

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

PRODUCCION Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES EN CONTRA DE LA PORINA DE *C. jejuni*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :
NORMA ANGELICA CASTRO GUERRERO



MEXICO, D. F.

1999

275003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

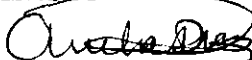
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Rodolfo Pastelín Palacios
VOCAL	Dr. Saturnino de León Chapa
SECRETARIO	M. en B. Amelia Díaz Barroso
1er SUPLENTE	QFB Patricia Elvira Berrón Ruiz
2° SUPLENTE	QFB Ruth Edith Martín Fuentes

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

ASESOR DEL TEMA:



M. en B. Amelia Díaz Barroso

SUSTENTANTE



Norma Angélica Castro Guerrero

Gracias

A Dios, por protegerme y guiarme cada momento de mi vida.

A mis padres, Lulú y Andrés, con todo mi corazón, por apoyarme cada instante de esta agotadora carrera. A ti mami por esos pequeños detalles que hicieron mas fácil mis estudios, y a ti papi por tu ejemplo y motivación para ser universitaria.

También le dedico este trabajo a mis hermanos, Lulú y Andrés, porque aunque lo nieguen, sé que me quieren y han estado pendientes de mis logros, como si fueran suyos. Gracias por su apoyo, que fue muy importante para cumplir este sueño.

A César, por estar a mi lado cada vez que lo he necesitado, por aguantar y cumplir mis caprichos, por sus regaños, y por ese gran amor que cada momento me ha demostrado.

A Rotsy, (Huang-hong-chen para los cuates), su amistad ha sido de las cosas más importantes que he tenido, total e incondicional, porque sé que siempre vas a estar conmigo.

A Nere, porque nos unen muchas cosas, pero sobre todo por compartir una amistad tan hermosa desde el primer día de clases.

A Ethel, por su dulzura y coraje, ¡y que coraje!, una mezcla extraña que la hace una chica muy especial y una de mis mejores amigas.

A Helen, ¿que puedo decir de Helen que nadie sepa?, es de lo mejor que ha dado Tlaxcala, y soy feliz de haberme topado con ella en mi camino.

A Lauro, porque en todos estos años, que ya son muchos, sigue aquí como un gran amigo, y sé que siempre contaré con él.

A mi maestro Jásocles, por sus enseñanzas y sobre todo porque me hizo reír muchísimo con sus ocurrencias en esos momentos de ocio, en clase por supuesto.

A Melly, mi asesora estrella, una excelente Química e Investigadora, (la mejor para mí), a la cual admiro. Agradezco todo el apoyo, (fué muchísimo), que recibí de ti. Todo el tiempo que invertiste en mí, la confianza que me diste, pero sobre todo, tu amistad, son cosas que nunca voy a olvidar y que hacen del tiempo que compartimos juntas en el laboratorio, de las mejores etapas de mi vida.

A Ara y Vero, mis segundas asesoras, pues participaron también en mi trabajo de tesis. con sus consejos y experiencia. Pero lo más importante es que somos amigas y que las quiero mucho.

Quiero agradecer a todos mis compañeros de la Facultad de Química, a los que me apreciaron y a los que no, con los cuales conviví en salones y en laboratorios, y aunque ahora ya no los veo, tengo muchas anécdotas que contar, buenas y malas, pero que me dejan gratos recuerdos.

Agradezco al Dr. Guillermo Ruiz-Palacios su apoyo y consentimiento para realizar este proyecto en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, lo que me permitió formar parte de una de las mejores instituciones del país

INDICE

	pág
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
INTRODUCCION.....	1
Epidemiología	
Campilobacteriosis	
Descripción del microorganismo e identificación en el laboratorio	
Mecanismos patogénicos	
Importancia de los anticuerpos policlonales en la caracterización de antígenos bacterianos	
HIPOTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	9
MATERIAL Y METODOS.....	10
RESULTADOS.....	24
DISCUSION.....	32
CONCLUSIONES.....	36
APENDICE DE SOLUCIONES.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	39

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	pág
TABLA 1: Características generales de <i>C.jejuni/coli</i>	4
TABLA 2: Cepas de <i>C. jejuni</i> utilizadas en esta tesis.....	11
TABLA 3: Bacterias utilizadas en el análisis de especificidad por la técnica de inmunofluorescencia.....	11
TABLA 4: Esquema de inmunización con la preparación antigénica de la porina de la cepa INN-I336 de <i>C. jejuni</i> en un conejo blanco de Nueva Zelanda.....	11
FIGURA 1: Esquema de trabajo general de Material y Métodos.....	12
FIGURA 2: Geles de poliacrilamida que muestran las proteínas presentes en los extractos ácidos (B) y en las fracciones membranales (C). Gel 1: Tinción con azul de coomassie para proteínas; Gel 2: Tinción con nitrato de plata para proteínas.....	24
FIGURA 3: Geles de poliacrilamida que muestran las proteínas presentes en las fracciones obtenidas en el proceso de purificación con sarcosinato de sodio y octil-POE. Gel 3:Tinción con nitrato de plata pára proteínas; Gel 4: Tinción con nitrato de plata amoniacal para lipopolisacárido.....	26
FIGURA 4: Titulación de sueros: basal e hiperinmune anti-pPME, contra la porina de <i>C. jejuni</i> mediante ELISA.....	27
FIGURA 5: Westernblot para determinar la reactividad del suero hiperinmune anti-pPME, utilizando el sistema biotina-estreptavidina.....	28
FIGURA 6: Fotografías que muestran los ensayos realizados con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el suero hiperinmune anti-pPME, contra: (A) <i>C. jejuni</i> INN-I336 dilución 1:125; (B) <i>C.jejuni</i> INN-C1336 dilución 1:500; (C) <i>C. jejuni</i> INN-C180, dilución 1:500; (D) <i>C. jejuni</i> INN-I336 cultivo de 72 horas donde predominan formas cocoides, dilución 1:500; (E) <i>Helicobacter pylori</i> , cultivo de 72 horas donde predominan formas cocoides, dilución 1:500; (F) Muestra de heces con <i>C. jejuni</i> , dilución 1:500.....	31

ABREVIATURAS

ACF	Adyuvante completo de Freund
Ag	antígeno
AIC	Adyuvante incompleto de Freund
<i>C. jejuni/coli</i>	<i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i>
<i>C.jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
Da	daltones
EA	extractos ácidos
ELISA	ensayo inmunoenzimático (del inglés: Enzyme linked immunosorbent assay)
FME	fracciones membranales externas
kDa	kilodaltones
LPS	lipopolisacárido
octil-POE	n-octilpolioxietileno
OPD	o-fenilendiamina
PM	pesos moleculares
PME	proteínas de membrana externa
pPME	principal proteína de membrana externa (porina)
SDS	dodecil sulfato de sodio
SSAF	Solución salina amortiguadora de fosfatos
SSI	Solución salina isotónica

RESUMEN

Campylobacter jejuni/coli (*C.jejuni/coli*) es uno de los principales causantes de enteritis en niños menores de 5 años, tanto en países desarrollados, como en vías de desarrollo.

Las proteínas de membrana externa están expuestas y en contacto con el hospedero por lo que la respuesta inmune de éste, se dirige principalmente hacia ellas.

La porina es la principal proteína de membrana externa de *C.jejuni*, está presente en un 70% en su superficie, además es altamente inmunogénica.

Se desarrolló un método de purificación utilizando sarcosinato de sodio y *n*-octilpolioxietileno (octil-POE), para obtener esta porina con un alto grado de pureza, conservando únicamente al lipopolisacárido como impureza.

Este antígeno (la porina), se utilizó para inmunizar a un conejo hembra blanco Nueva Zelanda con el fin de obtener anticuerpos policlonales a partir de su suero.

El suero anti-pPME fue caracterizado por los métodos de ELISA, Westernblot e inmunofluorescencia.

Por el método de ELISA se obtuvo un buen reconocimiento hacia el antígeno, mientras que por el método de Westernblot no hubo respuesta, lo que indicó que ésta estaba dirigida hacia la proteína no degradada.

Con el método de inmunofluorescencia, se realizaron ensayos con *C.jejuni* para valorar el grado de reconocimiento, además se efectuaron ensayos con otras bacterias patógenas y de flora habitual, para evaluar la especificidad.

Se obtuvieron resultados satisfactorios, ya que sólo se presentaron reacciones cruzadas muy débiles hacia algunas de estas bacterias, pero no en una dilución 1:500.

Por último se realizó un ensayo de inmunofluorescencia para detectar *C.jejuni* en una muestra fecal. La reactividad se presentó de manera específica sólo hacia *C. jejuni*, es decir, se desarrolló un método para poder detectar si *C.jejuni* es el agente causal cuando se cursa por un cuadro de enteritis, por lo que se sugiere el uso del método de inmunofluorescencia utilizando este anticuerpo policlonal como un método de diagnóstico rápido.

INTRODUCCION

EPIDEMIOLOGIA

Campylobacter jejuni (*C.jejuni*) es una bacteria gramnegativa, principal causante de enteritis en países en vías de desarrollo y desarrollados,^{5, 9, 38, 49} también puede ocasionar infecciones extraintestinales.⁴⁸

Las infecciones por *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* (*C.jejuni/coli*) son el principal problema de salud pública respecto a la enteritis que causan, ya que el número reportado de infecciones intestinales es significativamente mayor que aquéllas debidas a otros enteropatógenos, como: *Shigella sp*, *astrovirus* y *rotavirus*.^{16, 29, 30, 69}

En países desarrollados el pico de incidencia se encuentra en niños y en adultos jóvenes y es raro ver estas infecciones en personas mayores de 45 años, siendo mas frecuente en hombres que en mujeres.

Las infecciones por *Campylobacter* en países en desarrollo, tienen características clínicas y epidemiológicas diferentes, usualmente es descrita en niños sin un pico de incidencia en adultos, pero sí una alta incidencia de infecciones complicadas por un alto índice de cuadros asintomáticos.

Según el caso clínico de donde provengan, las cepas de *Campylobacter* se han clasificado en patógenas y no patógenas. *C.jejuni*, como causa de la diarrea del viajero, ha conducido a la observación de un cuadro de infección similar al descrito al del país de origen.⁴²

CAMPILOBACTERIOSIS

El espectro clínico de la infección entérica debido a *C. jejuni/coli* va desde una diarrea inflamatoria severa a una diarrea no-inflamatoria (secretora). La primera es la presentación clínica más común en pacientes de países industrializados, mientras que en países en desarrollo el patrón visto más frecuente es el segundo. La diarrea inflamatoria comienza con un cuadro prodrómico de dolor abdominal, seguido por fiebre y malestar general. Los síntomas progresan a una diarrea profusa que comienza secretora (acuosa). El período de incubación antes del comienzo de los síntomas es de 1 a 7 días. Las heces diarreicas contienen sangre fresca, moco y un exudado inflamatorio con leucocitos. La diarrea aguda, generalmente dura de 2 a 3 días, y el dolor abdominal y malestar continúan aunque la diarrea se haya detenido. Se llegan a ver recaídas, pero son menos severas que el primer ataque.⁴²

El tratamiento consiste en la rehidratación y corrección de electrolitos, ésta es la principal medida tomada para pacientes que presentan campilobacteriosis. Se ha debatido mucho el uso de agentes antimicrobianos en infecciones que no son fuertes, pero cuando son usados, el agente más recomendado es la eritromicina, porque la mayoría de las cepas son susceptibles a ésta. Si es administrada en el inicio de la infección, se reduce la excreción de la bacteria en heces y la recuperación del paciente es más rápida. Sin embargo, su uso en infecciones que cursan por una etapa tardía no muestra algún beneficio aunque puede disminuir, en algunos casos, la diarrea.

En pacientes que no son tratados con antibióticos, la excreción del microorganismo puede persistir de 2 semanas a 3 meses. El tratamiento en niños pequeños dentro de los centros de salud es razonable para evitar contagios secundarios.⁶⁴

DESCRIPCION DEL MICROORGANISMO E IDENTIFICACION EN EL LABORATORIO.

En términos morfológicos, las campilobacterias son bacilos gramnegativos de 1.5 a 6.0 μm de longitud y de 0.2 a 0.5 μm de ancho, los cuales se curvan en espiral. La célula generalmente posee un flagelo en uno o ambos extremos, lo que presumiblemente imparte un alto grado de movilidad a la bacteria. *C. jejuni/coli* son microaerofilicos (requieren una concentración de 3-15% de O_2 y una concentración de 3-5% de CO_2) y termofilicos, creciendo mejor a 42°C .⁴²

Las muestras de heces originalmente se reciben en fresco para su análisis, sin embargo, se ha empezado a manejar el medio de transporte Cary-blair, el cual preserva por más tiempo a las campilobacterias y otros patógenos que pudieran existir en la muestra.

El diagnóstico en el laboratorio se lleva a cabo con el primoaislamiento de *C.jejuni/coli* en un medio selectivo de carbón que contiene nutrientes como hidrolizado de caseína y desoxicolato sódico, pero también inhibidores, como: vancomicina, cefalotina y cicloheximida; además se incuba en condiciones microaerofilicas a 42°C . Un método alternativo, para el aislamiento de campilobacterias, es el resuspender 1 g de heces en caldo brucella y pasar la suspensión a través de una membrana de 0.65 μm , sembrando en agar sangre de carnero, e incubando a 37°C en atmósfera de hidrógeno, durante 48 h. Posteriormente se realiza la tinción de Gram, para observar la morfología típica de las campilobacterias, y se realizan la prueba de la oxidasa y la hidrólisis del hipurato.

(Tabla 1)

Tabla 1. Principales características de *C. jejuni* y *C. coli*.

Características generales	<i>C. jejuni</i>
morfología	espiral
movilidad	+
Características bioquímicas	
catalasa	+
oxidasa	+
hidrólisis del hipurato	+ (-)*
Crecimiento en medios	
glicina al 1 %	-
NaCl al 3.5 %	+
Susceptibilidad a antibióticos	
gentamicina	+
Ac. nalidíxico	+

* Para cepas de *C. coli*

MECANISMOS PATOGENICOS

Las infecciones causadas por *C. jejuni/coli* se pueden establecer de diferentes formas, como la gastrointestinal, que es la más común, pero también existen las extraintestinales como infecciones en el tracto urinario y meningitis, así como endocarditis y septicemia.⁶²

Poco se conoce acerca de su estructura, funcionalidad y mecanismos patogénicos. Los factores o determinantes de virulencia son multifactoriales en naturaleza, los principalmente descritos son: la adherencia, la invasividad y/o la capacidad de producir toxinas.²²

En asociación con comida o agua, las campilobacterias ingresan al intestino por vía oral y llegan al estómago colonizando el íleon distal y el colon.

Después de la colonización del moco y la adhesión a superficies celulares intestinales, las campilobacterias perturban la capacidad absorbente normal del intestino por daño en la función celular epitelial, directamente por invasión celular o por la producción de

toxinas, o indirectamente por la iniciación de una respuesta inflamatoria.³⁶

Algunas de las estructuras superficiales que participan en la adherencia o invasividad de *C.jejuni/coli* son el flagelo, las adhesinas, las proteínas de membrana externa (PME), las porinas (principal proteína de membrana externa: (pPME))⁶⁷ y el lipopolisacárido (LPS).

La movilidad de *Campylobacter sp.* se realiza mediante el flagelo, que es el determinante de virulencia mejor caracterizado de esta bacteria.⁴² Estudios iniciales han especulado que la adhesión a las células del hospedero sea realmente necesaria para que la bacteria permanezca en el intestino con una exitosa colonización del moco,⁴⁷ otros estudios han mostrado que la presencia de un flagelo purificado exógeno no bloquea la adhesión.^{52, 70}

Las proteínas de membrana externa de bacterias gram negativas sirven como interface entre el patógeno y el hospedero y juegan el papel más importante en la asociación entre ambos.⁴⁸

Estudios realizados por Buchanan, Kay y Lambden,^{12, 40, 46} con diversos patógenos mostraron que estas proteínas pueden participar en la adherencia del patógeno a las células del hospedero, en su invasión, en la resistencia a actividades bactericidas del suero, a la fagocitosis y al secuestro de hierro. Una gran variedad de proteínas de membrana externa de diversos patógenos gastrointestinales, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio cholerae* han sido bien caracterizados.⁴⁸

Por la importancia de estas proteínas en la virulencia y el interés de tipificar a las campilobacterias termofílicas se han descrito varias proteínas de membrana externa.^{19,23,41}

Otras proteínas de membrana externa son las porinas, proteínas transmembranales que están involucradas en la difusión de solutos a través de la membrana, y son la vía más

frecuente de comunicación entre la bacteria y el medio.³²

Se ha descrito, que la proteína más común en la membrana externa de *Campylobacter* presenta características fisicoquímicas de una porina.³⁷

Algunos estudios han demostrado que esta porina posee una forma trimérica (característica de estabilidad de proteínas de poro en las membranas), cuya migración electroforética se ve afectada por la temperatura de solubilización. Se ha reportado un peso molecular de 40 a 45 kDa, cuando la porina es desnaturalizada a 96°C, mientras que en muestras no calentadas, se observa un corrimiento de aproximadamente 35 kDa. Esta porina posee cierta resistencia a la degradación, por efecto de la presencia de detergentes, por el paso del tiempo, y por temperaturas menores a 50 °C.²⁸

IMPORTANCIA DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES EN LA CARACTERIZACION DE ANTIGENOS BACTERIANOS

Los anticuerpos, son inmunoglobulinas que reconocen y se enlazan a antígenos específicos. La forma usual para producir anticuerpos policlonaes es la inmunización de animales como: conejos, cerdos, borregos, caballos, entre otros, con preparaciones antigénicas purificadas o parcialmente purificadas. *Los antígenos generalmente utilizados, son proteínas o péptidos, aunque pueden emplearse también ácidos nucleicos, moléculas orgánicas pequeñas, células, etc.*

La calidad de los anticuerpos policlonaes depende principalmente de la cantidad, cualidad y pureza del antígeno utilizado en la inmización. Esta calidad se refleja en los ensayos inmunológicos, ya que éstos suelen ser altamente específicos y sensibles.

Una de las ventajas de la producción de los anticuerpos policlonaes, es la rapidez con la que pueden ser producidos, además de que en la elección del animal, se puede seleccionar uno que proporcione grandes cantidades de antisuero. El uso de este tipo de anticuerpo, proporciona al investigador, una herramienta valiosa para analizar diferentes antígenos bacterianos, y conocer como participan en los mecanismos patogénicos, como es su expresión; además permiten proponer técnicas inmunoquímicas para diagnóstico o estudios epidemiológicos.

Una de las utilidades de los anticuerpos policlonaes, es su empleo en métodos de diagnóstico, es decir, las técnicas inmunoquímicas se enfocan a experimentos destinados a comprender la cinética y estequiometría de las reacciones antígeno-anticuerpo. En este tipo de ensayos se generan señales que pueden ser producidas por fluorescencia,

quimioluminiscencia, radioactividad o sistemas enzimáticos (ELISA, Westernblot). Particularmente, la fluorescencia es un método ampliamente usado para la localización de antígenos cuya señal determina la presencia o concentración de un analito.

Considerando que la porina es el mayor componente de la membrana externa de *C.jejuni*, en este trabajo se propuso caracterizar un anticuerpo policlonal producido contra ella, para proponer métodos de diagnóstico rápidos y confiables en la campilobacteriosis.

HIPOTESIS

Debido a la importancia de producir anticuerpos policlonales de una gran especificidad que permitan realizar ensayos confiables, es necesario emplear en la inmunización un antígeno con un alto grado de pureza.

La caracterización de este anticuerpo policlonal por métodos inmunoenzimáticos como el ELISA, Westernblot e inmunofluorescencia conducirá a proponer un método de diagnóstico para la detección de *C. jejuni* de manera más sencilla y rápida en comparación a los métodos de diagnóstico utilizados actualmente.

OBJETIVOS GENERALES

- Producir un anticuerpo policlonal contra la porina de *C.jejuni* INN-I336.
- Caracterizar los anticuerpos policlonales producidos, por medio de ensayos inmunoenzimáticos como: ELISA y Westernblot (inmunotransferencia de proteínas) y técnicas immunoquímicas como la inmunofluorescencia.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Purificar la porina por medio de extracciones con sarcosinato de sodio y n-octilpolioxietileno, utilizando la cepa de *C.jejuni* INN-I336.
- Establecer el método de ELISA para la detección de anticuerpos específicos contra la porina de *C.jejuni*.
- Establecer el método de Westernblot para la detección de anticuerpos específicos contra la porina de *C.jejuni*.
- Establecer la técnica de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos específicos contra la porina de *C.jejuni*.
- Analizar la especificidad y sensibilidad del anticuerpo producido, por inmunofluorescencia.

MATERIAL Y METODOS

RESUMEN

El trabajo experimental de esta tesis, se llevó a cabo utilizando una cepa aislada de un niño con diarrea disenteriforme proveniente de una cohorte estudiada por el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Esta cepa se cosechó en un medio bifásico de brucella, y el antígeno de interés (la porina), se purificó eliminando los extractos ácidos y las proteínas de membrana externa y, tratando con detergentes, tales como el sarcosinato de sodio y el n-octilpolioxi-etileno (octil-POE). El análisis de la proteína purificada se realizó por medio de corrimientos electroforéticos teñidos para proteínas (coomassie y plata) y para el lipopolisacárido (plata). Con el antígeno, se inmunizó un conejo blanco Nueva Zelanda, obteniéndose el suero hiperinmune, es decir, los anticuerpos policlonales, los cuales fueron caracterizados por ensayos inmunoenzimáticos, tales como ELISA y Westernblot (inmunotransferencia de proteínas) utilizando el antígeno desnaturalizado o sin desnaturalizar.

Se analizó la especificidad realizando ensayos de inmunofluorescencia con diferentes cepas de *Campylobacter sp.* (Tabla 2) y otras bacterias causantes de diarrea (Tabla 3), e incluso con bacterias que habitualmente se han encontrado en heces (de los niños de la cohorte estudiada), y que pertenecen a la flora normal.

Tabla 2: Cepas de *C.jejuni* utilizadas en esta tesis

CEPA	ORIGEN
INN-I336	Cuadro disenteriforme
INN-S286	Cuadro asintomático
INN-M240	Cuadro secretor
INN-C180	Cuadro secretor

Tabla 3: Bacterias utilizadas en la técnica de inmunofluorescencia

BACTERIA	ORIGEN
<i>Escherichia coli</i>	Flora normal
<i>ETEC (E.coli enterotoxigénica)</i>	Cuadro diarreico
<i>Shigella sonnei</i>	Cuadro diarreico
<i>Morganella sp.</i>	Flora normal
<i>EPEC (E.coli enteropatógena)</i>	Cuadro diarreico
<i>Citrobacter sp.</i>	Flora normal
<i>Salmonella enteritis</i> # 2160 Brote 12-06-98	Cuadro diarreico
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883 18-01-96	Flora normal
<i>Enterobacter sp</i>	Flora normal
<i>Aeromonas hydrophila</i> #1938 23-03-98	Cuadro diarreico
<i>Proteus sp.</i>	Flora normal
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Cuadro diarreico
<i>Vibrio Cholerae</i> 01 Biotipo El Tor	Cuadro diarreico
<i>Helicobacter pylori</i> CCUG 17 874	Gastritis o úlcera

Finalmente, para observar la sensibilidad del método de inmunofluorescencia, el cual se propone como método diagnóstico, se realizó el ensayo en una muestra fecal mezclada con una suspensión bacteriana de *Campylobacter* a diferentes diluciones.

Campylobacter jejuni INN-1336

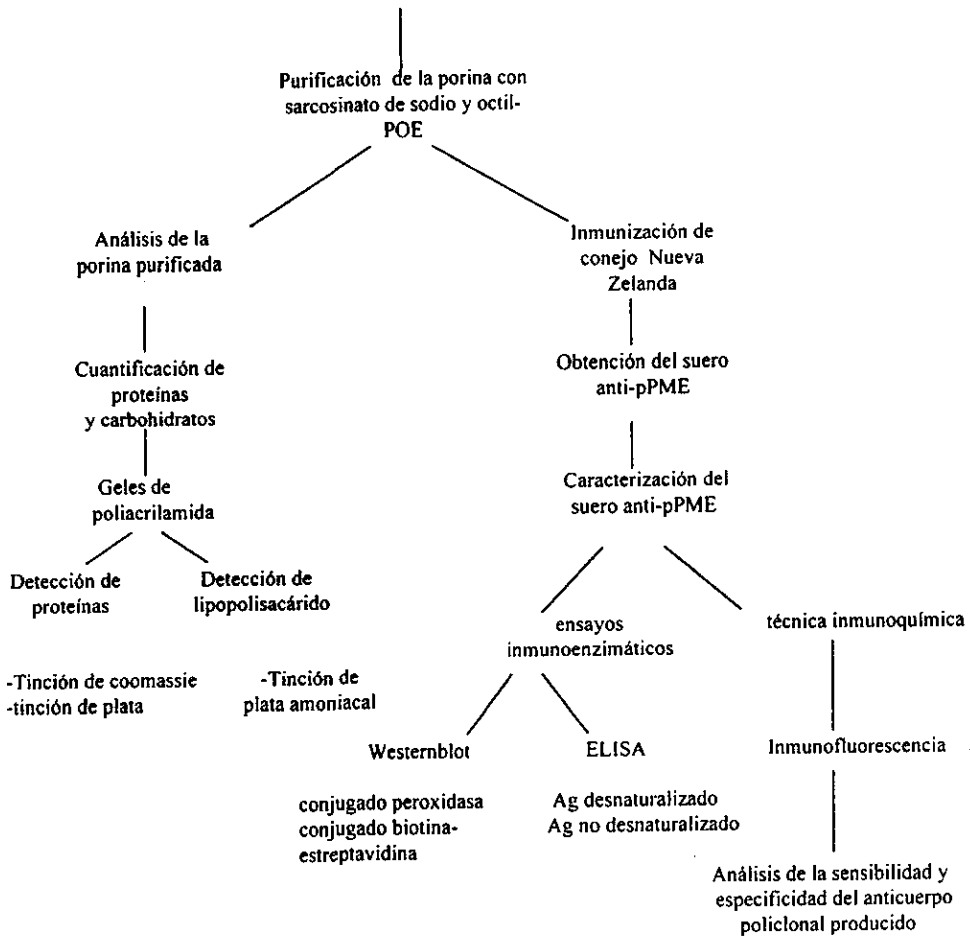


Fig 1. Esquema de trabajo general de esta tesis

PURIFICACION DE LA PORINA DE *Campylobacter jejuni* cepa INN-I336

Material

- . agar brucella suplementado con 4% de sangre de carnero
- . medio brucella bifásico agar: caldo (1:2)
- . matraces 125 mL
- . asa bacteriana
- . incubadora a 42°C
- . espectrofotómetro Spectronic 20D Milton Roy Company
- . centrífuga Sorvall RC-5B DuPont
- . tubos de centrífuga
- . sonicador Lab-Line Modelo 9322
- . matraz de 125 mL
- . ultracentrífuga Sorvall Ultracentrifuge Combi Du Pont

Método

La cepa de *C. jejuni* fue recuperada en agar brucella suplementada con sangre de carnero al 4%, incubada en condiciones microaerofílicas a 42 °C. Después de un crecimiento de 24 horas, se inocularon 5.39×10^5 UFC al medio brucella bifásico. La incubación, se realizó en condiciones aerofílicas sin agitación, por 48 horas a 37 °C. Después, se cosechó la bacteria centrifugando 20 minutos a 5000 x g.

El paquete obtenido se lavó 2 veces con 10mM Tris-HCl-1mM EDTA pH 7.2, centrifugando cada vez por 1 hora a 10000 x g. Para eliminar los antígenos de extracción ácida, el paquete fue resuspendido en glicina-HCl 0.2 M pH 2.2 en una proporción de 100 mL de solución por cada 3 gramos de células, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó por 15 minutos a 12000 x g. El paquete fue lavado 2 veces, por 30 min cada vez, con una solución de Tris- HCl (10 mM) con EDTA (1 mM) pH 7.2, para eliminar el exceso de HCl.

Se sonicó el paquete en la misma solución amortiguadora (Tris-HCl-EDTA) por

períodos de 30 segundos 10 veces y se recuperaron los fragmentos de bacteria por centrifugación a 6000 x g por 30 minutos. El sobrenadante obtenido se sometió a una ultracentrifugación a 100000 x g por 1 hora, obteniéndose el paquete rico en fracciones membranales.

Después se realizó el tratamiento con los detergentes, de la siguiente manera: las proteínas de membrana externa se obtuvieron con dos extracciones de sarcosinato de sodio al 0.1 %, en cada una se incubó por 20 minutos a 37 °C y se centrifugó 1 hora a 100000 x g. A la fracción insoluble, que contiene a las PME, se le realizaron 4 extracciones con octil-POE, 2 al 0.5% y otras 2 al 3%; en cada etapa se incubó durante 20 min a 37°C y se centrifugó 1 hora a 100000 x g. De los cuales se obtuvo el sobrenadante rico en porina, al cual se le cuantificaron proteínas, carbohidratos y se analizó mediante geles de poliacrilamida.

ANALISIS DE LA PURIFICACION

Cuantificación de proteínas

Material

- . albúmina
- . tubos ependorf de 500 μ L
- . Reactivo concentrado para cuantificación de proteínas Bio-Rad No. Cat. 5000-0006

Método

Se determinó la concentración de proteínas en cada una de las fracciones obtenidas por el micrométodo de Bradford. En el microensayo se prepararon los estándares en tubos de

microcentrífuga para obtener las siguientes concentraciones: 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 y 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A 400 μL de diluyente (agua destilada) se le quitaron 16 μL y se adicionaron 16 μL de albúmina (2 mg/mL), a éste estándar se le denominó con el número 1, los demás estándares se prepararon realizando diluciones 1: 2.

En los pozos de una microplaca de 96 se depositaron 160 μL de agua destilada (blanco), del estándar correspondiente y de las muestras problema (se deberá escoger en cada caso la dilución de las muestras). Se adicionaron 40 μL del reactivo de Bio-Rad a todos los pozos y se mezclaron perfectamente. Se leyó absorbancia a 595 nm y se realizó una curva con las densidades ópticas de cada uno de los estándares con respecto a su concentración, en la cual se interpolaron las densidades ópticas de las muestras problema. ¹¹

Cuantificación de carbohidratos

Material

- . microplaca de poliestireno de 96 pozos
- . glucosa
- . solución de fenol al 5 %
- . solución de ácido sulfúrico concentrado
- . Microplate reader Model 3550-UV Bio-Rad

Método

Se realizó la determinación de carbohidratos con muestras estándar de glucosa en solución a concentraciones de 2 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las lecturas colorimétricas de este ensayo sirvieron para obtener una curva patrón, o bien introducir estas cantidades como control

interno dentro del desarrollo del micrométodo. Se depositaron 20 μL de muestras estándar o muestras problema o solución blanco. Se adicionaron 20 μL de solución de fenol al 5% a cada pozo y se agitó la placa lentamente durante 30 segundos. Se depositaron en cada pozo 100 μL de ácido sulfúrico concentrado y cuidadosamente se agitó durante 2 minutos. Se dejó reposar durante 5 minutos y después se leyeron absorbancias a 492 nm.

Electroforesis

Material

- cámara de electroforesis (Bio-Rad Mini Protean II; No. de catálogo 125BR 04794).
- solución amortiguadora de corrida pH 8.4 (ver apéndice de soluciones)
- solución de acrilamida/bisacrilamida (ver apéndice de soluciones)
- solución 4x Tris-HCl/SDS pH 6.8 (ver apéndice de soluciones)
- solución 4x Tris-HCl/SDS pH 8.8 (ver apéndice de soluciones)
- solución de tinte de Coomassie
- soluciones para la tinción de plata para proteínas.³⁴
- soluciones para tinción de plata para LPS.²⁶

Método

Se realizaron corrimientos electroforéticos por el método descrito de Laemmli⁴⁵ con geles al 15 % de acrilamida, para condiciones desnaturizantes. Así mismo se usaron soluciones amortiguadoras de muestra al 0.1 y al 4 % de SDS y soluciones amortiguadoras de corrida de 0.01 y 0.1 de SDS respectivamente. Unos geles se tiñeron con solución de tinte de Coomassie y otros con nitrato de plata para proteínas y nitrato de plata amoniacal para lipopolisacárido.^{26, 34}

PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA PORINA DE *C. jejuni* INN-I336

Esquema de inmunización

Se inmunizó un conejo blanco Nueva Zelanda hembra de dos meses de edad con 2 kg de peso. Antes de la inmunización se sangró al conejo para obtener el suero correspondiente al estado basal de anticuerpos. El esquema de inmunización se muestra en la Tabla 4:

Tabla 4: Esquema de inmunización con la porina en conejo blanco Nueva Zelanda

Día	Vía	Volumen de antígeno	Concentración de PME (µg/mL)
0	subcutánea	500 µL de Ag + 500 µL ACF	20
10	i.m.	150 µL de Ag + 50 µL AIF	50
17	i.v.	150 µL de Ag	30
24	i.v.	150 µL de Ag	30

i.v. = intravenosa; i.m. = intramuscular; ACF= adyuvante completo de Freund; AIF= adyuvante incompleto de Freund.

Nota: Al finalizar el esquema de inmunización, el conejo se sangra a blanco.

Se caracterizaron los anticuerpos obtenidos mediante ELISA, Westernblot e inmunofluorescencia.

CARACTERIZACION DE LOS ANTICUERPOS POLICLONALES

La caracterización del suero hiperinmune obtenido, se realizó mediante ensayos inmunoenzimáticos utilizando el antígeno con el que fue inmunizado el conejo. Existen métodos que permiten hacer un análisis conformacional de las proteínas como el ELISA, mientras que otros no, debido a que en el proceso se desnaturalizan las proteínas, como es el caso del Westernblot.

Estandarización del ELISA para determinar la concentración adecuada de antígeno (porina)

Material

- espectrofotómetro de luz visible (Bio-Rad)
- microplaca de poliestireno de 96 pozos (Nunc)
- solución salina amortiguadora de fosfatos-tween (SSAF-tween) al 0.05% (ver apéndice de soluciones)
- solución salina amortiguadora de fosfatos-albúmina (SSAF-albúmina bovina) al 1.5% (ver apéndice de soluciones)
- solución salina amortiguadora de fosfatos-albúmina (SSAF-albúmina bovina) al 0.15% (ver apéndice de soluciones)
- solución salina amortiguadora de fosfatos-tween (ver apéndice de soluciones)
- conjugado (Sigma)(anti-humano o anti-conejo marcados con peroxidasa. DAKO)
- orto-feniléndiamino (OPD) (Sigma p1526)
- solución amortiguadora de citratos (ver apéndice de soluciones)
- peróxido de hidrógeno (Baker)
- solución de paro (ver apéndice de soluciones)

Método

Se sensibilizó con el antígeno una placa de poliestireno, adicionando en cada pozo, la porina purificada en concentraciones de 0.6, 1.25, 2.5 y 5 µg / mL diluido en SSAF.

colocando 100 μ L por pozo. Se cubrió la placa con una mica y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente, se realizaron 3 lavados con solución de SSAF-tween y se secó la placa perfectamente.

Se bloquearon los espacios vacíos, adicionándole 100 μ L de SSAF-albúmina al 1.5% a cada pozo. Se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Se realizaron 3 lavados con solución de SSAF-tween y se secó la placa perfectamente. Se adicionó por duplicado el suero hiperinmune de conejo a diferentes diluciones (1:25 a 1:390625) en SSAF-albúmina 0.15%, colocando 100 μ L por pozo y se incubó durante 1.5 h a 37°C.

Se realizaron 3 lavados con solución de SSAF-tween y se secó perfectamente la placa. Se adicionaron 100 μ L del conjugado, diluyéndolo con solución de SSAF-tween según indicaciones del fabricante (1:1000). Se incubó durante 1 h a 37°C.

Se realizaron 5 lavados con solución de SSAF-tween y 2 lavados con SSAF.

Se adicionaron 100 μ L de solución de revelado (10 mL de solución amortiguadora de citratos, 5.4mg de OPD y 5 μ L de peróxido de hidrógeno) a cada pozo y se mantuvo la placa en la obscuridad hasta observar la coloración deseada en los controles (generalmente de 5 a 15 min.). La reacción se detuvo adicionando 50 μ L de solución de paro a cada pozo. Se leyó la absorbancia a 492.

Titulación de los Anticuerpos

Se titularon los sueros preinmune e hiperinmune utilizando las siguientes concentraciones 1:25, 1:125, 1:625, 1:3125, 1:15625, 1:78125, y 1:390625, depositando 100 μ L por pozo y siguiendo el proceso descrito anteriormente.

Westernblot (inmunotransferencia de proteínas)

Material

- . Papel filtro
- . Papel de nitrocelulosa (Bio-Rad No.cat.162-0115)
- . 2 esponjas
- . Cámara para inmunotransferencia (Bio-Rad No.cat.015026)
- . Solución de transferencia (ver apéndice de soluciones)
- . Solución de leche descremada (Bio-Rad No.cat.170-6404) al 5% en SSAT
- . Solución amortiguadora de tris (SSAT) (ver apéndice de soluciones)
- . Solución amortiguadora de tris-tween (SSAT-tween) (ver apéndice de soluciones)
- . Conjugado (anti-humano, anti-conejo marcados con peroxidasa. DAKO)
- . α -naftol (SIGMA N2780)
- . Metanol (Baker 9070-62)
- . Peróxido de hidrógeno (Baker)

Método

Se realizó la electroforesis como se indica anteriormente. Se cortaron 4 piezas de papel filtro y 1 de papel de nitrocelulosa, aproximadamente del mismo tamaño que el gel, se humedecieron en solución salina amortiguadora de transferencia. Se extrajo el gel de la cámara y se dejó en contacto con el lado opaco del papel de nitrocelulosa.

Se colocaron 2 piezas de papel filtro sobre el papel de nitrocelulosa y las otras 2 piezas sobre el gel; posteriormente, se colocaron 2 esponjas (una de cada lado) formando un "sandwich". Se puso el "sandwich" en un "cassette" para transferencia teniendo cuidado de que el papel de nitrocelulosa quedara colocado hacia el ánodo (cara transparente). Se colocó el "cassette" en la cámara de electrodos, con solución de transferencia. Se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se realizó la corrida a 100 Volts durante 1 h a 4°C, al término de la corrida se secó el papel de nitrocelulosa con un papel absorbente. Para comprobar la transferencia del papel de nitrocelulosa se cortaron los

marcadores de peso molecular y se reveló con una tinción de amidoblack o Ponceau-S.

Para realizar el ensayo inmunoenzimático, se bloquearon los espacios vacíos del papel de nitrocelulosa durante 30 minutos a 37°C con agitación empleando SSAT-leche al 5%. Se retiró la solución anterior y se puso en contacto el papel con el suero hiperinmune de conejo anti-porina con las siguientes diluciones: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 y 1:8000; utilizando como diluyente la solución de bloqueo diluida 1:3 con SSAT, también se enfrentó con el suero preimmune de conejo (basal). Se dejó incubando durante 1.5 h a 37°C o 18 h a temperatura ambiente de preferencia con agitación. La solución anterior se desechó y el papel se lavó 3 veces con solución SSAT, de 10 minutos cada lavado. Después del último lavado el papel se dejó secar y se puso en contacto con la cantidad adecuada de conjugado anti-conejo con peroxidasa diluido con SSAT-tween al 0.05%. Se dejó en agitación durante 18 h a 4°C o durante 1.5 h a 37 °C. El papel se sacó de la bolsa y se lavó 3 veces con SSAT-tween durante 30 minutos, (cada lavado de 10 minutos). Finalmente, se lavó en SSAT para eliminar el tween. El papel se puso en contacto con 18 mL solución de revelado (Sol 1: 15 mL de solución salina amortiguadora de tris + 9 µL de peróxido de hidrógeno; Sol 2: 9 mg de α-naftol + 3 mL de metanol frío. Se prepararon ambas por separado y al momento de usarlas se unen). La reacción se detuvo a través de varios lavados con agua destilada. El papel se dejó secar en un papel absorbente.

También se realizó la técnica utilizando el sistema biotina-estreptavidina, dejando incubar 1 hora el anti-anticuerpo con biotina, se hicieron los lavados acostumbrados, y después se dejó en contacto con estreptavidina marcada con peroxidasa por 1 hora, se realizaron los lavados y se reveló.

Inmunofluorescencia

Material

- . portaobjetos
- . metanol absoluto (J.T.Baker)
- . Solución salina amortiguadora de fosfatos para inmunofluorescencia pH 8.0 (SSAF) (ver apéndice de soluciones)
- . Solución salina amortiguadora de fosfatos para inmunofluorescencia pH 8.0-tween (SSAF-tween) (ver apéndice de soluciones)
- . conjugado anti-conejo fluoresceinado F0205 DAKO
- . espectrofotómetro Spectronic 20D Milton Roy Company

Método

Se fijaron 20 μ L de una suspensión bacteriana en solución salina esteril (D.O. a 660 nm de 0.06 a 0.10) en un área de 1 cm², después se fijaron con metanol absoluto durante 30 segundos. Se bloquearon los espacios vacíos con albúmina al 1% en SSAF por 5 minutos, lavando posteriormente con agua desionizada y secando al aire. Se pusieron en contacto las placas con el suero hiperinmune del conejo en diferentes concentraciones: 1:250, 1:500, 1:1000 y 1:2000 en SSAF-tween adiconado de albúmina bovina al 0.1%, por 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Se lavaron con SSAF-tween 3 veces, de 5 minutos cada lavado y se dejaron secar al aire. Se puso en contacto con el conjugado en una dilución 1:40 (según indicaciones del fabricante), por 30 minutos en cámara húmeda a 37°C, se cuidaron de la luz las placas para evitar dañar la fluoresceína.

Posteriormente se realizaron 3 lavados con SSAF-tween en oscuridad, de 5 minutos cada lavado. Se secaron las preparaciones a 37°C y se les puso glicerol al 90% y un cubreobjetos. Se observaron en el microscopio de fluorescencia.

Se realizaron ensayos de especificidad con las diferentes cepas mostrados en la tabla 3, diluyendo el anti-pPME 1:250 y 1:500.

Por último se realizó un ensayo con 1 gramo de heces y 500 µL de las siguientes diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 a partir de una suspensión bacteriana con D.O. a 660 nm de 0.96, de la cepa *C. jejuni* INN-I336.

Además se analizó la diferente reactividad en formas cocoides y formas bacilares de la cepa *C. jejuni* INN-I336 y en la cepa de *Helicobacter pylori* CCUG 17874.

RESULTADOS

La purificación de la porina, se realizó de acuerdo a los métodos descritos por Bolla.⁹ el grado de pureza obtenido del antígeno (la porina) se valoró por medio de corrimientos electroforéticos con geles de poliacrilamida-SDS al 15%, y se realizaron tinciones con azul de coomassie y plata para identificar las proteínas y el lipopolisacárido presentes.

Para el análisis del proceso de purificación del antígeno, se obtuvo en la primera etapa una fracción membranal rica en porina, por la eliminación de los antígenos de extracción ácida (carril B de ambos geles de la Fig. 2) y que están constituidos por proteínas de bajo peso molecular, principalmente una de 28 y 34 kDa. En el carril C de la Fig. 2 y en ambos geles se observa a varias proteínas, predominantemente una proteína de 45 y 46 kDa que corresponde a la porina.

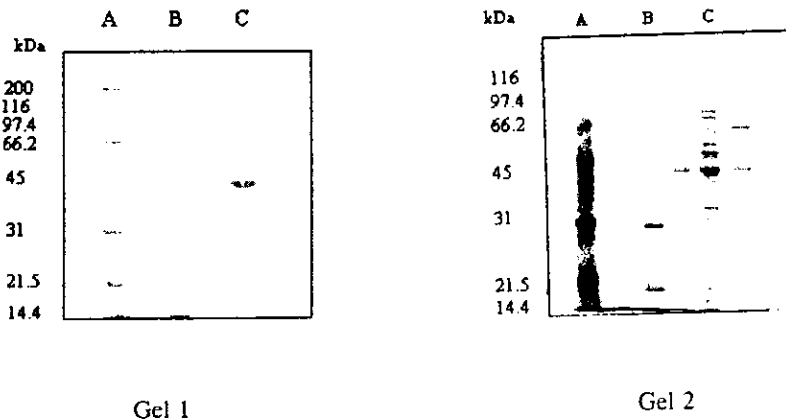
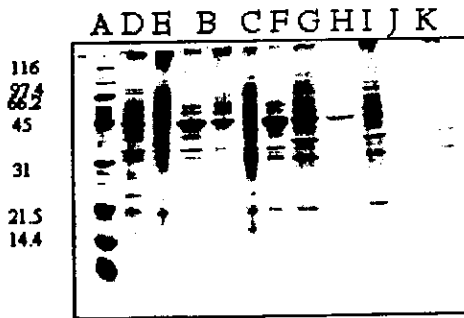


Fig 2: Caracterización de las fracciones obtenidas durante la primera etapa de la purificación. Estas fracciones fueron preparadas como se describe en Material y Métodos y se realizaron en geles de poliacrilamida-SDS al 15 %.

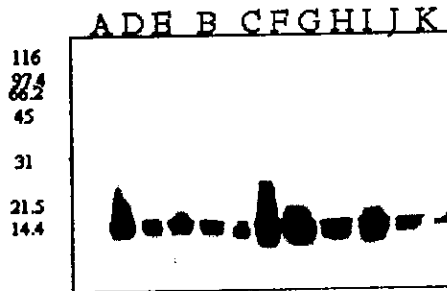
Gel 1: Proteínas teñidas con azul de Coomassie. Carril A, pesos moleculares; carril B, extracto ácido obtenido con glicina-HCl; carril C, fracción membranal rica en porina.

Gel 2: Proteínas teñidas con nitrato de plata. Carril A, pesos moleculares; carril B, extracto ácido obtenido con glicina-HCl; carril C, fracciones membranales ricas en porina obtenidas de la cepa INN-1336.

En la segunda etapa, con el uso de sarcosinato de sodio y octil-POE, se obtuvo la porina purificada. En el gel 3 se aprecian las proteínas obtenidas en cada paso de las extracciones, en el carril B se aprecian las proteínas insolubles en sarcosinato de sodio al 0.1%, entre ellas una de 46 kDa que corresponde a la porina, en el carril C se ven las proteínas de diferentes pesos moleculares, obtenidas en la fracción soluble del detergente. Después en el tratamiento con el octil-POE, se detectó la proteína de interés, en la fracción soluble (carriles D, F, H y J), mientras que en la parte insoluble (carriles E, G, I y K) se observan también a otras bandas de diferente peso molecular. En el gel 4 se realizó el corrimiento electroforético de las mismas muestras, pero se tiñó al lipopolisacárido (LPS) con nitrato de plata amoniacal. El gel muestra que no logra eliminarse con el sarcosinato de sodio, ni con el octil-POE y que está presente en las fracciones que contienen a la porina (carriles D, F, H y J) (Fig 3).



Gel 3



Gel 4

Fig 3: Caracterización de las proteínas membranales tratadas con sarcosinato de sodio y octil-POE. Estas fracciones fueron preparadas como se describe en Material y Métodos y se realizaron en geles de poliacrilamida-SDS al 15 %. En el gel 3 se tiñeron proteínas con nitrato de plata y en el Gel 4 se tiñó al LPS con nitrato de plata amoniacoal. Carril A, pesos moleculares; carril B, fracciones solubles en sarcosinato de sodio al 0.1%, de la primera y segunda extracción; carril C, fracción insoluble en sarcosinato de sodio al 0.1%; carril D, primera fracción soluble de la extracción con octil-POE al 0.5%; carril E, primera fracción insoluble de la extracción con octil-POE al 0.5%; carril F, segunda fracción soluble en octil-POE al 0.5%; carril G, segunda fracción insoluble de la extracción con octil-POE al 0.5%; carril H, primera fracción soluble de la extracción con octil-POE al 3 %; carril I, primera fracción insoluble de la extracción con octil-POE al 3 %; carril J, segunda fracción soluble de la extracción con octil-POE al 3%; Carril K, segunda fracción soluble de la extracción con octil-POE al 3%.

Con la preparación antigénica de la porina, se inmunizó a un conejo blanco Nueva Zelanda, siguiendo el esquema de inmunización descrito en Material y Métodos.

Se colectó sangre del animal antes y después de la inmunización, y de su suero se determinó la presencia de anticuerpos específicos anti-pPME. El método elegido para realizar esta medición fue un ensayo inmunoenzimático (ELISA), en el cual se evaluó la respuesta inmune del conejo hacia la porina.

En el ELISA se estandarizó la concentración óptima de antígeno para el recubrimiento de las placas, con varias diluciones de antígeno. La concentración óptima fue de 1 $\mu\text{g/mL}$.

Determinada la concentración de antígeno adecuada al ensayo, se titularon el suero basal y el suero hiperinmune. Las diluciones utilizadas fueron desde 1:25 hasta 1:390625. El título del suero hiperinmune fue de 1:7000. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.

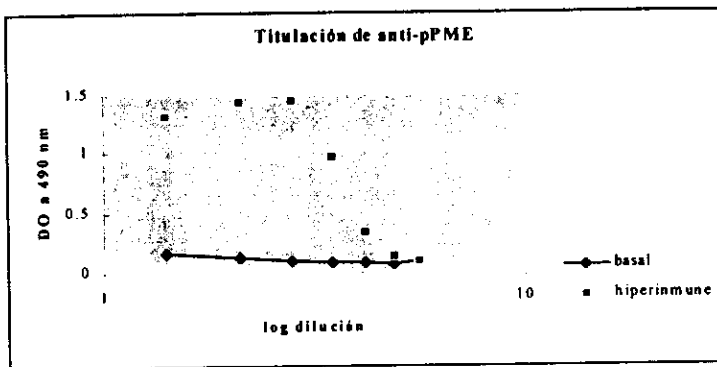


Figura 4 Gráfica de la titulación de suero basal y del suero hiperinmune anti-pPME de *Campylobacter jejuni*

Para valorar si la respuesta inmune del conejo era contra la porina o contra el LPS presente como impureza en el antígeno utilizado para inmunizar al conejo, se realizó un ELISA en el que el antígeno fue calentado y resuspendido en una solución amortiguadora que contenía SDS y β -mercaptoetanol, de esta manera se desnaturalizó a la porina pero se conservó el LPS. Los resultados mostraron que no existió reconocimiento del suero hiperinmune hacia el antígeno desnaturalizado. (Datos no mostrados)

La caracterización del suero anti-pPME también se hizo por Westernblot. Para su estandarización se realizó un ensayo incubando el suero anti-pPME por 1 hora y otro por toda la noche. Se utilizó en ambos un conjugado anti-conejo con peroxidasa.

En ninguno de los casos se detectaron reactividades hacia la porina (datos no mostrados), por lo cual se realizó otro ensayo, utilizando un sistema más sensible: el de biotina-estreptavidina, donde se obtuvo reactividad hacia bandas de diferentes pesos moleculares.

(Fig 5).

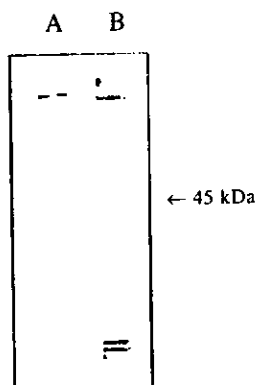


Figura 5 Westernblot para determinar la reactividad del suero hiperinmune anti-pPME, utilizando el sistema biotina-estreptavidina. Carril A: suero basal, carril B: dilución 1:125.

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron con cepas de *C. jejuni* causantes de diferentes cuadros de enteritis y con cepas de otras bacterias presentes en el intestino de humanos, como patógenos o como flora habitual; con la finalidad de evaluar la especificidad del suero anti-PPME.

Se obtuvo reconocimiento franco del anticuerpo policlonal hacia la cepa *C.jejuni* INN-1336 utilizada para la inmunización hasta en un título de 1:1000. Asimismo, se obtuvo un buen reconocimiento de este anticuerpo, hacia otras cepas de *C.jejuni*, productoras de diferentes cuadros de enteritis (S286, M240 y C180) con un título de 1:500 (Fig. 6, fotos A, B y C). Con otras cepas patógenas o de flora habitual, hubo un reconocimiento muy débil hacia las cepas de *Shigella*, *ETEC* y *Klebsiella* en un título de 1: 250, pero no en un título 1:500. La inmunofluorescencia se presentó con una tonalidad verde. (fig. 6)

Se realizó un ensayo adicional con bacterias de *C.jejuni* y *Helicobacter pylori* provenientes de cultivos de 72 horas, en donde predominaron las formas cocoides. Con la cepa de *Helicobacter pylori*, se observó reactividad hacia las formas cocoides y bacilares, aunque este reconocimiento fue débil y de tonalidad naranja, en una dilución de 1:500; en cambio, el reconocimiento hacia el cultivo viejo de *C. jejuni* fue similar al de las formas bacilares de la misma cepa. (Fig 6, fotos D y E)

En el ensayo realizado con la muestra de heces, se observan inespecificidades con diferentes tonalidades, y resaltan las bacterias de *C. jejuni* con una tonalidad verde intensa. (Fig 6, foto F)

FALTA PAGINA

No.

30

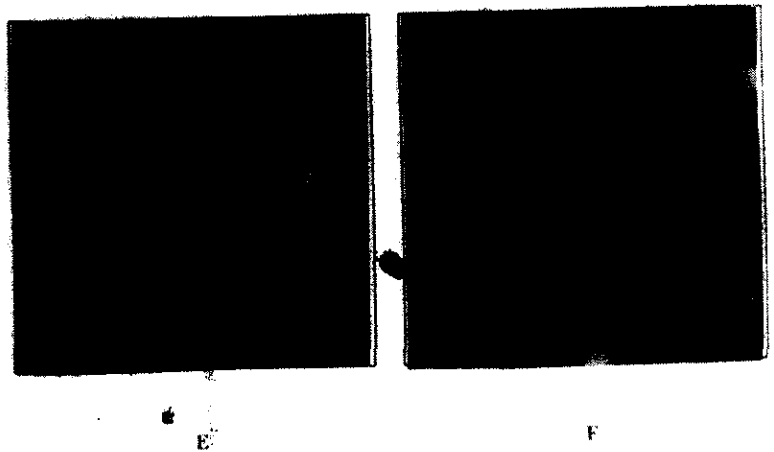


Figura 6: Fotografías que muestran los ensayos realizados con la técnica de inmunofluorescencia utilizando el suero hiperinmune anti-pPME, contra: (A) *C. jejuni* INN-1336 dilución 1:125; (B) *C. jejuni* INN-C1336 dilución 1:500; (C) *C. jejuni* INN-C180, dilución 1:500; (D) *C. jejuni* INN-1336 cultivo de 72 horas donde predominan formas cocoides, dilución 1:500; (E) *Helicobacter pylori*, cultivo de 72 horas donde predominan formas cocoides, dilución 1:500; (F) Muestra de heces con *C. jejuni*, dilución 1:500

DISCUSION

Las proteínas de membrana externa juegan un papel muy importante en la asociación entre la bacteria y el hospedero. A través de estas proteínas la bacteria está en comunicación con el ambiente que la rodea. Participan en la adhesión, resistencia o paso de solutos, como sucede con las porina, que en *Campylobacter*, constituyen aproximadamente el 70% de su membrana ⁴⁸ y que se ha reportado, participa en la adherencia. ⁶⁵

Obtener la porina de *C. jejuni* con un alto grado de pureza era esencial para producir anticuerpos policlonales con la menor heterogeneidad posible. Se purificó la porina de la cepa INN-I336 a partir de un medio bifásico de agar-caldo brucella, que ha sido recomendado para una mejor expresión de proteínas de membrana externa (PME). ^{4, 9}

Después se eliminaron los antígenos de extracción ácida, es decir, las proteínas de bajo peso molecular, ^{49, 58} como se observa en la fig 2, geles 1 y 2 (carril B). Se utilizó la sonicación para separar los fragmentos celulares restantes de la bacteria, y obtener las PME. Se ha recomendado el uso de sarcosinato de sodio para desechar gran cantidad de impurezas de las proteínas de membrana externa en *C.jejuni*, ^{5, 38, 49} como las proteínas de membrana interna. ⁵⁹ Y el uso de octil-POE se ha propuesto para purificar de manera eficiente a la porina debido a que forma una estructura micelar alrededor de ella, protegiéndola del ambiente que la rodea, ayudándole a conservar su forma trimérica. ^{9, 28}

La fig. 2 (carriles B, D, F, H y J) muestra que el proceso de purificación descrito permitió obtener a la porina aislada de otras proteínas, aunque se conservó al LPS como

impureza. Algunos investigadores han utilizado la cromatografía de intercambio aniónico para eliminar a este componente de la membrana externa.^{9, 28}

La porina purificada se empleó en la producción de anticuerpos policlonales, donde se obtuvo un título de 1:7000 por ELISA. El título obtenido fue elevado, probablemente por el alto grado de pureza que poseía el antígeno y porque al parecer es un buen inmunógeno, debido a su naturaleza proteica y conformación homotrimérica.

Para observar la reactividad del antisuero hacia los epítopes conformacionales de la porina, se realizó un ELISA con el antígeno desnaturalizado. El ensayo mostró que el anticuerpo no reconoce a los epítopes lineales de la porina, ni al LPS y sugiere que el reconocimiento es específico para la estructura trimérica de esta proteína. Esto era lo esperado, porque las proteínas son mejores inmunógenos que los carbohidratos presentes en el LPS.

El uso de Westernblot para evidenciar a las proteínas separadas electroforéticamente en papel de nitrocelulosa, utilizando el anticuerpo policlonal producido, no tuvo éxito cuando se empleó el conjugado con peroxidasa, por lo que se optó por utilizar un sistema más sensible, el de biotina-estreptavidina, con el cual se lograron detectar bandas de diferentes pesos moleculares y que puede significar un reconocimiento débil hacia epítopes lineales de la porina desdoblada.

Otro ensayo empleado para caracterizar al suero anti-pPME fue la técnica de inmunofluorescencia, en la cual se valoró el reconocimiento entre el suero y otras cepas de *C. jejuni* productoras de diferentes cuadros de enteritis y otras bacterias patógenas y de flora habitual. Se detectó por inmunofluorescencia a las cepas de *C. jejuni* en un título

de 1:500. Las bacterias *Shigella*, *ETEC* y *Klebsiella*, que dieron una respuesta muy débil, presentaron una tonalidad diferente a la observada por las campilobacterias, y en un título de 1:250. Esto significa que si se emplea el anticuerpo diluido 1:500 en este tipo de ensayos, logramos una especificidad excelente.

Se realizaron también ensayos con *H. pylori*, ya que se ha reportado una reactividad cruzada con *C. jejuni*.²⁴ Los resultados indicaron que utilizando este anticuerpo, se detectaron débilmente a las formas cocoides y bacilares de *H. pylori*. Se repitió el análisis también con formas cocoides de *C. jejuni*, observándose que el anticuerpo reconoce de manera similar formas cocoides y bacilares.

La reactividad cruzada que mostró el anti-pPME hacia otras cepas nos lleva a pensar que estos microorganismos poseen proteínas de superficie con epítopes conformacionales similares, compartidos principalmente entre *H. pylori* y *C. jejuni*.

Se sabe que *Campylobacter*, al igual que otras bacterias, tienden a cambiar a una morfología cocoide como forma de resistencia y supervivencia;²² las porinas, son proteínas que se conservan en esta transformación debido a la importancia de sus funciones en la bacteria. Los resultados sugieren que las proteínas que posee *H. pylori* en su membrana externa tienen similitud con las porinas de *Campylobacter*. Además, se observó que la tonalidad dada en este ensayo fue diferente entre ambas bacterias, para *C. jejuni* se vio un tono verde, mientras que para *H. pylori* fue naranja.

Paralelamente, se recurrió a la base de datos SWISS-PROT donde se obtuvo la secuencia aminocídica de la porina (P80672 Fasta 3), y se comparó con secuencias de otras proteínas encontrándose que la porina tiene una estructura primaria diferente a las

porinas secuenciadas hasta el momento; este análisis permite confirmar la especificidad del anticuerpo producido; Sin embargo, presentó mayor homología hacia secuencias de proteínas que participan en procesos de adherencia, es decir, éste puede ser un mecanismo de patogenicidad importante en el que intervenga la porina de *Campylobacter*, por lo que el anticuerpo también podría ser útil para estudiar la adherencia de *Campylobacter* mediada por la porina.

Se han propuesto métodos de diagnóstico para la campilobacteriosis, examinando muestras fecales por medio de inmunofluorescencia directa donde se utilizaron antiseros conjugados con rodamina marcada, preparados contra serotipos del sistema Lior. Sin embargo, en estos métodos descritos, se observó mucha reactividad cruzada contra diferentes bacterias.^{33, 35} Esto se debe a que los anticuerpos fueron preparados a partir de antígenos muy crudos, cuyo grado de pureza no era bueno. El antígeno purificado en esta tesis dio origen a un anticuerpo muy específico y con una elevada sensibilidad.

Los procesos empleados en esta tesis para caracterizar al suero hiperinmune anti-pPME, como ELISA e inmunofluorescencia, pueden ser útiles como métodos diagnósticos, o para estudios en patogénesis, ya que se mostró la alta especificidad y sensibilidad del anticuerpo.

Estos métodos pueden ser diseñados para detectar a *C. jejuni* en muestras de heces de personas afectadas con algún cuadro de enteritis, para caracterizar mejor a la porina en su papel en la patogénesis, para realizar estudios epidemiológicos, para la detección de la bacteria en alimentos o agua e incluso en fluidos corporales; entre otros.

CONCLUSIONES

1. -El método de purificación realizado obtuvo a la porina con una alto grado de pureza, conservando solo al LPS como impureza.
2. - El título del suero anti-pPME por el método de ELISA fue de 1:7000.
3. - En el método de Westernblot, no hubo reconocimiento del suero anti-pPME contra las proteínas transferidas al papel de nitrocelulosa.
4. - El título del suero anti-pPME por el método de inmunofluorescencia es de 1:500 empleando cepas de *C. jejuni*.
5. - El anticuerpo policlonal anti-pPME producido es específico para los epítopes conformacionales de la porina, según los ensayos de ELISA, Westernblot e inmunofluorescencia que se realizaron con antígenos desnaturalizados y sin desnaturalizar.
6. - El método de inmunofluorescencia que utiliza el suero anti-pPME puede ser un método sencillo y rápido para la detección temprana de la enteritis por *Campylobacter*.

APENDICE DE SOLUCIONES

-ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Solución 4x Tris-Cl/SDS pH 6.8

Para preparar	100.0 mL	500.0 mL
Tris base (Bio-Rad 161-0719)	6.05 g	30.25 g
Disolver en agua desionizada		
Ajustar el pH a 6.8 con HCl conc.		
Aforar con agua desionizada		
Filtrar con filtro Millipore de 0.45 µm		
Adicionar SDS (Sigma L-3771)	0.4 g	2.0 g

Solución 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8

Para preparar	100.0 mL	500.0 mL
Tris base (Bio-Rad 161-0719)	18.2 g	91.0 g
Disolver en agua desionizada	60.0 mL	300.0 mL
Ajustar el pH a 8.8		
Aforar con agua desionizada		
Filtrar con filtro Millipore de 0.45 µm.		
Adicionar SDS (Sigma L-3771)	0.4 g	2.0 g

Solución de acrilamida 30%/bisacrilamida 0.8%.

Acrilamida (Bio-Rad 161-0101)	15.0 g
N, N- metilénbisacrilamida (Bisacrilamida) (Sigma M-7279)	0.4 g
Agua desionizada	50.0 mL
Se filtra la solución a través de un filtro de 0.45 µm y se almacena a 4°C.	

4) Solución amortiguadora de corrida 4X con un pH de 8.4.

Tris base (Bio-Rad 161-0719)	12.0 g
Glicina (Bio-Rad 161-0724)	57.6 g
Aforar con agua desionizada	1 L.

Momentos antes de iniciar la corrida se toman 200 mL de la solución 4X, se adicionan 600 mL de agua desionizada y se agregan 0.8g de SDS (Sigma L-3771).
NO SE DEBE DE AJUSTAR EL pH.

-ELISA

Solución salina de fosfatos (SSAF).

NaCl (Productos Químicos Monterrey 24903)	16.0 g
Na ₂ HPO ₄ (Baker-3252)	5.0 g
KH ₂ PO ₄ (Baker-3246-20)	0.4 g
KCl (Baker-3040)	0.4 g
Agua desionizada c.b.p.	2 L
Si se desea preparar el SSAF-Tween se adiciona 1 mL de Tween 20.	

Solución salina de fosfatos-albúmina al 1% y al 0.1% (SSAF-albúmina).

Albúmina	1.0 g
SSAF	100.0 g
Al 0.1% se prepara diluyendo 1:10 la solución de SSAF-albúmina al 1%.	

Solución amortiguadora de citratos.	
Acido cítrico (Baker 0122-20)	0.730 g
Na ₂ HPO ₄ (Reac. y Prod. Químicos 40180)	1.180 g
Agua desionizada c. b. p.	100 mL
El pH deberá vigilarse que permanezca en 5.5. Es necesario conservar en refrigeración.	
Solución de paro H ₂ SO ₄ 0.1 N	2.7 mL
H ₂ SO ₄ conc. (Baker 9681)	500.0 mL
Agua desionizada c. b. p.	

-WESTERBLOT (INMUNOTRANSFERENCIA)

Solución de transferencia.	
Tris base (Bio-Rad 161-0719)	3.03 g
Glicina (Bio-Rad 161-0724)	14.41 g
Metanol (Baker 9070-59)	200 mL
Agua desionizada c.b.p.	1 L
Solución salina de tris (SST)	
Tris base (Bio-Rad 161-0719)	2.42 g
NaCl (Reac. Químicos Monterrey 24903)	29.2 g
Ajustar pH a 7.5	
Agua desionizada c. b. p.	1 L

Cuando se requiere preparar SST-Tween se adicionan 500 µL de Tween 20 por cada litro de solución SST

-INMUNOFLUORESCENCIA.

Salución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) pH 8.0.	
Na ₂ HPO ₄ (Baker 3252)	2.2713 g
KH ₂ PO ₄ (Baker 3246-20)	0.2721 g
NaCl (Productos Químicos Monterrey 24903)	16.3632 g
Agua desionizada c.b.p	2 L
Si se desea preparar SSAF con Tween, se adiciona 1 mL de Tween 20 por cada 2 L.	

Solución salina amortiguadora de fosfatos-albúmina al 1%.	
Albúmina	1.0 g
SSAF pH 8.0	100 mL

Metanol absoluto (Baker 9070-59).

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Amako K. Nyut Way S. Umeda A. Shigematsu M. Takade A. Electron microscopy of the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*. Microbiol Immunol. 1996; 40 (10) : 749-754.
- 2.- Bahl H. Scholz H. Bayan N. Chami M. Leblon G. Blaser MJ. Sara M. Molecular biology of S-layers. FEMS Microbiol Rev. 1997 Jun; 20 (1-2): 47-98.
- 3.- Beveridge TJ. Pouwels PH. Sara M. Kotiranta A, Bingle WH. Functions of S-layers. FEMS Microbiol Rev. 1997 Jun; 20 (1- 2):99-149.
- 4.- Blaser MJ. Hopkins JA. Vasil ML. *Campylobacter jejuni* outer membrane proteins are antigenic for humans. Infect Immun 1984 Mar; 43 (3): 986-993.
- 5.- Blaser MJ. Hopkins JA. Berka RM. Vasil M. Wang WL. Identification and characterization of *Campylobacter jejuni* outer membrane proteins. Infect Immun. 1983 Oct; 42 (1): 276-284.
- 6.- Blaser MJ. Gotschlich EC. Surface array protein of *Campylobacter fetus*. Cloning and gene structure. J Biol Chem 1990 Nov; 265 (31): 19372. Suplemento: 1990 Aug; 265 (24) : 14529-14535.
- 7.- Blaser MJ. Role of the S layer proteins of *Campylobacter fetus* in serum- resistance and antigenic variation: a model of bacterial pathogenesis. Am J Med Sci. 1993 Nov; 306(5): 325-329. Review.
- 8.- Bilge SS. Vary JR. Dowell SF and Tarr PI. Role of the *Escherichia coli* 0157:H7 O side chain in adherence and analysis of an rfb locus. Infect Immun. 1996 Nov; 64(11): 4795-4801.
- 9.- Bolla JM. Loret E. Zalewski M and Pages JM. Conformational analysis of the *Campylobacter jejuni* porin. J Bacteriol. 1995 Aug; 177(15) : 4266-4271.
- 10.- Boot HJ. Pouwels PH. Expression, secretion and antigenic variation of bacterial S-layer proteins. Mol Microbiol. 1996 Sep; 21(6): 1117-1123. Review.
- 11.- Bradford MM. Anal Biochem. 1976. 72: 248-254.
- 12.- Buchanan TM and Pearce WA. Pathogenic aspects of outer membrane components of gram-negative bacteria. In M. Inouye. 475-514.
- 13.- Buchavald D and Maeland JA. Characterization of a 25.000-dalton *Helicobacter pylori* protein. cross-reacting with a *Campylobacter jejuni* protein. APMIS 1992 May; 100(5): 470-478.
- 14.- Buck GE. Smith JS. Parshall KA. Composition of the antigenic material removed from *Campylobacter jejuni* by heat. J Clin Microbiol 1984 Dec; 20(6): 1094-1098.
- 15.- Burnens A. Stucki U. Nicolet J and Frey J. Identification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*. J Clinical Microbiol. 1995 Nov; 33(11) : 2826-2832.

- 16.- Calva JJ, Ruiz-Palacios GM, López-Vidal AB, Ramos A and Bojalil R. Cohort study of intestinal infection with *Campylobacter* in mexican children. The Lancet. 1988 Mar; 503-506.
- 17.- Chan FTH, Strigel G and Mackenzie MR. Isolation of *Campylobacter jejuni* from an appendix. J Clin Microbiol. 1983 Ag; 18(2):422-424.
- 18.- Chart H, Conway D, Frost JA and Rowe B. Outer membrane characteristics of *Capylobacter jejuni* grown in chickens. FEMS Microbiol Lett. 1996 Dec; 145(3): 469-472.
- 19.- de Melo MA, Gabbiani G and Pechere JC. Cellular events and intacellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEP-2 cells. Infect Immun. 1989 Jul; 57(7): 2214-2222.
- 20.- de Melo MA and Pechere JC. Identification of *Campylobacter jejuni* surface proteins that bind to Eucaryotic cells in vitro. Infect Immun. 1990 Jun; 58(6): 1749-1756.
- 21.- Derclaye I, Delor I, Van Bouchaute M, Moureau P, Wauters G and Cornelis G. Identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* by gel electrophoresis of the outer membrane proteins. J Clin Microbiol. 1989 May; 27(5): 1072-1076.
- 22.- Díaz Barroso Amelia. Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra proteínas de membrana externa y lipopolisacárido de *Campylobacter jejuni*. 1991.
- 23.- Fauchere JL, Rosenau A, Veron M, Moyen EN, Richard S and Pfister A. Adhesion to HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* outer membrane components. Res Microbiol. 1989 Jul; 140(6): 379-392.
- 24.- Faulde M, Putzker M, Mertes T and Dobe D. Evaluation of an Immunofluorescence assay for specific detection of Immunoglobulin G antibodies directed against *Helicobacter pylori*. and antigenic cross-reactivity between *H.pylori* and *Campylobacter jejuni*. J Clin Microbiol. 1991 Feb; 29(2): 323-327.
- 25.- Field LH, Underwood JL, Payne SM, Berry LJ. Characteristics of an avirulent *Campylobacter jejuni* strain and its virulence-enhanced variants. J Med Microbiol. 1993 Apr; 38(4): 293-300.
- 26.-Fomsgard A, Freudenberg HA, Galanos C. Modification of the silver technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. J Clin Microbiol. 1990. 28: 2627-2631.
- 27.- Fujimoto S, Takade A, Amako K and Blaser MJ. Correlation between molecular size of the surface array protein and morphology and antigenicity of the *Campylobacter fetus* S layer. Infect Immun. 1991 Jun; 59(6): 2017-2022.
- 28.- Garavito RM and Rosenbusch JP. Isolation and crystallization of bacterial porin. Methods in enzymology 1986; 125: 309-328.
- 29.- Guerrero ML, Calva JJ, Morrow AL, Velázquez FR, Tzub-Dzib F, Ortega H, Arroyo H, Cleary TG, Pickering LK and Ruiz-Palacios GM. Asymptomatic *Shigella* infections in a cohort of mexican children younger than two years of age. Pediatr Infect Dis J 1994 Jul; 13(7):597-602.

- 30.- Guerrero ML. Calva JJ. Morrow AL. Velázquez FR. Tzub-Dzib F. Ortega H. Arroyo H. Cleary TG. Pickering LK and Ruiz-Palacios GM. A prospective study of astrovirus diarrhea of infancy in Mexico City. *Pediatr Infect Dis J* Ago; 17(8): 723-727.
- 31.- Guerry P. Nonlipopolysaccharide surface antigens of *Campylobacter* species. *J Infect Dis*. 1997 Dec; 176 Suppl 2: S122-S124. Review
- 32.- Hanoch REW. Role of porins in OM Permeability. *J.Bacter* 1987; 169: 929-933.
- 33.- Hebert GA. Hollis DG. Weaver RE. Steigerwalt RM. McKinney RM and Brenner DJ. Serogroups of *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter coli* and *Campylobacter fetus* defined by direct Immunofluorescence. *J Clin Microbiol*. 1983 Mar; 17(3): 529-538.
- 34.-Heuteshoven J. Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*. 1985. 6: 103-112.
- 35.- Hodge DS. Prescott JF and Shewen PE. Direct Immunofluorescence microscopy for Rapid screening of *Campylobacter enteritis*. *J Clin Microbiol*. 1986; 24(5): 863-865.
- 36.- Hugdahl MB. Beery JT and Doyle MP. Chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1988; 56: 1560-1566.
- 37.- Huyer M. TR Parr. Rewhanckoch P and Page WJ . Outer membrane protein in *C.jejuni*. *FEMS Microbiol Lett* 1986; 37: 247-250.
- 38.- Jin T and Penner JL. Role of the 92.5 kDa outer membrane protein of *Campylobacter jejuni* in serological reactions. *J Clin Microbiol* 1988 Dec; 26(12): 2480-2483.
- 39.- Jones DM. Sutcliffe EM. Rios R. Fox AJ. Curry A. *Campylobacter jejuni* adapts to aerobic metabolism un the environment. *J Med Microbiol*. 1993 Feb; 38(2) : 145-150.
- 40.- Kay W. Buckley JT. Ishiguro EE. Phipps BM. Monette JPL and Trust TJ. Purification and disposition of a surface protein associated with virulence of *Aeromonas salmonicida*. *J Bacteriol* 1981; 145: 1018-1024.
- 41.- Kervella M. Fauchere JL. Fourel D and Pages JM. Immunological cross-reactivity between outer membrane proteins of *Campylobacter jejuni* and *Echerichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1992 Dec 1; 78(2-3): 281-285.
- 42.- Ketley JM. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiol* 1997; 143: 5-21.
- 43.- Konkel ME . Mead D and Cieplak W. Cloning, sequencing, and expression of a gene from *Campylobacter jejuni* encoding a protein (Omp18) with similarity to peptidoglycan-associated lipoproteins. *Infect Immun* 1996 May; 64(5): 1850-1853.
- 44.- Kornblatt A. Barrett T. Morris G and Tosh F. Epidemiologic and Laboratory investigation of an outbreak of *Campylobacter enteritis* associated with raw milk. *Am J Epid* 1985 Feb; 122 (5): 884-889.
- 45.- LaemmLi UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1970; 227: 680-685.

- 46.- **Lambden PR, Heckels JE, James LT and Watt PJ.** Variation in surface protein composition associated with virulence properties in opacity types of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Gen Microbiol* 1979; **114**: 305-312.
- 47.- **Lee A, O'Rourke JL, Barrington PJ and Trust TJ.** Mucus Colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infect Immun* 1986 Feb; **51**(2): 536-546.
- 48.- **Logan SM and Trust T.** Outer membrane characteristics of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1982 Dec; **38**(3): 898-906.
- 49.- **Logan SM and Trust T.** Molecular identification of surface protein antigens of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*. 1983 Nov; **42**(2): 675-682.
- 50.- **Logan SM and Trust T.** Isolation and characterization of *Campylobacter* flagellins. *J Bacteriol* 1987 Nov; **169**(11): 5072-5077.
- 51.- **McCardell BA, Madden JM and Stanfield JT.** Effect of iron concentration on toxin production in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Can J Microbiol* 1986 Feb; **32**: 395-401.
- 52.- **Mc Sweegan E and Walker RI.** Identification and characterisation of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infect Immun* 1986; **53**: 141-147.
- 53.- **Meinersmann RJ, Rigsby WE, Stern NJ, Kelley LC, Hill JE and Doyle MP.** Cloning of an outer membrane protein gene from *Campylobacter jejuni*. *Curr Microbiol*. 1997 Jun; **34**(6): 360-366.
- 54.- **Mills SD and Bradbury WC.** Human antibody response to outer membrane proteins of *Campylobacter jejuni* during infection. *Infect Immun*. 1984 Feb; **43**(2): 739-743.
- 55.- **Moser I, Schroder WF and Hellman E.** In vitro binding of *Campylobacter jejuni/coli* outer membrane preparations to INT 407 cell membranes. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 1992; **180**(6): 289-303.
- 56.- **Moser I and Schroder WF.** Binding of outer membrane preparations of *Campylobacter jejuni* to INT 457 cell membranes and extracellular matrix proteins. *Med Microbiol Immunol (berl)*. 1995 Oct; **184**(3): 147-153.
- 57.- **Nachamkin Y and Hart AM.** Western blot analysis of the human antibody response to *Campylobacter jejuni* cellular antigens during gastrointestinal infection. *J Clin Microbiol*. 1985 Jan; **21**(1): 33-38.
- 58.- **Newell DG, McBride H and Pearson D.** The identification of outer membrane proteins and flagella of *Campylobacter jejuni*. *J Gen Microbiol* 1984 May; **130**(Pt5): 1201-1208.
- 59.- **Nitta H, Holt SC and Ebersole JL.** Purification and characterization of *Campylobacter rectus* surface layer proteins. *Infect Immun* 1997 Feb; **65**(2): 478- 483.

- 60.- Page WJ and Taylor DE. Comparison of methods used to separate the inner and outer membranes of cell envelopes of *Campylobacter* spp. J Gen Microbiol 1988 Nov; 134(Pt 11): 2925-2932.
- 61.- Panigrahi P. Losonsky G. De Tolla LJ and Morris JG. Human immune response to *Campylobacter jejuni* proteins expressed in vivo. Infect Immun 1992 Nov; 60(11): 4938-4944.
- 62.- Peppersack F. Prigogyne T. Butzler JP and Yourassowsky E. *Campylobacter jejuni* post-transfusional septicaemia. The Lancet 1979; i: 911.
- 63.- Price AB. Dolby JM. Dunscombe PR and Stirling J. Detection of *campylobacter* by immunofluorescence in stools and rectal biopsies of patients with diarrhoea. J Clin Pathol 1984 Sep; 37(9): 10007-13
- 64.- Ruiz-Palacios GM. Frenck RW and Pickering LK. *Campylobacter* and *Helicobacter*. Principles and Practice of Pediatrics. second edition. 1994; 56.7:1173-1177.
- 65.- Schroder W. Moser I. Primary structure analysis and adhesion studies on the major outer membrane protein of *Campylobacter jejuni*. FEMS Microbiol Lett. 1997 May; 150(1): 141-147.
- 66.- Schwartz D. Perry R. Dombroski DM. Merrick JM and Goldhar J. Iron-regulated proteins in outer membranes of *Campylobacter jejuni* diarrhoea isolates and immune response to the proteins in patients. Int J Med Microbiol Virol Parasitol Infect Dis. 1994 Jan; 280(3): 338-347.
- 67.- Takata T. Fujimoto S. and Amako K. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. Infect Immun 1992; 60: 3596-3600.
- 68.- Taylor DE and Chang N. Immunoblot and enzyme-linked immunosorbent assays of *Campylobacter* major outer-membrane protein and application to the differentiation of *Campylobacter* species. Mol. Cell probes. 1987 Sep; 1(3): 261-274.
- 69.- Velázquez FR. Calva JJ. Guerrero ML. Mass D. Glass RI. Pickering LK and Ruiz-Palacios GM. Cohort study of rotavirus serotype patterns in symptomatic and asymptomatic infections in Mexican children. Pediatr Infect Dis J 1993 Ene12(1):54-61.
- 70.- Wassenaar TM. Bleumink-Pluym NMC and Van der Zeijst BAM. Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but no *flaB* is required for invasion. EMBO J 1991; 10: 2055-2061.
- 71.- Waterman SR and Hackett J. Outer membrane components of *Campylobacter hyointestinalis*. FEMS Microbiol Lett. 1992 May; 71(3): 279-284.
- 72.- Watson KC and Kerr EJ. Comparison of agglutination. complement fixation and immunofluorescence tests in *Campylobacter jejuni* infections. J Hyg (Lond) 1982 Abr; 88(2): 165-171.