta inmune de ETEC está dirigida principalmente contra los CFAs, los lipopolisacáridos y la toxina termolábil.^{3, 7, 33, 34} La toxina termoestable (ST) no es inmunogénica debido a su tamaño tan pequeño (19 aminoácidos). En un estudio realizado en Bangladesh, en adultos hospita-

lizados con diarrea por ETEC, se demostró que la respuesta inmune contra el CFA de la cepa infectante fue de dos tipos: sistémica y local;³⁵ el 63% de los pacientes presentaron anticuerpos IgA específica, medidos en lavados intestinales, 83% en leche materna, 70% en saliva y el 100% en suero. El 70% de los pacientes también tuvieron IgG. Existen indicios de que la infección por ETEC puede proteger contra la reinfección. Posiblemente, la evidencia más importante es la disminución en la proporción enfermedad-infección en relación con la edad, en las áreas endémicas de ETEC.^{3, 5, 37} Las alteraciones de las estructuras de la unión en el epitelio intestinal, no parecen ser importantes en las infecciones por ETEC en los humanos.⁷ La inmunidad protectora contra la enfermedad por ETEC, parece requerir de exposiciones múltiples con cepas diferentes. En las infecciones porcinas por ETEC, mediadas por las fimbrias K88 y P987, los cerdos adultos son resistentes a la enfermedad, debido a la alteración de los receptores a nivel de las células epiteliales de la mucosa intestinal.³⁶

Existen estudios llevados a cabo en humanos y en modelos animales, con el objetivo de definir si los factores de virulencia presentes en ETEC son importantes en la protección contra la enfermedad. Nosotros y otros autores hemos demostrado que la infección inicial con una cepa de ETEC que expresa los factores de colonización I, II o IV, protegen contra los serotipos heterólogos de una cepa que exprese el mismo CFA.^{31, 32, 38, 39} Resultados similares fueron obtenidos en humanos voluntarios.^{24, 34}

Vacuna contra ETEC

Hoy día no existe una vacuna contra ETEC en humanos. En contraste, sólo en los Estados Unidos, 32 vacunas de ETEC se registraron durante el año de 1992 y la mayoría se desarrollaron para aplicarse en ganado porcino y vacuno.³⁶ Todas las vacunas contra ETEC disponibles para porcinos están destinadas a para proteger las infecciones en los lechones mediante la inmunización pasiva al recibir una gran cantidad de anticuerpos maternos de porcinos previamente inmunizados con las fimbrias. Estos anticuerpos actúan bloqueando el suceso de la colonización por ETEC.⁴⁰ Desafortunadamente es poco claro si la vacunación es eficien-

te, ya que no hay estudios suficientes para valorar la eficacia protectora.³⁶

Los estudios con vacunas han sido capaces de provocar la inmunidad antitoxina, pero ésta no es suficiente para proteger contra la enfermedad ocasionada por ETEC.⁷ Diversos grupos han tratado de desarrollar formas inmunógenas contra la ST para los humanos, pero sin éxito.¹⁹ También se han utilizado vacunas compuestas con fimbrias purificadas para los humanos, con resultados poco satisfactorios.⁷ La principal razón de la ineficiencia es que los CFAs, al ser ingeridos, se degradan por la actividad de las enzimas proteolíticas del jugo gástrico, ocasionando la pérdida de la antigenicidad.⁴¹ Otro esfuerzo más fue realizado por Evans; con un grupo de voluntarios, usó una *E. coli* productora de colicina E2, que expresaba CFNI y las enterotoxinas de forma inactiva. Aproximadamente el 75% de los vacunados, al ser retado contra ETEC con un CFA, homólogo o heterólogo, no presentó diarrea.⁴² La propuesta más reciente de una vacuna formada de cepas muertas de ETEC que expresan CFAs más la subunidad B de la toxina de cólera, dejó una inmunidad temporal.⁴³

En tiempos recientes, dos grupos informaron del uso de vacunas orales con microcápsulas que contenían CFNI y CFA/II para el estudio de la inmunogenicidad de las mismas.^{44,45} Algunos estudios han enfocado el desarrollo de agentes profilácticos para la prevención de las infecciones por ETEC en el turista. En un estudio más se demostró la protección de voluntarios con leche materna que contenía anticuerpos contra la enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli*. La protección pasiva con calostro bovino contra la infección experimental con ETEC en voluntarios también se ha demostrado.⁴⁶

En conclusión, la capacidad de ETEC para unirse y colonizar las células epiteliales en el intestino, es el suceso inicial para la inducción de la respuesta inmune contra los antígenos presentes.

El objetivo de este trabajo es caracterizar los epítomos y comunes en CFNI, que son reconocidos con el anticuerpo monoclonal CFNI (Mabs CFNI 1:6), usando sueros hiperinmunes contra CFAs y PCFs diferentes de CFNI, con sueros de niños infectados naturalmente con ETEC que expresan CFNI y por último con sueros de adultos de zona endémica y no endémica de ETEC.

Material y métodos

Cepas bacterianas

Se utilizaron las cepas de referencia ETEC: H-10407 que expresan CFNI, 1392-75 que expresa CFA/II, E8775 que expresa CFNIV, que fueron suministradas por el doctor Alejandro Cravioto (Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México).

Población en estudio

Las cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas fueron aisladas de una cohorte de 228 niños en la comunidad de San Pedro Mártir (Ciudad de México),³ y las cepas aisladas de estudiantes estadounidenses que asistieron a la Universidad de Guadalajara, Jal. durante el verano de 1987.³

Anticuerpos policlonales y monoclonales

Los anticuerpos policlonales contra los factores de colonización se obtuvieron inmunizando conejos con bacterias formalinizadas. En principio se inocularon en forma subcutánea, con un 50% de adyuvante completo de Freund. Después se aplicaron 4 inmunizaciones en forma semanal vía intravenosa. Al término del esquema de inmunización, los conejos se sangraron en blanco y el suero se almacenó a -20 °C.⁹

Purificación de IgG a partir de los sueros hiperinmunes obtenidos contra los CFAs

Se realizó la precipitación de las inmunoglobulinas con sulfato de amonio al 50% y dos precipitaciones más al 30%. El precipitado final se dializó contra solución salina. El dializado se sometió a una columna de afinidad de seafrosa 4b, activada con bromuro de cianógeno y proteína A de *Staphylococcus aureus*. La fracción de elución se logró mediante el aumento de la concentración de cloruro de sodio y citratos a pH ácido.¹²

Los anticuerpos monoclonales se produjeron en 1988, durante mi tesis doctoral.⁴⁹⁻⁵¹ Para el uso en este trabajo fueron donados por la doctora Ann-Mari Svennerholm, (Departamento de Microbiología, Universidad de Gotemburgo, Suecia).

Sueros humanos

Los sueros de los niños menores de 5 años provenían de un estudio epidemiológico de ETEC? Los sueros de adultos se obtuvieron de áreas endémica y no endémica de ETEC.

Síntesis de péptidos para las pruebas inmunológicas

El método de Geysen es una variante del método tradicional para la síntesis de péptidos en fase sólida.⁵²⁻⁵⁵ En este método se sintetizan los péptidos sobre palillos o "pins" de polietileno, a los que se les adiciona polímero de ácido acrílico que tiene grupos amino disponibles. Los péptidos sintetizados (síntesis F-moc) quedan unidos covalentemente a la fase sólida. Los "pins" quedan ordenados en una matriz para que puedan entrar en los pozos de una placa de ELISA. Esto hace posible obtener un gran número de péptidos diferentes en forma simultánea, los cuales se hacen reaccionar con el mismo suero en una prueba inmunológica en fase sólida (ELISA). Como los péptidos están unidos a la fase sólida covalentemente, se pueden remover los anticuerpos que se unieron durante la prueba sin que se desprendan los péptidos, permitiendo reutilizar los péptidos hasta sesenta veces, en pruebas diferentes.²⁻¹¹ Los octapéptidos traslapados, que comprenden la secuencia de CFA/I unidos covalentemente a "pins" de polietileno, al principio fueron sintetizados en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Esto se hizo por duplicado, según la secuencia descrita por Karjalainen y col. y confirmada por Cassels y col.⁸⁻¹⁴

Control de la síntesis de péptidos

El control de la síntesis de péptidos se realizó sintetizando simultáneamente los péptidos de CFNI y los péptidos control positivo PLAQGGGG y el control negativo GLAQGGGG. La síntesis correcta se evaluó por medio de la capacidad del anticuerpo monoclonal para reconocer el control positivo.⁵⁵

Síntesis de subsecuencias de CFA/I (péptidos sintéticos solubles)

Se utilizó la síntesis tradicional de péptidos para la obtención de péptidos necesarios de la secuencia de CFNI, que fueron reconocidos por la respuesta humana. Posteriormente se realizó la purificación por cromatografía en columna.⁶

PEPSCAN

Las pruebas de ELISA simultáneas con los 140 octapéptidos de CFA/I se realizaron según el método propuesto por Geysen y col (modificaciones: se bloquearon los "pins" con albúmina sérica bovina al 0.1% y/o ovoalbúmina al 1% en solución salina amortiguada con fosfatos 0.1M (pH 7.2), Tween 20 al 0.1% y azida de sodio la 0.1% (PBS-Tween), durante una hora a temperatura ambiente.

La solución de bloqueo además contenía, en algunos casos, suero bovino diluido 1:1625 ASB en PBS-Tween. Al finalizar la reacción del antígeno-anticuerpo se procedió a eliminar el excedente. Para detectar la reacción, se llevó a cabo la adición de antiinmunoglobulinas humanas marcadas con peroxidasa, por un período de incubación de una hora. Al finalizarse se adicionó el sustrato ABTS (2-2'-azino-bis(3-etilbenz-tiazolin-6-sulfonato) con peróxido de hidrógeno. La evaluación de la prueba se realizó espectrofotométricamente a 405 nm. Después de cada prueba, se separaron los anticuerpos unidos a la fase sólida mediante soluciones de β -mercaptoetanol y SDS en solución salina de fosfatos.

Criterios para la selección de posibles epítomos (PEPSCAN)

De los diez octapéptidos de mayor valor de absorbancia, se seleccionaron los octapéptidos o secciones de éstos que estuvieran presentes en todas las determinaciones con un mismo suero; de éstos se seleccionaron los que también presentaban un mayor valor de absorbancia en los ensayos con

otros sueros; entre los últimos se seleccionaron los epítomos que presentaban un aumento en el valor de absorbancia; asociados al aislamiento de ETEC CFA/I+, superior al 150% (criterio de seroconversión) y mayor al aumento en la media de todos los valores del ensayo.

ELISA indirecto con adhesinas de ETEC o con péptidos sintéticos solubles.

Se sensibilizaron los pozos de una microplaca de ELISA con 100mL de antígeno CFA, a una concentración de 5 mcg/mL en amortiguador de bicarbonato/carbonato. La microplaca se bloqueó con albúmina sérica bovina al 1% en PBS, treinta minutos a 37°C. Se agregó 100mL del suero diluido por una hora a 37°C. Se agregó en cada pozo 100mL de anticuerpo acoplado a peroxidasa (anti-inmunoglobulina total humana), diluido a 1/1000 en PBS-tween y se reveló con el sustrato de la enzima O-fenilendiamina (4mcg/7.5mL), en amortiguador de citrato con peróxido de hidrógeno. Se evaluó espectrofotométricamente a 492nm.⁹

Resultados

Epidemiología. Frecuencia de los factores putativos de colonización en turistas y población infantil

De las 60 cepas de ETEC aisladas de la población infantil, solamente 15 de ellas (6.2%), presentaron algún factor putativo de colonización; de éstos, el antígeno 2230 estuvo presente en 8 cepas (3.3%). El PCFO166 en 6 cepas (2.5%), el PCF 0159 únicamente se presentó en una de ellas (0.4%) y un 18.5% de las cepas de ETEC no presentaron ninguno de los PCFs estudiados (Figura 1). En las 18 cepas provenientes de diarrea en niños, la frecuencia de los PCFs presentes fueron 2230 en un 1.3% y el PCFO9 en un 0.4%. En el grupo de niños asintomáticos, la frecuencia de PCFs en las cepas de ETEC fueron 2230 y O166 en un 2.0% y 2.5% respectivamente. Las cepas de ETEC que expresaron el antígeno 2230, aisladas de diarrea al compararse con las obtenidas de cuadros no diarréicos, fueron estadísticamente significativas ($p = 0.006$).

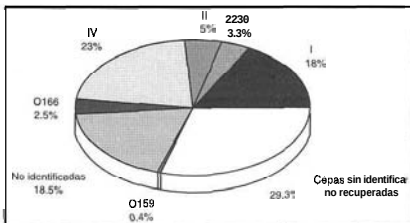


Figura 1. Frecuencia de los factores putativos de colonización (CFAs y PCFs) en cepas ETEC a saos de niños

En el grupo de los turistas se estudiaron 21 cepas de ETEC aisladas de cuadros agudos de diarrea. Solamente en 11 cepas (7.5%) estuvo presente algún PCF. El antígeno 2230 y el PCFO166 se presentaron en una proporción de 3% y el PCFO159 en 3 cepas (2%). En 10 de las cepas de ETEC (7%), no se encontraron ninguno de los PCF estudiados. La frecuencia del CFA/III para ambas poblaciones estudiadas fue nula (Figura 2).

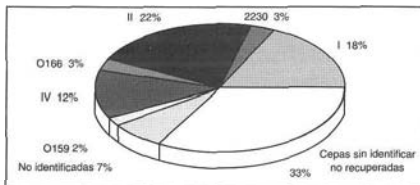


Figura 2. Frecuencia de los factores y factores putativos de colonización en cepas ETEC aisladas de turistas.

Reactividad inmunológica cruzada entre los CFAs

La reactividad inmunológica cruzada entre los diferentes CFAs provenientes de diferentes cepas, determinada por el ensayo de ELISA inhibición, mostró homología entre los CFA y PCF en su forma purificada y desnaturalizada, con los anticuerpos monoclonales contra CFNI, CS1, CS2 y CS3 de CFA/II y los anticuerpos policlonales contra CFA/III, antígeno 2230, PCFO166 y PCFO159. Los resultados están expresados en porcentaje de inhibición

CS1 - VEKTSVTASVDFTVLLQSDGSALPNSVALTSPAVNFEAHTINTVHTNDSD-55
 CFA/I - VEKNITVTASVDFPIDLLQADGNALPSADKLAYSASKTFESYRVTQVHTNDAT-55

CS1 - KGVTVKLSADPVLNSVLNPTLQIPVSVNFAGKPLSTTGITIDSNDLNFASSGVNK-110
 CFAI - KKVIVKLADTPQLTDVLNSTVQMPISVSWGGQVLSTTAKEFEAAALGYSASGVNG-110

CS1 - VSSQTKLSIHADATRVTGAGTAGQYQGLVSIILTKST -148
 CFAI - VSSSQELVI-SAAPKTAGTAPTAGNYSVSVLMTLGS -147

Figura 5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las subunidades de CS1 de CFA/II y CFA/I de *Escherichia coli* enterotoxigénica. Identidad 75 (51%); similitud 30 (20.4%). El número de espacios insertados en CS1 es cero; número de huecos insertados en CFNI fue 1. La matriz de comparación: Estructura genética. El carácter para indicar que dos residuos son idénticos es "-"; el carácter para indicar que dos residuos son similares es ".". Los aminoácidos que se consideran similares son: A, S, T; D, E; N, Q; R, K; I, L, M, V; F, Y, W.

Control de la síntesis de los epítomos lineales en CFA/I

El control de la síntesis de los octapéptidos unidos a la fase sólida, fue comprobado con el péptido control positivo reconocido por el anticuerpo monoclonal PLAQ por el método de ELISA (PEPSCAN).

Epítomos continuos reconocidos por sueros de niños

La población infantil estudiada consistió de siete niños los cuales sufrieron infección natural por ETEC portadora de CFNI. Se analizaron los sueros de las fases antes y después de la infección por PEPSCAN. Se observó en la mayoría de los sueros pertenecientes a la fase convalescente un incremento en los valores de la absorbancia para todos los octapéptidos. El reconocimiento fue mayor para tres regiones que comprenden las posiciones de 33 a 56, 98 a 105 y 120 a 139 en CFNI (Figuras 5 y 6).

Epítomos continuos reconocidos por sueros humanos de adultos

La caracterización posterior de los epítomos lineales en CFNI se hizo con sueros de adultos sanos (uno de ellos vivió en área endémica, Suecia, y el otro en el área endémica, México) (Figura 7) se reconocieron 3 epítomos lineales en las posiciones 33 a 56, 98 a 105,

120 a 139, mismos que fueron reconocidos por los sueros de los niños (Figuras 8a y 8b).

Epítomo lineal de CFA/I reconocido por el anticuerpo monoclonal CFA/I 1:6

La búsqueda del epítomo lineal en CFNI con el anticuerpo monoclonal CFNI 1:6 no fue demostrado por PEPSCAN ni por el ensayo de ELISA indirecto.

Adhesina-Pos.-Subsecuencia	Adhesina-Posición-Subsecuencia
CS3 94- NITL DKN	CS5 108- TLSTAVEAA
CS5 43- NITLDSN	TIPO1 39- TASLAQRGA
CS3 119- PLKF	CS5 107- LTLSTAV
8786 13- PLVF	CS1 31- LTYSPAV
CS3 48- LSNTEI	CS5 116- AKGEVA
CS1 89- LSTTGI	8786 3- AVGDVA
CS3 39- SNTLVGV	CS5 11- WQGVYPS
TIPO 1 95- SATNVGV	CFAI 84- WGGQVLS
CS3 14- NVLS	CS5 42- LNIIT
2230 2- NVLS	CS4 3- LNIIT
0166 21- NCSAL	
CS5 125- NQQL	

Figura 6. Alineamiento de otras subsecuencias similares más cortas en CS1 y CS3 de CFA/II; CS4 y CS5 de CFA/IV; antígeno 8786; pili tipo 1; antígeno 2230; PCF 0166. Los alineamientos se realizaron con el programa FASTASCAN de PCGENE, que sigue el algoritmo de Needleman u Wunsch.²⁸

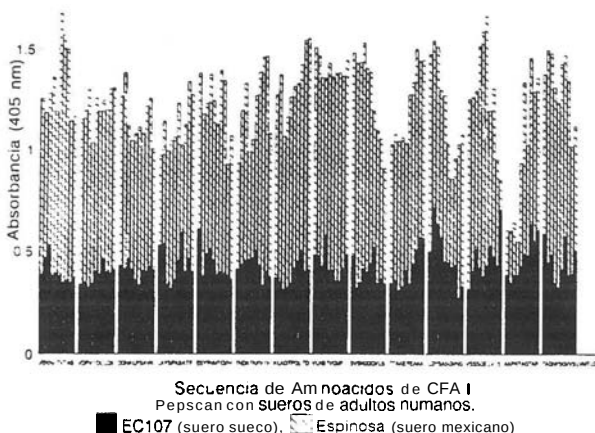


Figura 7. Los resultados de PEPSCAN de CFA/I con sueros de zona endémica México (barras claras) y otro suero de no endémica Suecia (barras oscuras). Cada posición en la secuencia de aminoácidos de CFA I corresponde a un octapéptido cuyo aminoácido N terminal es el aminoácido de dicha posición. Se graficó, para cada suero, el promedio de dos determinaciones de cada suero.

Epítomos continuos y comunes en CFA/I con sueros hiperinmunes heterólogos

Los epítomos reconocidos por los anticuerpos heterólogos fueron múltiples y diferentes para cada suero hiperinmune, por lo que la presentación de cada resultado es de forma independiente. Los anticuerpos de conejo contra el CS1 del CFNII reconocieron 6 regiones diferentes: 3 a 15, 22 a 38, 42 a 49, 60 a 85, 100 a 110 y 115 a 135 (Figura 9). El suero hiperinmune contra CS3 del CFNII reconoció las siguientes dos subsecuencias: 78 a 83 y 105 a 111 (Figura 9). Los anticuerpos anti CS4 en CFNIV reconocieron 6 regiones: 3 a 19, 42 a 48, 70 a 78, 84 a 97, 112 a 120 y 138 a 144 (Figura 9). El anticuerpo contra el factor putativo de colonización 0166 reaccionó fuertemente con una subsecuencia de la posición 20 a 28 de CFNII (Figura 9); finalmente, el suero hiperinmune contra CS2 de CFNIV reconoció 2 subsecuencias de las posiciones 71 a 79 y 81 a 90.

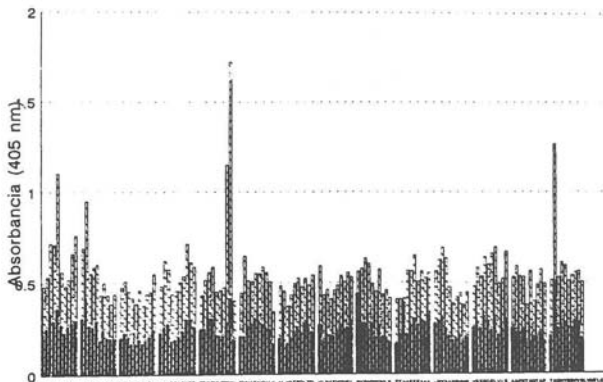
Discusión

Este es el primer estudio que muestra la frecuencia de los factores putativos de colonización (PCFs) de *Escherichia coli* enterocoxigénica en una población infantil y de turistas. La prevalencia de los PCFs en estas poblaciones va del 6.2% al 7%, respectivamente. Los PCFs más frecuentes en ambas poblaciones son PCFO166, antígeno 2230 y PCFO159, lo que sugiere que se trata de una prevalencia real, dado que el estudio infantil se efectuó en la ciudad de México y las cepas de ETEC de los turistas a Guadalajara, Jal. provenientes de Estados Unidos.

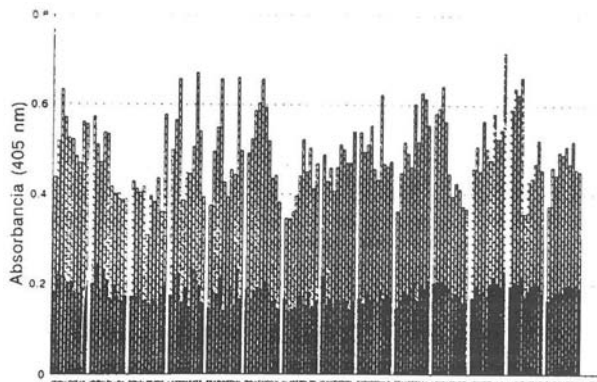
Existen dos estudios que describen la presencia de los PCFs (10, 68) realizados en cepas de colección de ETEC aisladas de diarreas, en los que se informa una frecuencia de 13% a 17%. Si bien las frecuencias son mayores, no reflejan la prevalencia de una comunidad.

Se demostró que la prevalencia del antígeno 2230 se asoció con las cepas aisladas de niños con diarrea, sugiriendo la participación de este antígeno en forma importante en la patogénesis de la diarrea.

La reactividad inmunológica cruzada en algunos de los CFAs y PCFs se logró, pues al desnaturar las fimbrias y presentarlas en configuración primaria fueron reconocidas por los anticuerpos heterólogos; los de mayor homología fueron CFA/I,



Secuencia de Aminoácidos de CFN1



Secuencia de Aminoácidos de CFA/I

Figuras 8a y 8b. Los resultados de PEPSCAN sobre el promedio de los reacciones de cada suero en la fase aguda y convalescente de la infección con ETEC que expresa CFA. La imagen de la reacción de la fase aguda (barras oscuras) y el suero convalescente (barras claras). Cada posición en la secuencia de aminoácidos de CFA/I corresponde a un octapéptido cuyo aminoácido N terminal es el aminoácido de dicha posición. Se graficó, para cada suero, el promedio de dos determinaciones de cada suero.

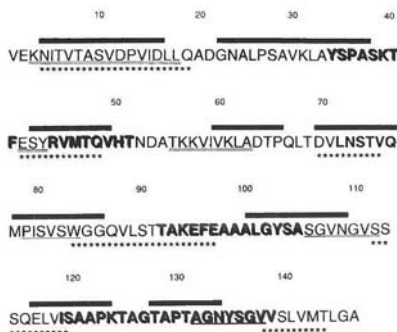
CS1 y CS3 de CFNII, CS4 de CFNIV y PCFO166. Estos resultados concuerdan con las observaciones previas realizadas por McConnell y col,⁶⁶ donde demuestran la presencia de reactividad cruzada. En ambos estudios se mostró la reactividad inmunológica cruzada, que sugiere la presencia de los determinantes antigénicos comunes entre las fimbrias y fibrillas involucradas en la patogénesis y/o protección inmunológica contra las reinfecciones. Estos hallazgos se reafirman fuertemente al realizar las comparaciones entre los grados de similitud de los diferentes factores de colonización y encontrar la presencia de algunas regiones conservadas que están actuando como determinantes antigénicos comunes.⁵⁹

Esta similitud secuencial es muy notable en algunos casos, como el de CFA/I con el subcom-

ponente CS1 de CFNII. Es bien conocido que las subunidades de CFNI, CS1, CS2 de CFNII, CS4 de CFNIV y PCFO166 tienen extremos amino terminales muy parecidos. Recientemente se ha encontrado que a este grupo se le puede añadir el factor putativo de colonización 0166. Desafortunadamente, sólo se conoce la secuencia completa de algunas subunidades de adhesinas por lo que todavía no es posible saber cuál es la extensión y el porcentaje de identidad entre estas proteínas.

Girón y col. describen las fimbrias en dos grandes grupos; el primero es el aquí presentado^{66, 67} y el segundo lo define como *E. coli* con fimbrias del tipo IV.⁶⁷ Estas últimas no comparten homología inmunológica cruzada, ni secuencial con los CFAs y PCF, a excepción de CFA/III, que comparte su región aminoterminal con el 100% de los pilis "longus". En este estudio se presentó por primera vez el alineamiento de otras subsecuencias similares más cortas para los CFNI y PCFs, utilizándose programas de FASTSCAN y PCGENE.^{62 - 64} Probablemente alguna de estas regiones compartidas pudiesen estar involucradas en los fenómenos de reactividad inmunológica cruzada, si bien, como ya se informó, la subsecuencia VEKNITVTASVAP se encuentra presente en la región aminoterminal de CFNI, CS1 y CS2 de CFNII, CS4 de CFNIV y PCFO166. Este es el primer análisis de comparación por FASTA que se encuentra presente en una región conservada en las hemoaglutininas de 40 aislamientos de cepas de virus influenza y en una secuencia en una sección de ADN genómico de *M. lepra* traducido. Esta subsecuencia bien podría tratarse de un motivo con alguna función en las proteínas en las que se ha encontrado. La búsqueda de VEKNITVTASVDP en PROSITE y PCGENE no fue reconocida como motivo en CFA/I;⁵⁴ sin embargo, la asparagina contenida en dicha sección de la proteína es identificada como un posible sitio de glicosilación. Este es el primer reporte oficial de esta subsecuencia de CFNI en México y el resto del mundo, ya que al utilizar el programa "motifs" del paquete de Wisconsin no se le encontró."

Es difícil asignar una función posible a VEKNITVTASVDP y quizás involucrarlo en el evento inicial de la adherencia de las fimbrias de ETEC.^{63, 64} Hasta ahora sólo se han informado los epítomos continuos reconocidos con anticuerpos de un modelo de simios inmunizados parenteralmente con CFNI purificado.^{14, 57} Nuevamente, este es el primer infor-



Epítomos lineales de células B en CFA/I. Los diferentes caracteres indican diferentes epítomos.
Principales epítomos de respuesta humana.
 Valores altos con sueros adultos de zona endémica
 Epítomos compartidos con CS1
 Epítomos compartidos con CS3
 Epítomos compartidos con CS4
 Posibles epítomos comunes con CS2
 Posibles epítomos comunes con CS2

Figura 9. Epítomos continuos y comunes de CFA/I reconocidos con sueros humanos (niños y adultos); sueros hiperinmunes contra CS1, CS2 y CS3 de CFA/I, PCFO166. Las regiones que presentan doble rayatura son los epítomos reconocidos por sueros adultos de zonas endémicas; las regiones señaladas con una raya gruesa superior son los epítomos reconocidos por anti-CS1 de CFA/I; los de una sola raya inferior son los reconocidos con anti-CS3. Los asteriscos señalan los epítomos reconocidos con anti-CS4 de CFA/I. En sombreado se señala el único epítomo común con anti-PCFO166 y con otras tal cual las regiones reconocidas con el anti-CS2 de CFA/I.

me en la búsqueda de los epítomos continuos en CFNI consiete pares de sueros agudos y convalescientes de niños, expuestos a ETEC que expresa CFNI. Es importante señalar que se observó un aumento general en los valores de absorbancia para todos los octapéptidos con los sueros convalescientes de los niños los cuales se asociaron a la infección por ETEC portadora de CFA/II. Sin embargo, al aplicar los criterios de selección de epítomos continuos, son sólo tres los que cumplen con ellos, que son los mismos epítomos reconocidos con los sueros de adultos de zonas endémicas y que quizás se encuentren asociados a protección, ya que los adultos pertenecientes a estas zonas, sólo ocasionalmente sufren diarreas por ETEC. La probabilidad de que los tres epítomos lineales estén asociados a protección es muy alta.

De los epítomos continuos de ETEC reportados en el modelo de simio inmunizado con CFNI, se reconocieron tres regiones que se comparten con los resultados obtenidos por nosotros en los humanos (niños y adultos) y son la posiciones 33, 40 y 132 a 139. La última región en la posición 55, sólo fue reconocida por los sueros humanos y éste hallazgo se podría explicar en parte por la especie y en parte por la exposición del hospedero al antígeno.^{60, 62}

No existe evidencia previa que identifique epítomos continuos comunes con secuencias conocidas y compartidas con CFNI, utilizándose sueros hiperinmunes heterólogos. Si bien el resultado fue el esperado, la explicación a ello es limitada, por el desconocimiento de las secuencias completas de aminoácidos en algunos CFAs y PCFs. Estos hallazgos son la motivación para conocer las secuencias completas CFAs y PCFs y realizar estudios de evolución en las fimbrias de ETEC.

Agadecimientos

A mis dos estudiantes de maestría en biotecnología Ana Guadalupe Trujillo Macal y Héctor Enrique Espinosa Arciniega, por su empeño, constancia y dedicación.
E presento trabajo y apoyo por CONACYT contrato No. N206-1400 y por a D rccc on General de Asuntos del Persona Acaem co. con n.ºmero de proyecto N210196, ae a Un vers oan hac ona A ro-
noma de México

Referencias

- Dupont HL, Formal SB, Hornick RB, Snyder MJ, Libonati JP, Sheahan DG, Labrecq EH, Kalas JP. Pathogens of *Escherichia coli* diarrhea. N Engl J Med 1971;285:1-9.
- Merson MH, Sack RB, Islam S, Saklayen G, Huda N, Huq I, Zulch AW, Yolken RH, Kapikian AZ. Disease due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in Bangladeshi adults clinical aspects and a controlled trial of tetracycline. J Infect Dis 1980;141:702-711.
- López-Vidal Y, Calva JJ, Trujillo A, Ponce de Leon A, Ramos A, Svennerholm A-M, Ruiz-Palacios GM. Enterotoxins and adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* are they a risk factor for acute diarrhea in the community? J Infect Dis 1990;162:442-447.
- Black RE. The epidemiology of cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrheal disease. En: Development of vaccines and drugs against diarrhea. 11th Nobel Conference, Stockholm 1985. Holmgren J, Lindberg A, Molby R (Eds). Studentlitteratur, Lund, Sweden, 1986, pp 27-32.
- Black R. Epidemiology of diarrheal disease: Implications for control by vaccines. Vaccine 1993;11:100-106.
- Holmgren J. Toxins affecting intestinal transport process. En: Virulence of *Escherichia coli* Reviews and methods. Sussman M. (Ed) London, Academic Press Inc 1985, pp 177-191.
- Levine MM. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. En: New generation vaccines; Woodrow CG and Levine MM (Eds.) New York, Marcel Dekker Inc, 1990, pp 649-660.
- Evans DG, Evans Jr DJ. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. Infect Immun 1978;63:68-647.
- Thomas LV, McConnell MM, Rowe B, Field AM. The possession of three novel coli surface antigens by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains positive for the putative colonization factor PCF 8775. J Gen Microbiol 1985;131:2319-2326.
- Viboud G, Binsztel N, Svennerholm AM. Characterization of monoclonal antibodies against putative virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their use in an epidemiological study. J Clin Microbiol 31:3 1993;558-564.
- Hsuzeiroeder MW, Elliot TR, Thomas CJ, Halter R, Manning P. A new fimbrial type (PCF09) on enterotoxigenic *Escherichia coli* 09: H⁺ LT⁺ isolated from a case of infant diarrhea in Central Australia. FEMS Microbiol Lett 1990;66:55-60.
- Evans DG, Silver RP, Evans Jr DJ, Chase DG, Gorbach SL. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. Infect Immun 1975;12:656-657.
- McConnell MM, Chart H, Field AM, Hibberd M, Rowe B. Characterization of a putative colonization factor (PCF0166) of enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroup O186. J Gen Microbiol 1989;135:1135-1144.
- Darfeuille-Michaud A, Forestier C, Joly B, Cluzel R. Identification of a nonfimbrial adhesive factor of an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. Infect Immun 1986;52:468-475.

15. Honda T, Arita M, Miwatani T. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli* a possible new colonization factor. *Infect Immun* 1984;43:959-965.
16. Tacket CO, Maneval DR, Levine M. Purification, morphology and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. *Infect Immun* 1987;55:1063-1069.
17. Hibberd ML, McConnell MM, Field A, Rowe B. The fimbriae of human enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 334 are related to CS5 fimbriae. *J Gen Microbiol* 1990;136:2449-2456.
18. McConnell MM, Hibberd M, Fiel AM, Chart, Rowe B. Characterization of a new putative colonization factor (CS17) from a human enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O114:H21 which produces only heat-labile enterotoxin. *J Infect Dis* 1990;161:343-347.
19. Aubel D, Darfeuille-Michaud A, Joly B. New adhesive factor (antigen 8786) on a human enterotoxigenic *Escherichia coli* O117:H4 strain isolated in Africa. *Infect Immun* 1991;59:1290-1299.
20. Svennerholm AM, Holmgren J. Immunity to enterotoxin-producing bacteria. In: *Immunology of gastrointestinal disease*. MacDonald TT (Ed), Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992; pp 227-246.
21. Evans DG, Evans Jr DJ, Clegg S, Pauley JA. Purification and characterization of the CFA/II antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1979;25:738-748.
22. González EA, Blanco J. Comparative study of inhibition of mannose-resistant hemagglutination caused by CFA/II CFA/II, K88 and K99-positive *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* 1985;29:115-121.
23. Pileri P, Worobec EA, Paranchych W, Armstrong GD. Identification of a human erythrocyte receptor for colonization factor antigen I pili expressed by H10407 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1988;56:1334-1340.
24. Lindahl M, Faris A, Wadstrom T. Colonization factor antigen on enterotoxigenic *Escherichia coli* is a sialic-specific lectin. *Lancet* ii;1982;280.
25. Buhler T, Hoschutsky H, Jann K. Analysis of colonization factor antigen I, an adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* O78:H11: fimbrial morphology and location of the receptor-binding site. *Infect Immun* 1991;59:3876-3882.
26. Wadstrom T, Sjöberg PO, Lindahl M. Sialic acid specific lectins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: *Lectins, biology, biochemistry*. clinical biochemistry. (Eds) Bøge-Hansen, Brebrowsky, W de Gruyter, Berlin, 1985, pp 417-424.
27. Oro HS, Kolsto AB, Wanneras C, Svennerholm AM. Identification of asialo GM1 as a binding structure for *Escherichia coli* colonization factor antigens. *FEMS Microbiol Lett* 1990;72:289-292.
28. Neeser JR, Chambaz A, Gollard M, Link-Amster H, Fryder V, Kolodziejczyk E. Adhesion of colonization factor antigen -II positive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to human erythrocyte-like differentiated HT-29 cells: a basis for host-pathogen interactions in the gut. *Infect Immun* 1989;57:3727-3734.
29. Wanneras C, Holmgren J, Svennerholm AM. The binding of colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* to intestinal cell membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* 1990;154:103-107-112.
30. Levine MM, Ristaino JF, Marley G, Smyth C, Knutton S, Boedeker E, Black R, Young C, Clements ML, Cheney S, Patnaik R. Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen-II positive enterotoxigenic *Escherichia coli* morphology, purification, and immune responses in humans. *Infect Immun* 1984;44:409-420.
31. Spira WM, Sack RB, Froelich JL. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Infect Immun* 1981;32:739-747.
32. Svennerholm AM, López-Vidal Y, Holmgren J, McConnell MM, Rowe B. Role of PCF 8775 and its coli surface subcomponents for colonization, disease and protective immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* in rabbits. *Infect Immun* 1988;56:523-528.
33. Svennerholm AM, Wanneras C, Holmgren J, McConnell MM, Rowe B. Roles of different putative colonization factor antigen II in colonization by and protective immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* in rabbits. *Infect Immun* 1990;58:341-346.
34. Ahren CM, Svennerholm AM. Synergistic protective effect of antibodies against *Escherichia coli* enterotoxin and colonization factor antigens. *Infect Immun* 1982;38:74-79.
35. Evans DG, Evans Jr DJ, Opekum AR, Graham DY. Non-replicating oral whole cell vaccine protective against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diarrhea stimulation of anti-CFA(CFA/II) and anti-enterotoxin (anti-LT) intestinal IgA and protection against challenge with ETEC belonging to heterologous serotypes. *FEMS Microbiol Immunol* 1988;47:117-126.
36. Stoll BJ, Svennerholm AM, Gotheffors L, Barua D, Huda S, Holmgren J. Local and systemic antibody responses to natural and acquired enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in an endemic area. *J Infect Dis* 1986;153:527-534.
37. Monn HW, Bunn TO. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in farm animals. *Vaccine* 1993;11:213-220.
38. DuPont HL, Haynes GA, Pickering LK, Tjoa W, Sullivan P, Olarte J. Diarrhea of travelers to Mexico relative susceptibility of United States and Latin American students attending a Mexican university. *Am J Epidemiol* 1977;105:37-41.
39. Evans DG, De la Cabaada FS, Evans Jr DJ. Correlation between intestinal immune response to colonization factor antigen I and acquired resistance to enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in an adult rabbit model. *Eur J Clin Microbiol* 1982;1:178-185.
40. Ahren CM, Svennerholm AM. Experimental enterotoxin-induced *Escherichia coli* diarrhea and protection induced by previous infection with bacteria on the same adhesin or enterotoxigenicity. *Infect Immun* 1985;50:255-261.
41. Rutter JM, Jones GW. Protection against enteric disease caused by *Escherichia coli* model for vaccination with a virulence determinant? *Nature* 1973;242:531-532.
42. Schmidt M, Kelly EP, Tseng LY, Boedeker EC. Towards an oral *E. coli* plus vaccine travelers, diarrhea susceptibility of purified colonization factor antigen-II to proteolytic digestion. *Gastroenterology* 1985;88:A1575.
43. Evans DG, Graham DY, Evans DJ Jr, Opekum A.

- Administration of purified colonization factor antigens (CFA/II) of enterotoxigenic to volunteers: Response to challenge with virulent enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gastroenterology* 1984;87:934-940.
44. Svennerholm AM, Holmgren J, **Sack DA**. Development of oral vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea. *Vaccine* 1989;7:196-198.
 45. **Reid RH, Boedeker EC, McQueen CE, Davis D, Tseng LY, Kodak J, Sau K, Wilhelmsen CL, Nellore R, Dalal P, Bhagat HR**. Preclinical evaluation of microencapsulated CFA/II oral vaccine against enterotoxigenic *E. coli*. *Vaccine* 1993;11:159-167.
 46. Edelman R, Russell RG, **Losonsky G, Tall BD, Tacket CO, Levine MM, Lewis DH**. Immunization of rabbits with enterotoxigenic *E. coli* colonization factor antigen (CFA/II) encapsulated in biodegradable microspheres of poly (lactide-co-glycolide). *Vaccine* 1993;11:155-158.
 47. Tacket CO, **Losonsky G**, Link H, Hoang Y, Guesry P, **Hilpert H, Levine MM**. Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *N Engl J Med* 1988;318:1240-1243.
 48. Bourne FJ, Newby TJ, **Evans P**, Morgan K. The immune requirements of the newborn pig and calf. *Ann Rech Vét* 1978;9:239-244.
 49. Dean-Nystrom EA, Sarmiento JI, **Runnels PL**. Effect of intestinal receptors for K88 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Immunol Infect Dis* 1992;2:263-267.
 50. **López-Vidal Y, Svennerholm AM**. Monoclonal antibodies against the different subcomponents of colonization factor antigen II of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1990;28:1906-1912.
 51. **López-Vidal Y, Svennerholm AM**. Monoclonal antibodies (MAbs) against coli surface (cs) components of the colonization factor antigens I, II and PCF 8775 of enterotoxin producing *E. coli*. Abstract No. B180: 88th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Miami Beach, 1988; FL 8-13 May.
 52. **López-Vidal Y, Klemm P, Svennerholm AM**. Monoclonal antibodies against different epitopes on colonization factor antigen I of enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1988;26:1967-1972.
 53. Geysen HM, **Meloan RH, Barteling SJ**. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitope resolution of a single amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:3998-4002.
 54. Geysen HM, Rodda SJ, Mason TJ. A priori delineation of a peptide which mimics a is continuous antigenic determinant. *Molec Immunol* 1985;23:709-715.
 55. Geysen HM, Rodda SJ, **Mason TJ, Tribbick G, Schoofs PG**. Strategies for epitope analysis using peptide synthesis. *J Immunol Meth* 1987;102:259-274.
 56. Geysen HM, **Tainer JA, Rodda SJ, Mason TJ, Alexander H, Getzoff ED, Lerner RA**. Chemistry of antibody binding to a protein. *Science* 1987;235:1184-1190.
 57. **Kyte J**, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Molec Biol* 1982;157:105-132.
 58. **Getzoff ED, Geysen HM, Rodda SJ, Alexander W, Tainer JA, Lerner RA**. Mechanism of antibody binding to a protein. *Science* 1987;235:1191-1196.
 59. **Horal P, Svennerholm B, Jeanson S, Rymoo L, Hall WW, Vahine A**. Continuous epitopes of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates. *J Virol* 1991;65:2718-2723.
 60. Moore WT, Caprioli RM. Monitoring peptide synthesis step-wisely by mass spectrometry. In *Techniques in protein chemistry II*. Villafranca (Ed.) San Diego. CA. Academic Press 1991; pp 511-528.
 61. **Moore WT, Wolinsky JS, Suter MJF, Farmer TB, Caprioli RM**. Immunoreactive synthetic peptide epitope mapping with structural validation using electrospray mass spectrometry. In: *Techniques in Protein Chemistry III*, Angletti R, ed. San Diego, CA: Academic Press 1992, pp 1-15.
 62. Klemm P. Primary structure of the CFA/II fimbrial protein from human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Eur J Biochem* 1982;124:339-348.
 63. Lipman DJ, Pearson WH. Aligning amino acid sequences: comparison of commonly used methods. *Science* 1985;227:1435-1441.
 64. Lipman DJ. A method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:726-730.
 65. Hoop TP, Woods KR. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:3824-3828.
 66. **Giron JA, ASY Hoand Schoolnik GK**. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1993;175: 7391-7403.
 67. **Giron JA, Levine MM, Kaper JB**. Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1995;12:71-78.
 68. **McConnell MM, Rowe B**. Prevalence of putative colonization factors CFA/III and PCF 0159 H4 in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1989;159 582-586.
 69. **Feng F, Johnson MS, Doolittle RF**. Aligning amino acids sequences: comparison of commonly used methods. *J Mol Evol* 1985;21:112-125.