

Artículos originales completos

Caracterización de adhesinas fímbricas F17 de *Escherichia coli*. I. Propiedades adhesivas y hemaglutinantes*

G. FURRAZOLA

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, Habana 6, Cuba

Recibido en octubre de 1991

Aprobado en marzo de 1992

RESUMEN

Se estudia la unión a carbohidratos y propiedades hemaglutinantes de algunas cepas de *E. coli* que expresan adhesinas fímbricas F17.

Para testar la unión a los carbohidratos se usaron perlas de una resina (Eupergit C) a las cuales se unieron covalentemente diferentes glicoproteínas y se realizaron ensayos de inhibición usando diferentes azúcares simples. Se observó heterogeneidad en las propiedades adhesivas entre las cepas. A diferencia de otras adhesinas hospedero-específicas, estas mostraron propiedades aglutinantes en un rango de temperatura entre 4 y 37°C.

Aunque algunas de estas cepas producen aglutinación de células de levadura la cual es inhibida por manosa, esta no se debe a la presencia de fimbrias tipo 1, lo cual queda evidenciado por la aglutinación por antisueros específicos, aglutinación de eritrocitos y electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de las fimbrias purificadas.

SUMMARY

The carbohydrate binding and haemagglutinating properties of some *E. coli* F17 strains were studied. To test the carbohydrate binding, glycoproteins covalently bound to Eupergit C beads were used and some inhibition assays were performed using

simple sugars. Heterogeneity was observed in the attachment of different strains to the beads. The haemagglutination produced by these strains was observed in a broad temperature range (4°C to 37°C).

Although some strains showed yeast cell agglutination, this is not due to the presence of type 1 fimbriae as was evidenced by specific antiserum agglutination, erythrocytes agglutination and SDS-PAGE of purified fimbriae.

INTRODUCCION

En la actualidad es generalmente aceptado el hecho de que la unión es un paso inicial, pero a la vez esencial, en la colonización de las superficies epiteliales por cepas bacterianas patógenas, las cuales son capaces de colonizar zonas normalmente estériles donde las cepas comensales no sobreviven y desde donde pueden producir infecciones, ya sea por la invasión de tejidos más profundos o secretando toxinas (Abraham y Beachey, 1985). Este proceso está determinado por la presencia de estructuras adhesivas

* Tesis para el título de Master en Ciencias, obtenido en la Universidad Libre de Bruselas (*Interuniversity Postgraduate Programme of Tropical Molecular Biology*).

llamadas adhesinas, las cuales reconocen moléculas complementarias o receptores en las células de las mucosas (Smith, 1977; Ofek *et al.*, 1978; Beachey, 1981; Gaastra y De Graaf, 1982; De Graaf y Mooi, 1986).

Numerosos estudios realizados para caracterizar la naturaleza de estos receptores demuestran convincentemente que las cadenas de carbohidratos presentes en las glicoproteínas o glicolípidos son componentes esenciales de los mismos (Gaastra y De Graaf, 1982; De Graaf y Mooi, 1986; Mouricout y Julien, 1987).

Por lo general, estas adhesinas aparecen en forma de apéndices filamentosos no flagelares llamados fimbrias o pelos, estructuras más o menos flexibles, constituidas por subunidades proteicas, distribuidas en la superficie bacteriana y observables sólo con microscopio electrónico, por su pequeño tamaño.

Teniendo en cuenta los tipos de receptores reconocidos por estas proteínas y su capacidad de aglutinar células, estas han sido igualmente incluidas bajo la denominación de lectinas o aglutininas microbianas (Mirelman y Ofek, 1986).

Varias adhesinas fimbrias de *Escherichia coli* han sido estudiadas y caracterizadas. Estas han sido divididas en general en dos grupos: fimbria manosa sensible, común o tipo 1 (Brinton, 1965), la cual se encuentra en el 70% de las cepas de esta especie, incluyendo tanto patógenas como comensales; está cromosómicamente codificada y sus propiedades adhesivas son bloqueadas por la manosa y fimbrias hospedero-específicas que aparecen solamente en cepas enterotoxigénicas, confiriendo propiedades adhesivas hacia el epitelio intestinal de un número muy limitado de especies animales. Estas últimas están codificadas por plasmidios y sus propiedades aglutinantes no son

inhibidas por la manosa (manosa resistentes). Ejemplos de estas adhesinas son las denominadas K88, K99, F41 y 987 P.

Las diarreas en terneros recién nacidos han sido generalmente asociadas a la colonización del intestino delgado por cepas de *E. coli* portando fimbrias K99 o F41. Recientemente, otras fimbrias designadas como Att25 en Bélgica y F(Y) en Francia, también han sido implicadas en estas diarreas, las cuales causan pérdidas económicas importantes en animales recién nacidos. Posteriormente se demostró que ambas estructuras comparten subunidades estructurales idénticas, y por tanto, fueron denominadas fimbrias F17 (Lintermans *et al.*, 1988).

Algunos estudios previos realizados con estas cepas sirvieron para demostrar que las fimbrias F17 reconocen glicoconjugados de la mucosa intestinal, por lo que aparecen implicadas en la adherencia bacteriana. Además se ha conocido la heterogeneidad de esta unión a las vellosidades intestinales de terneros y a glicoproteínas inmovilizadas usando lectinas y monosacáridos. (Van Driessche *et al.*, 1988 y 1989).

El objetivo de este trabajo es la caracterización de algunas de estas adhesinas fimbrias (F17), aisladas de cepas enteropatogénicas de *E. coli*, en cuanto a sus propiedades adhesivas, hemaglutinantes y algunas de sus características estructurales.

MATERIALES Y METODOS

Cepas y condiciones de cultivo

Fueron usadas las siguientes cepas de *Escherichia coli*: 25KH09, Att25 233S85, 32KH85, 33KH85 y 43KH85. Estas fueron aisladas de terneros con diarreas y tipificadas en el Instituto Nacional de Investigaciones Veterinarias de Bélgica por el Dr. P. Pohl. En los estudios relacionados con la fimbria tipo 1 fue usada la cepa *E. coli* K514 (Colson *et al.*, 1965) y como control la cepa *E. coli* HB101 (Sup E44, hsdS 20 (r^-_B , m^-_B), recA 13, ara-14,

pro A2, lac Y1, gal K2, rps L20, xyl-5, mtl-1) (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969). El medio de cultivo usado fue medio LB líquido (10 g/L triptona, 10 g/L cloruro de sodio, 5 g/L extracto de levadura). Los precultivos fueron crecidos durante toda la noche a 37°C en zaranda a 250 rpm hasta la fase estacionaria. Posteriormente 15 mL de estos fueron usados para inocular tres litros de medio fresco. Estos cultivos fueron crecidos igualmente toda la noche según las mismas condiciones.

Purificación de las fimbrias

Fimbria F17

La purificación de la fimbria fue desarrollada según el método descrito por Schoup *et al.* (1987).

Inicialmente, el cultivo es enfriado en hielo durante 30 minutos. La biomasa es colectada por centrifugación a 10 000 x g durante 30 minutos a 4°C y lavada con PBS (Na_2HPO_4 1 g/L, KCl 0,2 g/L, NaCl 8 g/L y KH_2PO_4 0,26 g/L) pH 7,2. Después es resuspendida en una solución tampón fosfato 40 mM pH 7,2, hasta obtener una densidad óptica entre 30-35 a 660 nm. Esta suspensión es colocada en una mezcladora y agitada a alta velocidad dos veces durante 45 segundos a 4°C con el propósito de desprender las fimbrias. Las bacterias se eliminaron por centrifugación a 27 000 x g a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una membrana Millipore GVWP (0,22 μm), posteriormente se le añadió sulfato de amonio hasta alcanzar el 20% de saturación y se dejó agitando toda la noche a 4°C. Las fimbrias fueron colectadas por centrifugación a 48 000 x g durante 20 minutos a 4°C. El precipitado se lavó dos veces con solución tampón fosfato 50 mM, conteniendo sulfato de amonio (20% saturado). Finalmente las fimbrias se resuspendieron en solución tampón fosfato 50 mM, pH 7,2 conteniendo 0,02% de azida sódica y fueron conservadas a 4°C.

Fimbria tipo 1

Las fimbrias tipo 1 fueron purificadas por el método de Eshdat *et al.* (1981), con una ligera modificación: para la precipitación de la fimbria fue utilizado sulfato de amonio al 20 % en vez de MgCl_2 .

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de la fimbria F17 purificada fue determinada espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción $E_{280\text{nm}} = 0,52$. Para la fimbria tipo 1 el coeficiente de extinción usado fue $E_{280\text{nm}} = 0,16$.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Electroforesis en geles de poliacrilamida al 12%, con 1 mm de espesor y en presencia de SDS (1%), se realizaron siguiendo la técnica de Laemmli (1970).

Las muestras conteniendo fimbrias tipo 1 fueron incubadas en una solución saturada de cloruro de guanidinio (8,6 M) a 37°C durante 2 horas. Después fueron dializadas en solución tampón Tris 5 mM pH 8, conteniendo 0,1 M de EDTA y calentadas cinco minutos en el buffer de muestra antes de aplicar en el gel, ya que estas son resistentes a la desagregación por el SDS (McMichael y Ou, 1979). Las bandas fueron detectadas por tinción con Azul de Coomassie R- 250 (Bio-Rad, USA).

Acoplamiento de glicoproteínas a perlas de Eupergit C

Las glicoproteínas ovomucoide de clara de huevo, fetuina y mucina de glándula submaxilar bovina (Sigma, USA) fueron unidas covalentemente a perlas de Eupergit C (Röhm Pharma GmbH) según el método de Van Driessche *et al.* (1988). La resina fue lavada extensivamente con agua destilada y posteriormente con solución tampón fosfato 1 M pH 7,5. Las glicoproteínas se resuspendieron en la misma solución tampón y se mezclaron con las perlas húmedas en una proporción de 40 mg/g respectivamente. La unión se realizó a temperatura ambiente durante 48 horas. La resina fue lavada extensivamente con PBS pH 7,2 y los grupos oxiranos libres se bloquearon por agitación durante toda la noche en PBS conteniendo 5% de 2-mercaptoetanol. Finalmente, las perlas fueron lavadas con abundante PBS para eliminar el 2-mercaptoetanol y guardadas con azida sódica al 0,02% a 4°C.

Estudios de adhesión *in vitro*

Unión a conjugados Eupergit C-glicoproteínas

Las bacterias cultivadas de la forma descrita anteriormente fueron resuspendidas en solución tampón PBS pH 7,2 hasta una D.O. = 1 y mezcladas con igual volumen de perlas de Eupergit-C conjugadas con glicoproteínas, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las perlas se lavaron dos veces con PBS para eliminar las bacterias no adheridas y observadas al microscopio (aumento: 400 x) para determinar las propiedades adhesivas. Se usaron perlas no conjugadas, con los grupos oxiranos bloqueados con 2-mercaptoetanol; como controles se usaron perlas conjugadas con glicoproteínas oxidadas con metaperiodato de sodio.

Inhibición de la unión a conjugados Eupergit C-glicoproteínas

Se realizó según lo descrito anteriormente, pero las bacterias fueron incubadas previamente durante 30 minutos en una solución 0,2 M de azúcar en PBS y después mezcladas con las perlas a una concentración final del azúcar en el ensayo de 0,05 M. Los azúcares empleados fueron D-manosa, N-acetil-D-glucosamina (NAG) y glucosa.

Preparación de antisueros de conejo

Conejos adultos (más de 2 kg de peso) fueron inyectados intramuscularmente con 0,1 mg de fimbrias purificadas diluidas en solución tampón PBS 20 mM y mezcladas con igual volumen de adyuvante completo de Freund (Difco). Posteriormente, estos recibieron dos dosis de reactivación subcutáneas, en adyuvante incompleto de Freund con intervalos de 30 días. El título del antisuero se midió por la aglutinación de bacterias fimbriadas seriadamente diluidas.

Ensayos de aglutinación

Ensayos de hemaglutinación

a) *Hemaglutinación en lámina.* La sangre colectada fue mezclada con igual volumen de solución salina de fosfato tamponada (Solución Alsever, Sigma) conteniendo tres gotas de heparina. Las células fueron lavadas cinco veces con solución tampón PBS pH 7,2 que contenían 200 mg/L de NaN_3 y resuspendidas en esta solución para una concentración final de 4% (v/v).

La hemaglutinación fue realizada sobre portaobjetos, mezclando iguales volúmenes (20 μL) de la suspensión de eritrocitos y muestras de bacterias o fimbrias purificadas a diferentes temperaturas y agitando suavemente durante un minuto. La hemaglutinación fue estimada visualmente.

b) *Hemaglutinación en placas de microtitulación.* Las fimbrias purificadas fueron diluidas en placas de poliestireno de 96 pozuelos con fondo redondeado (Nunc, Denmark) usando solución tampón PBS pH 7,2 (factor de dilución: 2; volumen: 25 μL). Posteriormente, se añadió igual volumen de eritrocitos (25 μL) y los resultados fueron estimados después de una y cinco horas, a diferentes temperaturas. El título de hemaglutinación fue definido como el inverso de la mayor dilución a la cual la reacción de hemaglutinación fue observada.

Agglutinación de levaduras

Se mezclaron iguales volúmenes de una suspensión de células de levadura (*S. cerevisiae*: 1 g en 10 mL de solución tampón PBS pH 7,2) y suspensiones bacterianas o de fimbrias purificadas sobre portaobjetos, los cuales se rotaron suavemente. La reacción positiva produjo agregados de células detectables a simple vista en un minuto. El efecto de diferentes azúcares en el bloqueo de la aglutinación fue probado, preincubando las bacterias durante 15 minutos en una solución 0,2 M de azúcar. Células de levadura oxidadas con metaperyodato de sodio fueron usadas como control.

RESULTADOS Y DISCUSION

Unión a las perlas de Eupergit C con glicoproteínas acopladas

Las propiedades adhesivas de las distintas cepas de *E. coli* F17 hacia las distintas glicoproteínas inmovilizadas en las perlas de Eupergit C, aparecen en la tabla 1.

Como se observa, estas cepas difieren en su capacidad de unión a los residuos oligosacáridos de las glicoproteínas. Cuando estas fueron oxidadas con metaperyodato de sodio, no se observó adhesión, al igual que cuando fueron usadas perlas con grupos oxiranos bloqueados con 2-mercaptoetanol, lo cual demostró la especificidad de unión a los residuos antes mencionados.

La inhibición de la unión usando diferentes azúcares también demostró heterogeneidad entre las distintas cepas. Esta ocurre por NAG, por manosa o por una mezcla de ambos azúcares. Para la cepa *E. coli* K514, la unión fue inhibida solamente por manosa.

Considerando la inhibición de la unión a las perlas de Eupergit C-mucina, se distinguen tres grupos: cepas inhibidas sólo por NAG (32 KH85), por manosa (25 KH09) y por una mezcla de ambos azúcares (Att 25 233 S85). En la figura 1, se observan bacterias unidas a estas perlas conjugadas con las glicoproteínas.

Tabla 1
UNION DE CEPAS DE *E. COLI* F17 Y K514 A PERLAS EUPERGIT C-GLICOCONJUGADOS

Cepa	Ovomucoide			Fetuina			Mucina		
	FBS	MAN	NAG	FBS	MAN	NAG	FBS	MAN	NAG
43 KH85	-	-	-	-	-	-	+	+	-
32 KH85	-	-	-	-	-	-	+	+	-
33 KH85	-	-	-	-	-	-	+	-	-
11A	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Att 25 233 S85*	+	+	+	+	-	+	+	+	+
25 KH09	+	-	+	+	-	+	+	-	+
K514	+	-	+	+	-	+	+	-	+

* La unión de la cepa Att 25 233 S85 a las perlas conjugadas con mucina y ovomucoide fue inhibida con una mezcla de los dos azúcares.

+ Unión.

- No unión.

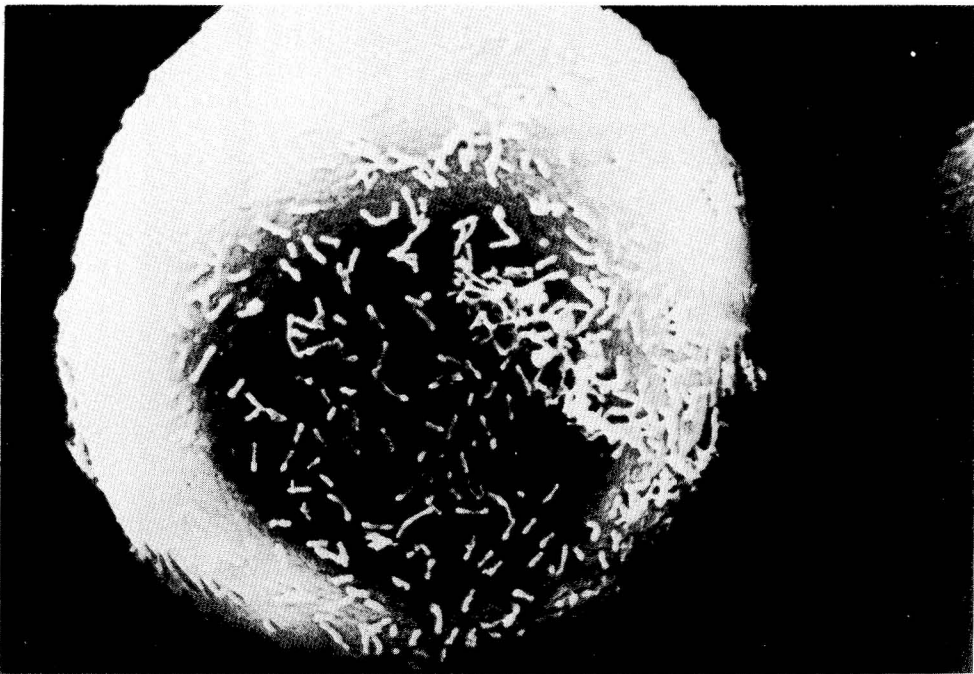


FIG. 1. Microfotografía electrónica de células de *E. coli* (Cepa Att 25 233S85) unidas a perlas de Eupergit C recubiertas con glicoproteínas.

De acuerdo con los resultados obtenidos para las cepas de *E. coli* que expresan fimbrias F17, puede concluirse que estas constituyen un grupo heterogéneo en cuanto a su reconocimiento a los carbohidratos que actúan como receptores. Tomando como base los estudios de inhibición de estas cepas hacia las perlas recubiertas con mucina, se observan tres grupos: en el primero, la unión es inhibida por NAG y no aglutinan levaduras (cepa 32 KH85); para el segundo, la unión es inhibida por manosa o por NAG (cepa 25 KH09) y el tercero es inhibido en la unión por una mezcla de estos azúcares (cepa Att 25 233S85). Estos dos últimos grupos aglutinan levaduras. Se ha propuesto un modelo para explicar este comportamiento de las adhesinas fimbrias (Van Driessche, 1989):

- Las cepas del primer grupo deben contener un sitio de unión pequeño capaz de acomodar un residuo del azúcar solamente.
- En el segundo grupo debe existir un sitio de unión compuesto por dos subsitios. En este caso, la saturación de cualquiera de los subsitios puede prevenir la unión al receptor o inhibir la aglutinación de levaduras, por lo que estos probablemente se encuentran parcialmente sobrelapados.
- Para las cepas que requieren ambos azúcares para inhibir la unión, se proponen dos posibilidades:
 - La unión puede ser mediada por dos adhesinas específicas para cada azúcar.
 - La adhesina de estas cepas posee un sitio de unión "extendido" compuesto por dos subsitios independientes, cada uno específico para un azúcar en particular. La ocupación de ambos subsitios sería necesaria para prevenir la unión.

Nuestra observación de que en este caso la inhibición de la aglutinación de células de levadura puede ser provocada por

cualquiera de los azúcares, excluye el primer modelo, que plantea la existencia de dos adhesinas estructuralmente separadas. La no aglutinación de levaduras por la cepa 32 KH85, se corresponde con la ausencia de inhibición de la hemaglutinación y la falta de protección contra la inactivación de la fimbria por manan (homopolisacárido de manosa presente abundantemente en la pared celular de las levaduras).

Para el sitio de unión a carbohidratos de la fimbria tipo 1, se ha propuesto que este está constituido por tres subsitios adyacentes, cada uno de los cuales acumula un residuo de monosacárido. La presencia de una región de unión hidrofóbica adyacente al mencionado sitio de unión es sugerida por el hecho de que alfa-manósidos aromáticos son inhibidores poderosos de la aglutinación de levaduras y la adherencia a células epiteliales intestinales de curiel (Firon *et al.*, 1984; Sharon, 1987).

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS

Tanto las fimbrias purificadas de las tres cepas de *E. coli* F17 como la proveniente de la cepa *E. coli* K 514, migran como una banda que corresponde a la subunidad estructural o principal. En el primer caso, el peso reportado es de 20,5 kDa y no se observan diferencias entre las distintas cepas (figura 2) mientras que en el segundo este es de 17 kDa.

Las fimbrias tipo 1 fueron resistentes a la desnaturalización con SDS. La disociación en monómeros se logró calentando estas a pH 2 y después de neutralizar calentando nuevamente con SDS o incubándolas con una solución concentrada de cloruro de guanidinio. Cuando estos tratamientos fueron aplicados a las muestras que contenían fimbrias F17, no se observaron bandas correspondientes a las subunidades de la fimbria tipo 1 (figura 3).

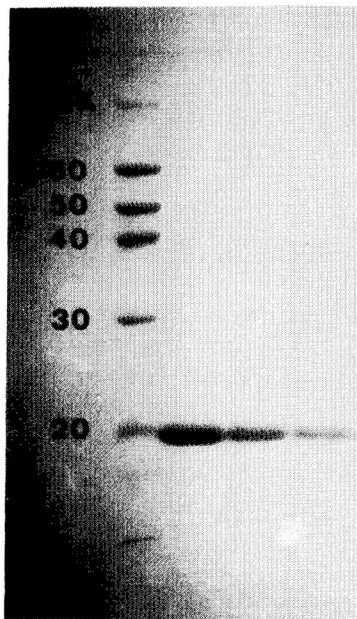


FIG. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de fimbrias F17 de *E. coli* purificadas. De izquierda a derecha: Estándar de peso molecular; fimbria F17 Cepa Att 25 233S85; fimbria F17 Cepa 25 KH09; fimbria F17 Cepa 32 KH85.

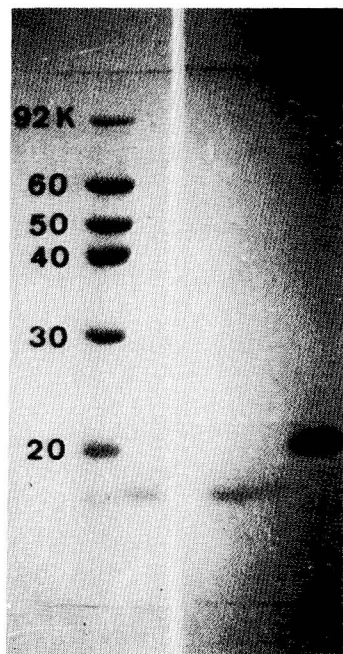


FIG. 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS de fimbrias F17 y tipo 1 de *E. coli*. Izquierda: Estándar de peso molecular; fimbria tipo 1 Cepa K 514; Derecha: Fimbria tipo 1 Cepa K 514; fimbria F17 Cepa Att 25 233S85.

Ensayos de aglutinación

Solamente las cepas de *E. coli* F17 fueron aglutinadas por el antisuero específico, el suero de animales no inmunizados no produjo aglutinación. Tampoco el antisuero anti tipo 1 aglutinó a estas cepas indicando que ellas no expresan estas fimbrias en su superficie. La cepa *E. coli* K 514 productora de estas fimbrias, sí fue aglutinada por este último y la HB 101 que carece de fimbrias, no fue aglutinada por ninguno de los antisueros. Las tres cepas F17 aglutinaron eritrocitos bovinos, fenómeno que ocurre a las dos temperaturas probadas y es inhibido por NAG en todos los casos; la manosa no es inhibitoria. La cepa K514 no aglutinó a estos eritrocitos, pero sí a eritrocitos de conejo; esta aglutinación fue inhibida por manosa solamente (tabla 2).

Las fimbrias purificadas F17 aglutinaron eritrocitos vacunos y siguen el mismo patrón de inhibición que tienen las células fimbriadas. No se observó hemaglutinación de eritrocitos de conejo. Las fimbrias tipo 1 tampoco aglutinaron eritrocitos de

conejo. Las cepas 25 KH09 y Att 25 233S85 aglutinan células de levadura, mientras que si estas últimas son tratadas con metaperyodato de sodio (control), la reacción desaparece. En ambos casos, la aglutinación es inhibida por manosa o por NAG. La cepa 32 KH85 no aglutinó levaduras, aunque esta también expresa fimbrias F17 como lo demuestra su aglutinación por el antisuero específico. La aglutinación de células de levadura provocada por la cepa K514 es inhibida solamente por manosa (tabla 3).

Las células de levadura son aglutinadas por las fimbrias tipo 1 siendo inhibida la reacción por manosa. En el caso de las fimbrias F17 aisladas, estas no producen aglutinación. Sin embargo, se observó que ellas se asocian a las células de levadura. En este caso, la unión es no específica pues no es inhibida por manosa o por NAG, y además, esta se observa con levaduras tratadas con metaperyodato de sodio, el cual oxida los carbohidratos presentes en la superficie celular. Al parecer, la falta de orientación de estos filamentos al no estar

Tabla 2
HEMAGLUTINACION EN LAMINA DE ERITROCITOS POR *E. COLI* PORTANDO FIMBRIAS F17
O TIPO 1 A DIFERENTES TEMPERATURAS

Cepa	Eritrocitos de conejo						Eritrocitos de vaca					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	PBS	MAN	NAG	PBS	MAN	NAG	PBS	MAN	NAG	PBS	MAN	NAG
Att 25 233 S85	-			-			+	+	-	+	+	-
32 KH85	-			-			+	+	-	+	+	-
25 KH09	-			-			+	+	-	+	+	-
K514	+	-	+	+	-	+	-			-		

+ Hemaglutinación.

- No hemaglutinación.

Tabla 3
AGLUTINACION EN LAMINA DE CELULAS DE LEVADURA POR E. COLI EXPRESANDO
FIMBRIAS F17 O TIPO 1

Cepa	Aglutinación de levaduras			
	Células normales			Células oxidadas
	PBS	MAN	NAG	
Att 25 233S85	+	-	-	-
32 KH85	-	-	-	-
25 KH09	+	-	-	-
K514	+	-	+	-

fijos en la superficie bacteriana o la exposición de ciertos residuos al ser desprendidos de esta, permiten esta interacción no mediada por la adhesina con elementos de la pared celular de las levaduras, que provoca la aglutinación al añadir el antisuero específico para la fimbria.

El hecho de que algunas cepas de *E. coli* F17 sean capaces de aglutinar células de levadura en una forma sensible a la manosa, es de especial interés ya que es generalmente aceptado que la aglutinación de células de levadura por bacterias está correlacionado solamente con la expresión de fimbrias tipo 1, por lo que la mayoría de los investigadores incluye manosa automáticamente en las soluciones tampones al estudiar las adhesinas fímbricas hospedero-específicas. Nuestros resultados demuestran que la aglutinación de levaduras no se debe necesariamente a la presencia de fimbrias tipo 1, ya que dos cepas de *E. coli* F17 capaces de aglutinar levaduras, carecen de este tipo de fimbria, lo cual fue demostrado por electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS, aglutinación por antisuero tipo 1, así como por las características aglutinantes de estas cepas y de sus fimbrias purificadas.

Igualmente el hecho de que la hemaglutinación provocada por fimbrias hospedero-específicas solo ocurre a 4°C tampoco puede ser generalizado, pues se observó aglutinación de eritrocitos vacunos por cepas de *E. coli* F17 en un rango de temperatura que osciló entre 4 y 37°C (los resultados a 37°C fueron idénticos a los mostrados en el trabajo). Esta hemaglutinación "temperatura resistente" pudiera sugerir una mayor afinidad por el receptor presente en los eritrocitos, aunque también se observaron variaciones entre las cepas (diferencias en el tamaño de los agregados y aglutinación en placas de microtitulación).

REFERENCIAS

- ABRAHAM, S.N. y E.H. BEACHEY (1985). "Host defenses against adhesion on bacteria to mucosal surfaces". En: *Advances in Host Defense Mechanisms, Vol. 4. Mucosal Immunity*, Raven Press, pp. 63-88.
- BEACHEY, E.H. (1981). Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* 143: 325-345.
- BOYER, H.W. y D. ROULLAND-DUSSOIX (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459.

- BRINTON, C.C., Jr. (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.
- COLSON, C.S.; S.W. GLOVER; N. SYMONDS y K.A. STACEY (1965). The location of genes for host controlled modification and restriction in *E. coli* K12. *Genetics* **52**: 1043-1050.
- DE GRAAF, F.K. y F.R. MOOI (1986). The fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Adv. Microbial Physiol.* **28**: 65-143.
- ESHDAT, Y.; F.J. SILVERBLATT y N. SHARON (1981). Dissociation and reassembly of *Escherichia coli* type 1 pili. *J. Bacteriol.* **148**: 308-314.
- FIRON, N.; I. OFEK y N. SHARON (1984). Carbohydrate-binding sites of the manose-specific fimbrial lectins of Enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* **43**: 1088-1090.
- GAASTRA, W. y F.K. DE GRAAF (1982). Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* **46**: 129-161.
- LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- LINTERMANS, P.F.; P. POHL; A. BERTELS; G. CHARLIER; J. VANDEKERCK HOVE; J. VAN DAMME; J. SCHOUP; C. SCHLICKER; T. KORHONEN; H. DE GREVE y M. VAN MONTAGU (1988). Characterization and purification of the F17 adhesin on the surface of bovine enteropathogenic and septicemic *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* **49**: 1794-1799.
- McMICHAEL, J.C. y J.T. OU (1979). Structure of common pili from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **138**: 969-975.
- MIRELMAN, D. y I. OFEK (1986). "Introduction to microbial lectins and agglutinins". En: *Microbial Lectins and Agglutinins-Properties and Biological Activity*. Ed. D. Mirelman. John Wiley & Sons, Inc. pp. 1-19.
- MOURICOUT, M.A. y R.A. JULIEN (1987). Pilus-mediated binding of bovine enterotoxigenic *Escherichia coli* to calf small intestinal mucins. *Infect. Immun.* **55**: 1216-1223.
- OFEK, I.; E.H. BEACHEY y N. SHARON (1978). Surface sugars of animal cells as determinants of recognition in bacterial adherence. *TIBS*, July, 159-160.
- SCHOUP, J.; E. VAN DRIESSCHE; R. ZEEUWS; P. LINTERMANS; P. POHL y L. KANAREK (1987). Preparation and partial characterization of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Att 25 fimbrial adhesin. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **95**: B94.
- SHARON, N. (1987). Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease. *FEBS Letters* **217**: 145-157.
- SMITH, H. (1977). Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol. Rev.* **41**: 475-500.
- VAN DRIESSCHE, E.; J. SCHOUP; G. CHARLIER; P. LINTERMANS; S. BEECKMANS; R. ZEEUWS; P. POHL y L. KANAREK (1988). "The attachment of *E. coli* F17+ to intestinal calf villi and to Eupergit-glycoproteins beads". En: *Lectins. Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*. Vol. 6, T.C. Bog Hansen & D.L.J. Freed Eds. Sigma Press, U.K. pp. 55-62.
- VAN DRIESSCHE, E.; G. CHARLIER; J. SCHOUP; S. BEECKMANS; P. POHL; P. LINTERMANS y L. KANAREK (1989). "The effect of lectins and monosaccharides on the *in vitro* attachment of *E. coli* F17+ to intestinal calf villi and immobilized glycoproteins". En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in legume seeds*. Eds. Huisman, J., van der Poel, T.F.B. and Liener, I.E., Pudoc Wageningen, pp. 43-48.