

03072
2
2er



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Posgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades
Facultad de Química

RECEPTORES ANALOGOS PARA
Campylobacter jejuni EN LECHE
MATERNA

T E S I S
Que para obtener el Grado de
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
p r e s e n t a

Q.F.B. LUZ ELENA CERVANTES VILLAR



México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	i
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
III. JUSTIFICACION DEL PROYECTO	15
IV. HIPOTESIS	17
V. OBJETIVOS	17
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL	18
VII. METODOS	24
VIII. RESULTADOS	32
IX. DISCUSION	46
X. CONCLUSIONES	51
XI. BIBLIOGRAFIA	52

RESUMEN

En nuestro país, las infecciones gastrointestinales son causa importante de morbilidad en la población menor de 5 años; siendo *Campylobacter jejuni* uno de los agentes etiológicos más comúnmente aislado.

Aún cuando se conoce muy poco de la patofisiología de la infección por *Campylobacter*, se ha demostrado que su asociación *in vitro* con células HEp-2, se relaciona significativamente con el cuadro clínico del cual fue aislada la cepa. Uno de los propósitos de determinar la habilidad de diferentes cepas para asociarse a cultivos celulares, y de estudiar los mecanismos por los cuales lo realiza, es el desarrollo de medidas de prevención para abolir tal interacción. Para ello se ha propuesto el uso de receptores análogos, llamados así porque son capaces de interferir con la adherencia microbiana y la colonización *in vivo*; en este sentido, la leche humana cumple con esta función, involucrando la presencia de componentes no inmunoglobulínicos capaces de inhibir ó de disminuir, en forma importante, el grado de adherencia bacteriana.

Entre los objetivos del presente trabajo se incluyeron: 1) La purificación de componentes de naturaleza oligosacárida a partir de leche materna; 2) El determinar, mediante ensayos de inhibición de la asociación bacteriana a células HEp-2, el posible papel como receptores análogos de cada una de las fracciones oligosacáridas, así como de distintas fracciones proteicas y/o lipídicas de la leche; y 3) El desarrollo de un modelo animal de colonización que nos permitió estudiar, *in vivo*, la capacidad de cada una de las fracciones oligosacáridas para inhibir la colonización por *C. jejuni*.

Con cepas bien caracterizadas como adherentes e invasivas y con el ensayo de inhibición, demostramos la presencia, en leche materna, de inhibidores de la asociación de cepas invasivas de *C. jejuni* a las células HEp-2 en las fracciones oligosacáridas probadas. Se presume que tales inhibidores son oligosacáridos fucosilados, los cuales probablemente actúan compitiendo con los receptores presentes en las células epiteliales para las cepas invasivas, pero no para las adherentes.

Se estableció un modelo experimental de colonización, con el cual se demostró una clara diferencia entre el comportamiento de cepas patógenas y no patógenas, por lo que podría ser útil para evaluar los efectos causados por medidas profilácticas.

Finalmente, en este trabajo se demostró que la actividad inhibitoria para *C. jejuni* presente en leche materna es similar *in vitro* e *in vivo*; sin embargo, se requiere la realización de ensayos inhibitorios con una gama variada de cepas de *Campylobacter*, además de efectuar una caracterización bioquímica detallada de tal actividad inhibitoria.

I. INTRODUCCION

Campylobacter jejuni es una de las principales causas de gastroenteritis en humanos (15-17). En países en desarrollo es uno de los enteropatógenos más comúnmente aislado de casos de diarrea en niños menores de 5 años (9,14,16,46); Georges-Courbout y cols. (45) han demostrado una asociación estadísticamente significativa de *Campylobacter* con diarrea en niños entre 1 y 6 meses de edad, al igual que Calva y cols. (21), quienes demostraron la misma asociación en una cohorte de niños mexicanos menores de 5 años, con una relación de enfermedad-infección de 50% durante los primeros 6 meses de vida, que disminuye considerablemente con la edad.

En los países industrializados, *C. jejuni* ocupa el segundo lugar como agente etiológico de diarrea infecciosa, únicamente superado por rotavirus (91), con una frecuencia de aislamiento del 60%, seguido por *Salmonella* con un 25% y *Shigella* en un 10% (49). A nivel hospitalario, *C. jejuni* también se aísla más frecuentemente que *Salmonella* y *Shigella* en proporciones de 2:1 y 5:1, respectivamente (41). Además de que puede llegar a causar infecciones nosocomiales graves, debe ser considerado como un posible agente de la meningitis de origen desconocido, particularmente en recién nacidos y otros huéspedes inmunocomprometidos (19).

Poco se conoce acerca de la fisiopatología de la infección por *Campylobacter* y el proceso exacto de la inducción de diarrea en el huésped; sin embargo, se han propuesto tres mecanismos por los que la bacteria es capaz de producir la enfermedad y que se asocian con cuadros clínicos característicos:

- 1) La adherencia al epitelio intestinal y la producción de una enterotoxina similar a la CT de *Vibrio cholerae* y a la LT de *E. coli*, por lo que origina una diarrea de tipo secretor similar a la ocasionada por estos dos microorganismos (89,102).
- 2) La invasión al epitelio intestinal, lo que provoca daño tisular y, por ende, una diarrea de tipo inflamatorio similar a la ocasionada por *Shigella* y que se caracteriza por la presencia de leucocitos en heces (37,84); aún cuando se ha descrito la producción de una citotoxina, su papel dentro del proceso inflamatorio no ha sido completamente dilucidado (51).
- 3) La translocación, proceso similar al ejercido por *Salmonella*, en la que la bacteria es capaz

de atravesar la mucosa intestinal sin dañar su integridad, proliferando posteriormente en la lámina propia y los nódulos linfáticos mesentéricos, y dando así origen a infecciones extraintestinales como meningitis, colecistitis y adenitis mesentérica (103).

La adhesión de la bacteria a las superficies mucosas parece ser el primer paso en la patogénesis de muchas infecciones intestinales (12). El mecanismo por el cual *Campylobacter* se adhiere al epitelio intestinal no se conoce, y aunque no posee pilis o fimbrias, se cree que puede poseer otras adhesinas (76). Algunos estudios con líneas celulares han demostrado la adherencia del microorganismo a células HeLa, HEp-2, INT 407 y a bordes en cepillo de cerdo (19,65,76,83,101). Se ha propuesto que las estructuras de superficie juegan un papel primordial en la adherencia; tal es el caso del flagelo, el lipopolisacárido y las proteínas de membrana externa (37,76).

En nuestro laboratorio se han estandarizado métodos *in vitro* que nos han permitido evaluar la capacidad de *C. jejuni* para asociarse a células HEp-2 (22,71). Se ha definido un Índice de Asociación (IA) en microcámaras de cultivo, como el porcentaje de células con bacterias adheridas; una cepa se considera adherente cuando este índice es mayor al 20%. El Índice de Invasividad (II) se ha determinado como el porcentaje de bacterias que son capaces de penetrar en un ensayo con cultivos celulares en esferas de sephadex; una cepa se considera invasiva cuando el índice es mayor al 60%. Se ha demostrado que la asociación *in vitro* de *C. jejuni* con células HEp-2 está relacionada con el cuadro clínico del cual fue aislada la cepa; en general el número de cepas asociadas a las células fue significativamente mayor en los niños con diarrea que en niños asintomáticos (17), lo que se apoya con los resultados de los estudios realizados por Fauchere y cols. (37). De acuerdo con estos parámetros, hemos definido tres tipos de cepas según su comportamiento *in vitro*: 1) Invasivas, cuando el IA es mayor de 20% y el II mayor de 60%; 2) Adherentes, cuando el IA es mayor de 20% y el II menor de 60% , y 3) No adherentes/no invasivas cuando los dos índices se encuentran por abajo del punto de corte respectivo.

II. ANTECEDENTES

A. Adherencia Microbiana

La adherencia de los organismos patógenos a las superficies epiteliales parece ser necesaria para la colonización y subsecuente infección. En el intestino parecen ser diversos los factores que influyen en ella (104). Se han propuesto tres mecanismos de asociación intestinal: i) adhesión, en la que la bacteria se une al epitelio por medio de adhesinas o desarrollando estructuras de inserción especializadas; ii) colonización del moco, en la que ciertos organismos tienen la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en las áreas más externas de la capa de moco que cubre la superficie intestinal; y iii) asociación a las criptas intestinales que son colonizadas por grandes agregados bacterianos (69).

Hasta el momento los datos disponibles apoyan la hipótesis de que un organismo debe poseer adhesinas que le permitan unirse a receptores celulares en los tejidos del huésped (59). Tales interacciones son muy específicas, dando lugar a enlaces complementarios adhesina-receptor que le permiten a la bacteria permanecer y no ser eliminada por los mecanismos de defensa del huésped (11). Las adhesinas son, por tanto, estructuras de la superficie de los microorganismos; se ha demostrado la existencia de 8 clases especiales de fimbrias de naturaleza proteica, que median la adherencia de *E. coli* enterotoxigénica a los receptores de la mucosa intestinal (44). Dentro del grupo de adhesinas se incluyen componentes bacterianos bien conocidos, como flagelos, cápsulas, glicocálix, lipopolisacáridos, lectinas asociadas y proteínas de membrana externa (7,11,26).

B. Receptores Celulares

Con respecto a los receptores, la evidencia existente sugiere que su presencia está determinada genéticamente, se relaciona con la edad del huésped y varía en los diferentes niveles del tracto gastrointestinal (17,25), con lo que se explicaría el porqué de los diferentes niveles de colonización, el surgimiento de enfermedades relacionadas con la edad y la existencia de huéspedes susceptibles o resistentes.

Los receptores sobre las membranas celulares para las bacterias Gram-negativas están compuestos en general por carbohidratos. En algunos casos, por ejemplo en muchas especies de *Enterobacteriaceae*, el receptor parece residir en un sólo azúcar, la manosa. Esto es, la manosa por sí sola es capaz de bloquear la unión de estos organismos a las células del huésped (8,11). Knutton y cols. (60) demostraron que los receptores con alto contenido de manosa se localizan sobre la superficie basolateral del enterocito, más que sobre los bordes en cepillo, y es en ellos donde se adhiere *E. coli* enterotoxigénica.

Los mejores candidatos moleculares para actuar como receptores, en las membranas celulares del huésped, son las porciones carbohidrato de los glicolípidos y glicoproteínas que las constituyen (17,104). Existen diversos estudios que fundamentan tal aseveración, como son los realizados por Mouricout y cols. (78), quienes demostraron que cepas de *E. coli* enterotoxigénica patógenas para bovinos se adherían fuertemente a glicoproteínas del moco intestinal, demostrando además que el receptor principal responsable de la adherencia era una glicoproteína con un peso molecular entre 2×10^6 y 4×10^5 D. Por otra parte, Bartus y cols. (9) demostraron que el receptor responsable de la adherencia de cepas de *E. coli*, que poseen el factor de colonización CFA I, a eritrocitos es un sialoglicoconjugado.

Uno de los receptores glicoconjugados para bacterias patógenas mejor caracterizado es Gal β 1 \rightarrow 4Gal (35) y se encuentra en las células epiteliales del tracto urinario. Es bien sabido, además, que los glicolípidos presentes en los enterocitos, y conocidos como gangliósidos, actúan como receptores para las diversas fimbrias de *E. coli* (104).

C. Glicoconjugados de Membrana

En general, las membranas plasmáticas de los mamíferos están compuestas de una bicapa lipídica consistente de fosfolípidos, colesterol y glicolípidos. Las proteínas y glicoproteínas están insertadas en la capa lipídica de tal manera que la porción hidrofóbica de la molécula está dentro de la membrana y la porción hidrofílica, constituida por carbohidrato, en la parte exterior. Los glicolípidos asociados a membrana están alineados de una manera similar. Las proteínas y

glicoproteínas pueden ser parcial o completamente transmembranales y estar asociadas estrechamente con los lípidos integrales de la membrana o sólo estar en contacto con la bicapa lipídica por su superficie externa (11,104).

Los glicoconjugados se clasifican en dos grandes grupos: glicolípidos y glicoproteínas. Los receptores que se consideran más importantes son las glicoproteínas, ya que además de ser componentes estructurales de las membranas, son secretadas dentro del moco que cubre el epitelio, constituyéndose en su componente principal; por ello se les conoce también con el nombre de mucinas (104).

En general, las glicoproteínas son macromoléculas constituidas por un péptido central, que representa del 10 al 30% de su peso molecular, y por cadenas oligosacáridas unidas a él (62). De acuerdo al enlace existente entre la proteína y la fracción oligosacárida, las glicoproteínas se clasifican en dos tipos:

1) O-glicosídicas: existe un enlace o-glicosídico entre un hidroxiaminoácido como serina o treonina y los residuos de N-acetilgalactosamina. Los oligosacáridos contienen ácido N-acetil-N-glicolilneuramínico y fucosa que se encuentra en los extremos no reductores (43,104). Las cadenas de carbohidrato pueden variar en tamaño, desde un disacárido hasta 15 ó 18 residuos (43,66).

2) N-glicosídicas: existe un enlace N-glicosídico entre la asparagina del péptido y los residuos de N-acetilglucosamina. Se han clasificado en cuatro diferentes variedades, que tienen en común un pentasacárido central constituido por dos residuos de N-acetilglucosamina y tres residuos de manosa; éste último sólo se presenta en las glicoproteínas N-glicosidadas. Las cadenas N-glicosídicas pueden llegar a tener una longitud de hasta 70 residuos (96,97).

D. Antiadherentes

Uno de los propósitos en los estudios de los mecanismos de adherencia bacteriana ha sido el desarrollo eventual de medidas para prevenir la adhesión de bacterias patógenas a las superficies

mucosas antes de que puedan causar daño tisular. El desarrollo de antiadherentes puede plantearse desde varios puntos como son:

- El uso de adhesinas bacterianas purificadas, de receptores de membrana o de análogos de estos componentes, como inhibidores competitivos de la adherencia bacteriana.
- El uso de sustancias que supriman la formación o expresión de las adhesinas bacterianas, tales como dosis subletales de antibióticos.
- Desarrollo de vacunas para inducir la formación de anticuerpos locales que pudieran ser activos contra el microorganismo y por ello prevenir la adhesión (11).

E. Receptores Análogos

El aislamiento de receptores específicos biológicamente relevantes de las células epiteliales del intestino es difícil, ya que requiere de la identificación de una molécula específica o secuencia de residuos azúcares determinada, tomando en cuenta que la estructura de los glicoconjugados de membrana varía considerablemente según el grado de diferenciación celular, la localización proximal o distal en el intestino, la edad del huésped y el medio ambiente luminal. Por ello, se prefiere trabajar con receptores análogos, llamados así porque son capaces de interferir con la adherencia microbiana y la colonización *in vivo*.

Leffler y Svanborg-Eden (70) demostraron que una fracción glicolípídica, aislada de las células epiteliales del tracto urinario humano, inhibía la adherencia de *E. coli* a las células del mismo donador, lo que sugería un papel importante de los glicolípidos como receptores para la adherencia de la bacteria. Posteriormente identificaron un glicoesfingolípidos, de la serie de los globósidos, para una cepa de *E. coli* que se une a las células epiteliales del tracto urinario y aglutina los eritrocitos humanos. Por ensayos de inhibición utilizando glibotetrasilceramida y otras ceramidas semejantes, concluyeron que probablemente era la cadena carbohidrato la responsable de la actividad biológica del globósido.

Posteriormente, en 1982, Svanborg-Eden y cols. (99) demostraron que tales glicolípidos, a los que denominaron receptores análogos a los de las membranas celulares, podían bloquear la adherencia de *E. coli in vitro* y la infección experimental del tracto urinario de ratones Balb/c, por lo que sugirieron que los compuestos semejantes a los receptores del huésped podrían unirse competitivamente a los ligandos superficiales de la bacteria. Esto probablemente disminuiría el número de bacterias unidas a la mucosa en un grado suficiente, para alterar el delicado balance de la interacción huésped-parásito en favor del huésped.

Son diversos los estudios que documentan el papel de los receptores análogos como bloqueadores de la adherencia. Así, en 1979, Aronson y cols. (6) lograron prevenir la colonización por *E. coli* del tracto urinario de ratones mediante el bloqueo de la adherencia con un glucopiranosido, específicamente el metil- α -D-manopiranosido.

Estudios más recientes han clasificado a las adhesinas de *E. coli* de acuerdo a la especificidad de la porción carbohidrato que reconocen. Así, por ejemplo, para el pili tipo 1 se ha descrito un glicopéptido cuya porción carbohidrato corresponde a un oligomanósido, y de acuerdo a ello se han preparado potentes inhibidores de la adherencia a partir de glicoproteínas extraídas de plantas, principalmente estructuras del tipo $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ - (67,80).

Uno de los trabajos que demuestra el importante papel que desempeñan las glicoproteínas como receptores análogos y, por ende, como inhibidores de la adherencia, lo encontramos en los estudios de Mouricout y cols. (79). Ellos trataron en forma experimental la colibacilosis con glicoproteínas extraídas de plasma y lograron excelentes resultados, asumiendo que era la porción carbohidrato la responsable de la actividad biológica, dado que si la destruían la actividad desaparecía.

Estudios clínicos en animales de granja han demostrado la efectividad de este tipo de extractos contra cepas de *Campylobacter spp.* o *Streptococcus spp.*, como paliativos de los efectos de la infección con esas bacterias (79).

F. Importancia de la Alimentación al Seno Materno

En países donde las condiciones sanitarias son pobres y las tasas de infección altas, se ha demostrado la susceptibilidad de los niños a diferentes patógenos microbianos cuando no son alimentados al seno materno. La incidencia y severidad de las infecciones bacterianas de los tractos gastrointestinal y respiratorio son significativamente menores en los niños alimentados al seno materno. Se sabe que la leche humana contiene muchos factores que proveen defensas específicas y no específicas contra diversos agentes infecciosos, y parece ser que algunos factores de la leche permanecen activos en el intestino de los lactantes, dado que es difícil su colonización con ciertos microorganismos (47,48,58,75).

En este sentido la diarrea, que es una de las principales causas de muerte en niños menores de 5 años de edad en las áreas menos desarrolladas del mundo, es una infección especialmente frecuente durante la ablactación y en los niños que no reciben leche materna (50).

G. Factores Protectores en la Leche Materna

La leche humana está caracterizada no sólo por un complejo sistema de defensa del huésped, constituido por oligosacáridos y glicoconjugados antiadherentes que previenen la colonización y proliferación de patógenos microbianos comunes en el tracto gastrointestinal y respiratorio de los niños, sino también por la presencia de agentes antiinflamatorios. Entre éstos se incluyen enzimas que degradan mediadores de la inflamación, así como antiproteasas, lactoferrina, lisozima, IgA secretora, lípidos antivirales y antioxidantes, tales como cisteína, ascorbato, α -tocopherol y β -carotenos. Hay que hacer notar que estos factores que confieren protección son componentes casi exclusivos de la leche humana, ya que se encuentran en menor cantidad o bien ausentes en la leche de otros mamíferos (47,48).

La leche contiene una gran cantidad de glicoproteínas, glicopéptidos y oligosacáridos, principalmente durante las etapas tempranas de la lactación. Entre los mamíferos, la leche humana es notable debido a que es única con respecto a la alta concentración y complejidad de su fracción oligosacárida (61).

H. Oligosacáridos en Leche Materna

En 1933 Polonovsky y Lespagnol (86) aislaron una fracción principal de la leche a la que llamaron gynolactosa, la que según los estudios realizados por ellos esta constituida por oligosacáridos. Años más tarde, Montreuil y Mullet (77) determinaron que esta fracción constituía el 2.4% del calostro humano y entre el 1.2 y 1.3% de la leche materna madura. Por lo tanto, la fracción oligosacárida es el cuarto componente mayoritario de la leche después del agua, lactosa y grasa, y representa una porción significativa del nitrógeno no proteico en ella.

La leche y el calostro contienen oligosacáridos libres que son únicos estructuralmente y que hasta ahora sólo se han encontrado en las secreciones lácteas, y han atraído considerable atención en vista de sus propiedades antigénicas, su efecto promotor en el crecimiento de ciertas bacterias benéficas y sus homólogos estructurales (34).

Durante los últimos 30 años, los esfuerzos combinados de diversos grupos de investigadores han llevado a dilucidar la estructura de más de 50 oligosacáridos de la leche humana (36,61,98,107,108).

Estructuralmente los oligosacáridos pueden ser clasificados en nueve grupos, ya que son derivados de nueve cadenas centrales principales: lactosa, lacto-N-tetrosa, neo-lacto-N-tetrosa, lacto-N-hexosa, neo-lacto-N-hexosa, para-lacto-N-hexosa, para-neo-lacto-N-hexosa, lacto-N-octaosa y neo-lacto-N-octaosa (61,108). Resalta el hecho de que todos los oligosacáridos estudiados a la fecha tienen lactosa en sus extremos reductores y que, además, los derivados fucosilados y sialilados de la lactosa y lacto-N-tetrosa son los que se encuentran en mayor cantidad (61,62).

Generalmente la fucosa y el ácido siálico se presentan en las posiciones terminales; se ha demostrado que existe un patrón para la localización de los residuos fucosilados y sialilados en las cadenas oligosacáridas. Existen cuatro tipos de enlaces para los residuos fucosilados, Fuc-($\alpha,1\rightarrow2$)-Gal, Fuc-($\alpha,1\rightarrow4$)-GlcNAc, Fuc-($\alpha,1\rightarrow3$)-GlcNAc y Fuc-($\alpha,1\rightarrow3$)-Glc, que son originados por diferentes fucosiltransferasas. Para los residuos sialilados se han descrito tres tipos de enlaces:

NANA-(α ,2 \rightarrow 3)-Gal, NANA-(α ,2 \rightarrow 6)-Gal, y NANA-(α ,2 \rightarrow 6)-GlcNAc, determinados por tres sialiltransferasas (61,62).

Así, puede decirse que las diferencias estructurales en los oligosacáridos de la leche humana pueden atribuirse principalmente a isómeros anoméricos del tetrasacárido central básico, o bien a isómeros anoméricos posicionales de los puntos de unión de la fucosa y el ácido siálico (34).

Egge y cols. (36) reportaron la separación de oligosacáridos neutros de la leche que contenían fucosa en al menos 100 diferentes componentes. Muchos de ellos probablemente también ocurren en la forma sialilada, pero la caracterización total de esta fracción en el calostro y la leche ha estado limitada por las técnicas analíticas disponibles y la complejidad de la fracción (81).

Estudios sobre la presencia de los oligosacáridos fucosilados en muestras de leche individuales, han mostrado evidencia importante de que este tipo de oligosacáridos no siempre se detectan en todas las muestras de leche. Kobata (61) ha demostrado que la presencia de ciertos oligosacáridos está relacionada con los grupos sanguíneos y que las glicosiltransferasas, responsables de su biosíntesis, son también responsables de la biosíntesis de las glicoproteínas determinantes de los grupos sanguíneos (3).

Los oligosacáridos presentes en muestras individuales de leche varían con el tipo sanguíneo A, B, O ó Lewis de la donadora. Las cadenas carbohidrato, unidas a las sustancias solubles de los grupos sanguíneos, contienen un azúcar central que es común a todos; la unión de fucosa, galactosa y N-acetilgalactosamina en las posiciones apropiadas de la forma central básica, originan los determinantes específicos de los grupos sanguíneos A, B, H y Lewis. Los azúcares que confieren tal especificidad son: para H, fucosa; para A, N-acetilgalactosamina; para B, galactosa; para Le^a, fucosa; y para Le^b, dos fucosas. Finalmente, una comparación de la estructura de los oligosacáridos de la leche con el oligosacárido central de los grupos sanguíneos ha confirmado una marcada homología (34).

Las mujeres pueden ser clasificadas en tres grupos de acuerdo a la presencia de los oligosacáridos fucosilados en su leche:

El primer grupo comprende aproximadamente 75% de la población y su leche contiene los siete oligosacáridos fucosilados principales, con residuos de fucosa con uniones 2→, 3→, y 4→ y corresponde al tipo sanguíneo Le a^b+ secretor.

El segundo grupo comprende 20% de la población, siendo su tipo sanguíneo Le a^b-. Las mujeres que pertenecen a este grupo son no secretoras y carecen de una fucosiltransferasa que forma las unidades Fuc-(α,1→2)-Gal, por lo que su leche carece de todos los oligosacáridos y glicoproteínas que poseen esta unidad como estructura parcial.

El tercer grupo comprende únicamente 5% de la población; corresponde al grupo sanguíneo Le a^b- y las mujeres que pertenecen a este grupo carecen de otra fucosiltransferasa que forma las unidades Fuc-(α,1→4)-GlcNAc, usando cadenas Gal-(β,1→3)-GlcNAc como aceptores. La carencia de ciertos oligosacáridos fucosilados en la leche de estos individuos ha llevado al descubrimiento de componentes minoritarios que generalmente son enmascarados por los primeros (62,102).

Viverge y cols. (102) han demostrado que ocurren modificaciones cuantitativas importantes en la composición de carbohidratos en la leche durante la lactancia, sugiriendo que el sistema Lewis juega un papel importante en la determinación de la cantidad de oligosacáridos sintetizados, y definiendo además que existen 2 categorías de oligosacáridos: aquellos cuya presencia esta determinada por los grupos sanguíneos y los que son independientes de ellos.

I. Papel de los Oligosacáridos Lácteos Como Receptores Análogos

Con respecto a las infecciones bacterianas, la leche materna parece poseer un efecto biológico asociado a su fracción oligosacárida al proteger contra ellas; tal es el caso de la shigelosis y la otitis media (75).

La fracción oligosacárida de la leche humana contiene estructuras que son receptores para varios

microorganismos, análogos a los existentes sobre las células epiteliales. Por ejemplo, los pneumococos se unen a la porción oligosacárida de una neolactoceramida sobre las células faríngeas, y la leche humana inhibe la adherencia a tales células por un receptor análogo que se encuentra en la forma de GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal (5).

Muchas bacterias enteropatógenas son enterotoxigénicas, y las estructuras oligosacáridas de las glicoproteínas o glicolípidos parecen ser los receptores para ellas. Si tales estructuras están presentes en la fracción oligosacárida de la leche, una unión competitiva podría proveer protección contra esas toxinas (81).

De acuerdo con los trabajos realizados en modelos *in vivo* por Holmgren y cols. en 1981 (53), la leche humana y el calostro pueden inhibir la adherencia de cepas de *E. coli* y *V. cholerae* a eritrocitos, así como la unión de sus enterotoxinas a los receptores específicos en las membranas celulares.

El mayor grado de inhibición se encontró en la fracción no inmunoglobulínica de las muestras, por lo que se propuso que los componentes inhibitorios podrían ser estructuras análogas a los receptores involucrados, y que éstas actúan a través de una inhibición competitiva. Todo ello sugiere la presencia de residuos oligosacáridos como unidad activa, dado que se sabe que las toxinas se unen a una secuencia de carbohidratos específica del gangliósido GM₁ en el intestino.

Dos años después, el mismo grupo de investigadores caracterizó los factores en la leche humana responsables de la inhibición de la adherencia de *V. cholerae* a eritrocitos, sugiriendo que tales estructuras correspondían a glicomoléculas de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas de estabilidad al calor, unión a concanavalina A y destrucción de su actividad por oxidación con periodato (54).

En ese mismo año Kolsto y cols. (63), con un método de extracción y partición recomendado para la separación de gangliósidos, purificaron los componentes de la leche humana con actividad inhibitoria para las enterotoxinas de los dos microorganismos, demostrando que su naturaleza era

similar a la del gangliósido GM₁. De sus resultados concluyeron que los gangliósidos o las estructuras semejantes a ellos presentes en la leche materna, aún cuando sólo se encuentran en trazas, pueden ser importantes en la protección de los lactantes contra la diarrea inducida por enterotoxinas.

Cleary y cols. (24) mostraron que la leche humana contiene una fracción que protegía a los ratones lactantes de los efectos de la enterotoxina termoestable (ST) de *E. coli* administrada por vía orogástrica. Este factor protector era de bajo peso molecular y estable al calor y al tratamiento con ácidos ó álcalis, por lo que se sugirió que su naturaleza era oligosacárida, siendo un análogo estructural del receptor para la ST en el intestino.

Algunos años después, Newburg y cols. (82) encontraron que esta actividad protectora se localizaba sistemáticamente en una fracción de oligosacáridos neutros de la leche, proporcionando evidencia de la existencia de este factor y de su identidad como un pequeño oligosacárido fucosilado mediante el desarrollo de técnicas para su aislamiento. Demostraron, además, que los oligosacáridos fucosilados disponibles comercialmente no desarrollaban la actividad protectora contra ST, y finalmente concluyeron que el componente minoritario activo podría interferir con la actividad de ST actuando como un análogo para el receptor de esta toxina en la mucosa intestinal.

Por su parte Andersson y cols. (4) han demostrado que la leche inhibe la adherencia de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* a las células epiteliales bucales o faríngeas, pero mediante mecanismos diferentes. La inhibición del primero se explicó en parte por el contenido de oligosacáridos, correspondientes a la porción carbohidrato de la serie de neolactosas de los glicolípidos que se sabe actúan como receptores para él. Esta fracción no tuvo efecto sobre *H. influenzae*, por lo que de la caracterización del componente que inhibe su adherencia podría ser dilucidado el receptor epitelial para la bacteria.

Alphen y cols. (2), en un estudio muy completo de la inhibición de la adherencia mediada por

fimbrias de *H. influenzae*, establecieron varios puntos importantes, entre los que se destaca que la exposición previa de las cepas fimbriadas de *H. influenzae* a diferentes gangliósidos, resulta en la inhibición de la interacción entre esta bacteria y las células epiteliales orofaríngeas y los eritrocitos. Así mismo, que la inhibición está gobernada por los grupos de ácido siálico, el grupo ceramido y la glucosa presentes en la molécula, estableciéndose un receptor de naturaleza glicolipídica en el que el grupo ceramido determina la orientación apropiada de los sitios de unión de la fimbria. Finalmente, sugieren que muchas bacterias que reconocen receptores de este tipo son invasivas, por lo que probablemente la interacción entre *H. influenzae* y su receptor lactosilceramido facilita o dispara el proceso de invasión.

Por otro lado, el papel de las mucinas en la prevención de la adherencia bacteriana a los tejidos epiteliales ya ha sido documentada (37,74,92). Se conocen alrededor de 200 cadenas carbohidrato que se unen al péptido central de los monómeros de mucina por enlaces o-glicosídicos, por lo que exhiben un alto grado de diversidad estructural. Por lo tanto, también las mucinas que se encuentran en las secreciones humanas o en las membranas epiteliales son candidatos adecuados para expresar una gran variedad de estructuras análogas a los receptores para las adhesinas bacterianas. Las mucinas son constituyentes regulares de la leche humana. Así, por ejemplo, la unidad estructural común de todos los glicanos ácidos, en las mucinas lácteas, es la unidad disacárida terminal NeuAc α -(2 \rightarrow 3)-Gal β , la que se ha demostrado que actúa como un receptor análogo para la *E. coli* S-fimbriada (93).

Así, los receptores análogos en la leche humana pueden disminuir la ocurrencia de infección e inflamación bloqueando la unión de los microorganismos a la mucosa (5).

III. JUSTIFICACION DEL PROYECTO

Son numerosos los estudios que avalan el papel protector de la leche materna en la defensa de los lactantes contra infecciones gastrointestinales. Es bien sabido que contiene un alto contenido de IgA secretora contra una gran variedad de microorganismos, así como componentes protectores de naturaleza no inmunoglobulínica. Se ha propuesto que la leche humana y el calostro pueden contener glicocompuestos análogos a los receptores celulares que pueden prevenir la adherencia bacteriana por competencia con los receptores sobre las células blanco (27,53,54,63).

Dado que las enfermedades gastrointestinales son un problema de salud pública en la población infantil menor de dos años de edad, y entre ellas *C. jejuni* es una causa común de diarrea bacteriana aguda, es muy importante contar con medidas preventivas y terapéuticas para el tratamiento de este tipo de enfermedades.

Para determinar el papel preciso que juegan tales componentes en la protección del niño contra la infección por *C. jejuni*, es necesario purificarlos y caracterizarlos en cuanto a estructura y naturaleza química. Su conocimiento nos abrirá el camino hacia nuevas perspectivas de aplicación, como son:

- Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico. El contar con receptores análogos purificados específicos para las cepas patógenas de *C. jejuni* nos permitirá el montaje y estandarización de ensayos rápidos de diagnóstico, como podría ser la coaglutinación, que presenta ventajas en cuanto a tiempo de realización y bajo costo relativo, aunadas a su alta sensibilidad y especificidad.
- Un mejor conocimiento de los factores responsables de la patogénesis de *C. jejuni* es esencial para establecer sus marcadores de virulencia. Mediante el uso de los receptores análogos, se podrán establecer ensayos de inhibición *in vitro* y en modelos animales que nos ayuden a

diferenciar el potencial patógeno de cepas aisladas de casos de diarrea y de portadores asintomáticos.

- El determinar la composición de los receptores análogos para *C. jejuni* presentes en la leche materna y que protegen a los niños en forma natural, permitirá su búsqueda posterior en otros medios naturales como pueden ser plantas y otras fuentes para su producción y purificación a gran escala, con el fin de poder suplementar con ellos las fórmulas lácteas para bebés, y así conferir la protección con esos componentes a aquellos niños no alimentados al seno materno.

- Se ha sugerido, además, que la fracción oligosacárida de la leche materna estimula el crecimiento de *Bifidobacterium bifidum*, bacteria que al colonizar el intestino provoca dos efectos principales: la fermentación anaeróbica de azúcares, lo que disminuye considerablemente el pH intestinal, y la habilidad para inhibir la colonización del intestino con bacterias potencialmente enteropatógenas. Tales efectos, conocidos en conjunto como "actividad bifidus", son notables en la leche humana, siendo mucho menores en la leche de bovinos.

IV. HIPOTESIS

Existen factores de naturaleza no inmunoglobulínica presentes en la leche materna que son capaces de actuar como receptores análogos inhibiendo la adherencia y/o invasión de *Campylobacter jejuni* a las células epiteliales.

V. OBJETIVOS

Para corroborar la hipótesis se plantearon cinco objetivos específicos:

1. Purificación de componentes oligosacáridos de una poza de leche materna.
2. Definir si las fracciones oligosacáridas obtenidas son capaces de actuar como receptores análogos, mediante la inhibición de la asociación de *C. jejuni* a células HEp-2.
3. Determinar si otras fracciones de naturaleza proteica y/o lipídica obtenidas de la leche materna son capaces de funcionar como receptores análogos en los ensayos de inhibición de la asociación a células HEp-2.
4. Establecer un modelo animal que permita valorar la colonización por cepas de *C. jejuni* (inóculo, vía de administración, seguimiento, tasa morbi/mortalidad).
5. Estudiar *in vivo* la capacidad de los receptores análogos para inhibir la colonización por *C. jejuni*.

VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

OBJETIVO 1. Purificación de componentes oligosacáridos (OS) de una poza de leche materna.

Dado que la presencia de ciertos oligosacáridos en la leche materna está relacionada con los grupos sanguíneos, con las glicosiltransferasas responsables de su biosíntesis que son codificadas genéticamente, además de estar sujetos a modificaciones cuantitativas a través del período de lactancia (61,81,103), la purificación de las fracciones se realizó de un conjunto de leches obtenidas de diferentes madres (poza).

Extracción de oligosacáridos crudos.

La primera fracción de oligosacáridos crudos (OS-C) se obtuvo después de eliminar los lípidos y las proteínas de la muestra por el método de Egge (36), utilizando una columna de carbón-celita descrita inicialmente por Whistler (106), en la que los OS son separados de acuerdo con su grado de polimerización, lo que permite eliminar la lactosa, el disacárido más abundante en leche materna.

Extracción de oligosacáridos neutros y ácidos.

Mediante una columna de intercambio iónico se separó la fracción mayoritaria de oligosacáridos neutros (OS-N) de los oligosacáridos ácidos (OS-A) cuya proporción en la leche es de 300:1 (82).

Extracción de oligosacáridos fucosilados.

Finalmente, y considerando que se ha demostrado previamente la inhibición de la asociación de *Campylobacter* a células por L-fucosa (22,76), una porción de los OS-N se aplicó a una columna cromatográfica con la lectina *Ulex europaeus* cuya especificidad para ligar residuos fucosilados es bien conocida (57); después de eluir la fracción no-fucosilada, los oligosacáridos fucosilados (OS-F) se eluyeron incrementando la osmolaridad en la columna con un amortiguador de alta fuerza iónica (82).

Cromatografía en capa fina.

Se utilizaron métodos complementarios, como la cromatografía en capa fina con placas de aminopropilsilica, en las que los OS se fijan por su extremo reductor (73) y se revelan por la condensación de sus grupos aldehídicos con grupos fenólicos, para el monitoreo y verificación de cada una de las fracciones.

Determinación de proteínas.

Se utilizó el método de Bradford para determinar si existían proteínas copurificadas en cada una de las fracciones oligosacáridas obtenidas.

Separación de la fracción fucosilada mediante HPLC.

El uso de métodos microanalíticos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permitió la separación de los componentes de la fracción fucosilada, con el uso de columnas de tipo preparativo (81) se puede contar con cantidades suficientes de cada uno de estos componentes para estudios posteriores.

OBJETIVO 2. Definir si las fracciones oligosacáridas obtenidas son capaces de actuar como receptores análogos mediante la inhibición de la asociación de *C. jejuni* a células HEp-2.

En el laboratorio de infectología del INNSZ se han realizado estudios longitudinales sobre las infecciones por *Campylobacter* en cohortes de niños menores de 5 años (21). De ellos se han aislado cepas de cuadros clínicos característicos, como diarrea de tipo inflamatorio y diarrea de tipo secretor, así como de niños asintomáticos; además se han estandarizado métodos *in vitro* que nos han permitido valorar la capacidad de las cepas para adherirse e invadir líneas celulares, de producir enterotoxina y citotoxina, y de correlacionar estos posibles factores de virulencia con el cuadro clínico del cual se aislaron (22).

Estudios *in vitro* de inhibición de la asociación de *Campylobacter* a células HEp-2. Haciendo uso del ensayo en microcámaras de cultivo (22,71), se estandarizó un ensayo de inhibición para definir la capacidad de las distintas fracciones de OS para interferir con el grado de asociación

de *C. jejuni* a las células HEP-2. Se utilizaron tres cepas prototipo caracterizadas previamente como invasiva (INN-383IP), adherente (INN-10SP) y no adherente/no invasiva (INN-57SP), para determinar si la habilidad de esos componentes para inhibir su asociación estaba o no influida por el tipo de interacción bacteria-célula. Cada ensayo se realizó por triplicado, considerando los resultados como la media \pm DS: el grado de inhibición fue significativo cuando el porcentaje de asociación se redujo al menos en un 20% comparado con los controles.

Una vez establecido el ensayo y habiendo demostrado que existían fracciones con capacidad inhibitoria para una de las cepas prototipo, se decidió ampliar el grupo de cepas en estudio para corroborar los resultados obtenidos durante la estandarización y hacerlo estadísticamente significativo; se ensayaron 47 cepas, 22 de ellas invasivas y 25 adherentes, con la fracción de OS que mostró el mayor porcentaje de inhibición y que además durante el proceso de purificación se obtiene en concentración suficiente.

OBJETIVO 3. Determinar si otras fracciones de naturaleza proteica y/o lipídica obtenidas de la leche materna son capaces de funcionar como receptores análogos en los ensayos de inhibición a células HEP-2.

Aun cuando se ha descrito que las porciones carbohidrato de los glicoconjugados, que se encuentran en las membranas celulares, son las responsables de las interacciones bacteria-célula (8,94,104), era necesario determinar el posible papel de los componentes proteicos y lipídicos de la leche materna en la inhibición de la asociación de *C. jejuni* a los cultivos celulares.

Estudios *in vitro* de inhibición de la asociación con fracciones lipídicas y proteicas.

Todas las fracciones probadas fueron cedidas amablemente por el Dr. David Newburg del Shriver Center for Mental Retardation en Boston, MA.; de acuerdo con los esquemas de purificación desarrollados en su laboratorio, utilizamos un total de 12 fracciones proteicas de naturaleza no inmunoglobulínica y clasificadas de acuerdo con su peso molecular en mayores de 100 kDa y

menores de 100 kDa; y cinco fracciones lipídicas agrupadas como lípidos neutros de fase inferior, glicolípidos, fosfolípidos, lípidos neutros de fase superior y gangliósidos.

Mediante el ensayo de inhibición en microcámaras de cultivo, se probaron cada una de las fracciones con las cepas prototipo: al igual que con los OS, cada ensayo se realizó por triplicado, considerando los resultados como la media \pm DS.

OBJETIVO 4. Establecer un modelo animal que permita valorar la colonización por cepas de *C. jejuni* (inóculo, vía de administración, seguimiento, tasa de morbi/mortalidad).

El establecimiento de un modelo animal adecuado de la enteritis por *Campylobacter* se ha considerado esencial para la comprensión de la patogénesis del padecimiento, siendo necesario para determinar cualitativa y cuantitativamente la virulencia de las cepas aisladas y que epidemiológicamente son importantes. Muchos intentos se han realizado para infectar diversos animales, se han probado desde bovinos y carneros (42) hasta mamíferos pequeños como conejos (20,85) y hamsters (1).

Russell y cols. (90) estudiaron monos en los que además de demostrar la transmisión oro-fecal, asentaron que la infección de 3 a 4 semanas de duración, con una cepa de *C. jejuni* en particular, era similar al curso de la infección en humanos susceptibles. Por su parte, Rufz-Palacios y cols. (88) desarrollaron un modelo experimental en pollos recién nacidos, en los que fueron capaces de inducir diarrea con pequeños inóculos bacterianos administrados en forma oral. Aún cuando los modelos en monos y pollos han sido sumamente útiles, presentan algunas desventajas en cuanto a las condiciones prácticas necesarias para el manejo de los animales.

Son diversos los estudios que se han realizado utilizando ratones como modelo experimental (38,69,109). El incremento hasta en 100 veces del número de microorganismos recuperados de los ratones inoculados en forma experimental, confirma la eficiencia de la colonización y de la subsecuente proliferación de *C. jejuni* en el medio intestinal (84).

El uso de ratones presenta algunas ventajas sobre otro tipo de animales, como su fácil manejo y mantenimiento a relativamente bajo costo, su disponibilidad y la facilidad de reproducir las condiciones experimentales en diferentes laboratorios y en distintos periodos. Por tales razones, se eligió trabajar con ratones Balb/c para el desarrollo de nuestro modelo de colonización, tomando en cuenta que la susceptibilidad de los animales, la virulencia de la cepa y el inóculo administrado son puntos importantes para el éxito de su establecimiento (38,84,109).

De acuerdo con los estudios de Blaser y cols. (13) y Field y cols. (40,41), la colonización de ratones adultos es inconsistente por la flora normal del intestino así como por la resistencia propia del animal a la infección, por lo que se requiere de inóculos relativamente grandes para lograr establecerla. Por esta razón decidimos trabajar con ratones de 10 a 15 días de nacidos, que se inocularon por vía oral, que es la ruta natural de infección, con 10^4 y 10^8 UFC/ml de cada una de las cepas prototipo.

Además de contar con grupos controles, se definió un esquema de seguimiento previo a la infección, para verificar la no presencia de *C. jejuni* o bacterias espirales semejantes a *Campylobacter* en el intestino de los animales. La colonización se determinó como el grado de excreción de *Campylobacter* posterior a la infección, cuantificándose como UFC de *Campylobacter* por gramo de heces.

OBJETIVO 5. Estudiar *in vivo* la capacidad de los receptores análogos para inhibir la colonización por *C. jejuni*.

Una vez establecido el modelo experimental que nos permitió valorar la colonización por cepas de *Campylobacter*, se diseñó un ensayo de inhibición *in vivo* con los OS que resultaron relevantes en los ensayos *in vitro* para definir si su capacidad de interferencia en ambos casos era la misma.

Se conformaron cuatro subgrupos de animales por cada ensayo: un subgrupo de prueba que recibió tres dosis de OS por vía oral y el reto con *Campylobacter*, un subgrupo control de colonización; además de dos subgrupos controles de esterilidad y toxicidad.

De acuerdo con lo reportado en la literatura (13), la infección experimental de los ratones no provocó ningún cuadro clínico pero pudo observarse una marcada diferencia en el grado de excreción de la bacteria, dependiendo de sus características de virulencia *in vitro*. Por ello se consideró que la inhibición de la colonización con los OS debería definirse como una disminución importante del grado de excreción bacteriana en heces, durante el periodo de seguimiento.

VII. METODOS

A. PURIFICACION DE LOS OLIGOSACARIDOS DE LA LECHE MATERNA.

(Objetivo 1)

La purificación se realizó de acuerdo al método descrito por Newburg y cols. (82). Brevemente: una poza de leche materna se centrifuga a 3,000g, a 4°C durante 1h; se elimina la fase lipídica y la fase acuosa remanente se mezcla con un volumen igual de acetona, dejándose en agitación constante durante toda la noche y a 4°C para precipitar las proteínas. Después de centrifugar a 3,000g por 45 minutos, el sobrenadante se concentra por evaporación rotatoria hasta un volumen aproximado de 200ml y se pasa por una columna Chromaflex de 1L, empacada con carbón-celita; se eluye la lactosa con etanol al 5% y posteriormente se eluye la fracción oligosacárida cruda con etanol al 65%. Esta fracción cruda se somete a una cromatografía de intercambio iónico, con la resina de intercambio aniónico AG 1-X2 (Formato), para separar los oligosacáridos neutros de los ácidos, por elución con ácido fórmico 1M; 25mg de la fracción neutra se aplica a una columna de 50ml con la lectina *Ulex europaeus*, de donde se eluyen los oligosacáridos no fucosilados con un amortiguador de bicarbonato pH 7.4 (15mM NaHCO₃, 150mM NaCl, 0.1mM CaCl₂, 6mM NaN₃). Los oligosacáridos fucosilados retenidos se eluyen, finalmente, incrementando la concentración de NaCl en el amortiguador hasta 1M (Diagrama 1).

Rendimiento y monitoreo.

Para verificar el rendimiento de cada una de las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación, cada una de ellas se concentró por evaporación rotatoria, se secó bajo corriente de N₂, se liofilizó y se determinó su peso seco. Posteriormente, para verificar su composición, cada fracción se sometió a una cromatografía en capà fina, utilizando como soporte placas de aminopropilsilica y eluyendo con una mezcla de piridina/acetato de etilo/ácido acético/agua (6:2:1:2) y revelando con orcinol al 0.2% en H₂SO₄ 2.5N.

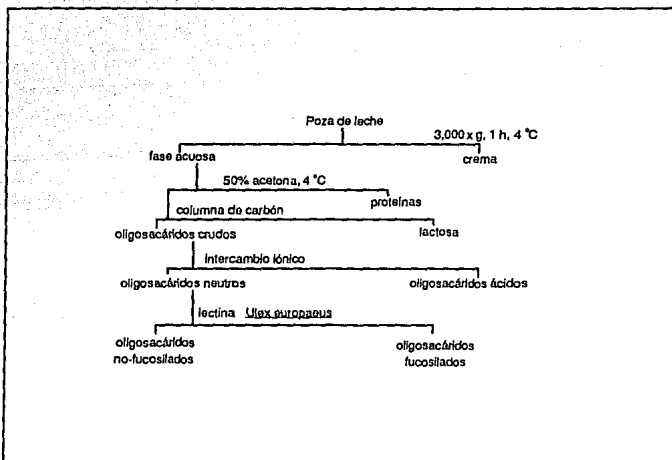


Diagrama I. Preparación de las fracciones oligosacáridas de la leche materna.

HPLC.

Finalmente, 20mg de la fracción de oligosacáridos fucosilados se sometieron a cromatografía líquida de alta resolución. Se utilizó una columna de aminosilica (NH_2 , 83C, 300x10mm), un gradiente lineal de acetonitrilo/agua (85%/15% hasta 15%/85%) para la elución, con un flujo de 0.5ml/min, y un sistema de detección basado en la absorbancia a 195nm.

B. METODOS *IN VITRO*. (Objetivos 2 y 3).

1. Definición de las cepas de *Campylobacter jejuni*.

Las cepas de *C. jejuni* fueron aisladas de niños con diarrea participantes en un estudio longitudinal en comunidad de infecciones entéricas. Se utilizaron un total de 47 cepas, 22 invasivas y 25 adherentes. Para la estandarización de cada uno de los ensayos se utilizaron tres cepas prototipo de *C. jejuni*, una invasiva (INN-383IP), una adherente (INN-10SP) y una no adherente/no invasiva (INN-57SP).

2. Fracciones de la leche materna.

Fracciones oligosacáridas. Se probaron las 5 fracciones oligosacáridas obtenidas de la purificación: oligosacáridos crudos, neutros, ácidos, fucosilados y no fucosilados (Diagrama 1).

Fracciones proteicas. Se probaron 12 fracciones de naturaleza no inmunoglobulínica obtenidas del proceso de separación (Diagrama 2).

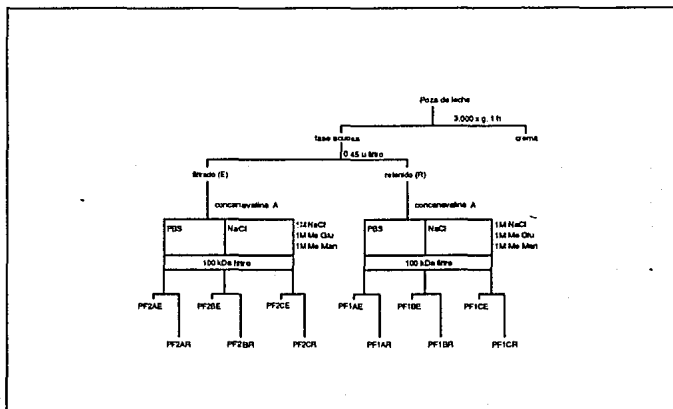


Diagrama 2. Preparación de las fracciones proteicas de la leche materna.

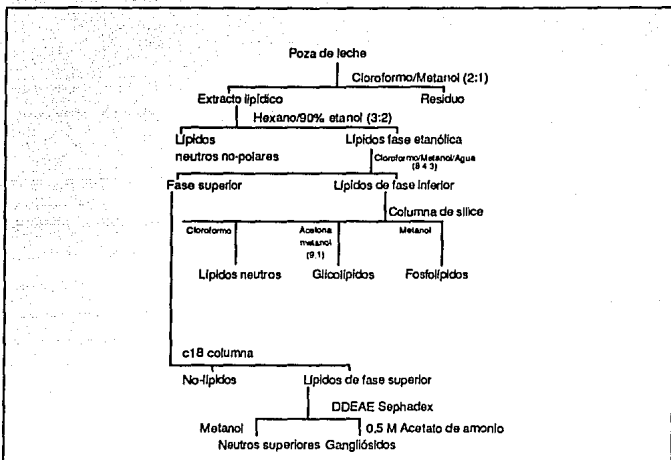


Diagrama 3. Preparación de las fracciones glicolípidas de la leche materna.

Fracciones lipídicas. Se probaron las fracciones obtenidas a partir de los lípidos de fase inferior: lípidos neutros, glicolípidos y fosfolípidos, y los lípidos de fase superior neutrales y gangliósidos (Diagrama 3).

3. Métodos *in vitro* para asociación e invasividad.

Cultivo de células HEP-2 en microcámaras de cultivo (asociación). El método descrito por Cravioto (29) para *E. coli* enteropatógena se utilizó con algunas modificaciones (22); 400µl por pozo de una suspensión con 2×10^5 células viables/ml se colocan en microplacas de cultivo de 8 pozos y se incuban por 18h a 37°C en atmósfera con 8% de CO₂. Las células se lavan con Hank's PBS; 100µl de una suspensión de *Campylobacter*, con 3×10^9 UFC/ml, se adiciona a uno de los pozos y se incuban por 5h a 37°C. Las células se lavan, se fijan con formalina y se tiñen por el método de Warthin-Starry. La placa se observa al microscopio para determinar las células con bacterias asociadas. Los resultados se interpretan como porcentaje de células con bacterias asociadas. Una cepa se considera adherente cuando el 20% de las células presentan bacterias asociadas.

Cultivo de células HEP-2 en esferas de sephadex (invasión). De acuerdo al método diseñado en nuestro laboratorio (22,71), 3mg de microacarreadores Cytodex 2 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) se colocan en matraces Erlenmeyer de 10ml, se rehidratan, lavan y resuspenden en PBS y son esterilizados. Un ml de una suspensión con 2×10^5 células HEP-2 viables/ml se adiciona a cada matraz y se incuban en rotación intermitente a 37°C durante 3 horas. Posteriormente se dejan en agitación continua a 80 rpm hasta alcanzar confluencia (aprox. 48h) incubando a 37°C con 8% de CO₂. Inóculos de 1ml de una suspensión bacteriana con 9×10^8 UFC/ml de *Campylobacter* marcado con [³H] alanina y [³H] leucina se incuban por duplicado con los cultivos celulares confluentes, durante 5h a 37°C con 8% de CO₂. Se lavan las esferas y se adicionan 100µg/ml de gentamicina a uno de los matraces; se incuban por una hora más y posteriormente se lavan 3 veces con PBS, se lisan las células con etanol y agitación fuerte en vórtex durante 15 minutos y se transfieren a frascos de centelleo con 10ml de Aquasol para ser contados. Los resultados se interpretan de acuerdo a un índice de invasividad.

cpm Frasco 1 (Gentamicina)

Índice de Invasividad = ----- x 100

cpm Frasco 2 (MEM-Eagle)

Una cepa se considera invasiva cuando el índice de invasividad es >60%.

4. Ensayos de inhibición con las fracciones de la leche materna.

La determinación de la capacidad de las fracciones de actuar como receptores análogos, se realizó mediante ensayos de inhibición de la asociación a células HEP-2, en microcámaras de cultivo. Para ello, cada una de las fracciones se puso en contacto con las cepas de *C. jejuni*, incubándose durante 1h a temperatura ambiente antes de ponerlas en contacto con las monocapas celulares; al mismo tiempo se realizó un ensayo de asociación normal como control. Después del tiempo de incubación establecido, se lavaron las células y se tiñeron por el método de Warthin-Starry. El porcentaje de inhibición se determinó comparando ambos ensayos, considerando una fracción como positiva cuando disminuyó al menos en un 20% el porcentaje de asociación de la cepa en el ensayo control .

C. MODELOS *IN VIVO*. (Objetivos 4 y 5).

1. Modelo experimental de colonización.

Se utilizó el modelo establecido por Blaser y cols. (13) con algunas modificaciones:

Animales. Ratonos Balb/c de 10 a 20g en peso se mantuvieron en jaulas, separados por pares o bien en grupos de tres, alimentados con Purina y agua a discreción.

Cepas. Se utilizaron las tres cepas prototipo de *C. jejuni* INN-383IP, INN-10SP e INN-57SP clasificadas como invasiva, adherente y no adherente/no invasiva, respectivamente.

Inóculo. Se crecieron cultivos puros de *C. jejuni* sobre agar-sangre de carnero, incubándose a 42°C en atmósfera microaerofílica (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂) durante 24h. Se prepararon suspensiones conteniendo 10⁴ y 10⁸ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml, en solución amortiguadora de fosfatos (PBS), pH 7.2, de acuerdo al nefelómetro de McFarland.

Infección de los ratones. Diariamente se registró el peso de los animales y durante los dos días previos a la infección se realizó la búsqueda de *C. jejuni* y otros enteropatógenos sembrando muestras de heces de cada uno de los animales en Campy-Bap, agar-sangre de carnero y agar McConkey. Al tercer día se realizó la infección, administrando por vía oral 0.1 ml de la suspensión correspondiente de *Campylobacter*. La dosis se verificó en forma retrospectiva, realizando la cuenta de UFC/ml en placas de agar-sangre de carnero.

Excreción bacteriana. La excreción de *Campylobacter* posterior a la infección se determinó diariamente, colectando muestras de heces durante 5 días. Cada muestra se pesó y homogenizó en un ml de caldo tioglicolato, se centrifugó a 1000g por 10min para eliminar el exceso de materia orgánica y mediante la siembra por estría radial del sobrenadante sobre agar-sangre de carnero, en forma directa y en diluciones seriadas, se determinaron las UFC por gramo de heces. Las colonias sospechosas se examinaron por tinción de Gram para la búsqueda de la morfología típica de *Campylobacter* y por la prueba de oxidasa.

2. Inhibición de la colonización *in vivo*.

Para la inhibición *in vivo* se utilizaron los oligosacáridos neutros (OS-N), que por ensayo de asociación a células HEP-2, en microcámaras de cultivo, mostraron un 71% de inhibición. Cada grupo de ensayo consistió de 18 ratones: el subgrupo de prueba, conformado por 6 animales, recibió tres dosis por vía oral de los OS-N (cada dosis de 2mg/ml), administradas 2 horas antes de la inoculación con *Campylobacter*, junto con el inóculo y dos horas después. Se formaron tres subgrupos controles: el de colonización, también con 6 animales, al que se le administró Solución Salina Isotónica (SSI) y el inóculo correspondiente de *Campylobacter*; un subgrupo control de toxicidad que solamente recibió las tres dosis de oligosacáridos y no fue inoculado con la bacteria; y un subgrupo de control de esterilidad o negativo al que sólo se le administró SSI (Tabla 1). La excreción de *Campylobacter* se cuantificó por cultivo diario de las heces, determinando UFC/g de heces. Los ratones fueron seguidos 3 días antes y 5 días después del reto.

Tabla 1. Diseño de los ensayos de inhibición de la colonización *in vivo* con oligosacáridos neutros (OS-N)

Subgrupos de animales (n=18)	Tiempo de Administración (horas)		
	-2	0	2
Prueba (n=6)	1a. Dosis OS-N	2a. Dosis OS-N + Inóculo	3a. Dosis OS-N
Controles:			
Colonización (n=6)	SSI	Inóculo	SSI
Toxicidad (n=3)	1a. Dosis OS-N	2a. Dosis OS-N	3a. Dosis OS-N
Esterilidad (n=3)	SSI	SSI	SSI

SSI= Solución Salina Isotónica

Inóculo= 10^4 ó 10^8 UFC/ml de *Campylobacter*

n= número de animales en cada subgrupo

VIII. RESULTADOS

A. PURIFICACION DE LOS OLIGOSACARIDOS DE LA LECHE MATERNA.

Purificación y rendimiento de las fracciones oligosacáridas.

Partiendo de un volumen inicial de 1750ml de leche materna, se obtuvieron 116g de lactosa de la columna de carbón-celita, por elución con etanol al 5%, lo que representa el 6.62% (p/v); y por elución con etanol al 65%, 5.43g de oligosacáridos crudos, lo que a su vez representa el 0.31% (p/v) del volumen inicial.

Con el uso de la resina de intercambio iónico se separaron aproximadamente 5g de oligosacáridos neutros y 15 mg de oligosacáridos ácidos que eluyeron con ácido fórmico.

De 25mg de oligosacáridos neutros que se aplicaron a la columna de afinidad con la lectina, aproximadamente el 90% de la fracción obtenida correspondió a oligosacáridos no fucosilados y el 10% a los fucosilados.

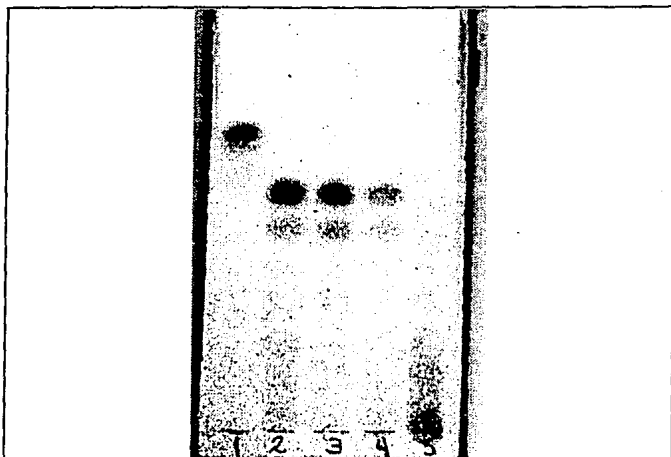


Figura 1. Cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones oligosacáridas obtenidas.

- Carril 1. Estándar de glucosa
- Carril 2. Oligosacáridos crudos (OS-C)
- Carril 3. Oligosacáridos neutros (OS-N)
- Carril 4. Oligosacáridos fucosilados (OS-F)
- Carril 5. Oligosacáridos ácidos

En la Figura 1 se muestra el cromatograma en capa fina de las fracciones obtenidas; cada una se ajustó a una concentración de 10µg de oligosacáridos por carril, revelándose con orcinol al 0.2% en H₂SO₄ 2.5N. Para asegurar que ninguna de ellas presentara componentes proteicos copurificados, se les realizó determinación de proteínas por el método de Bradford, en todos los casos la prueba fué negativa.

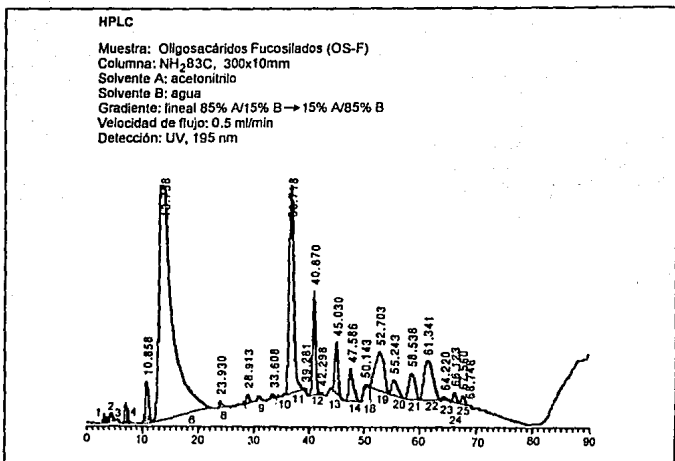


Figura 2. Cromatograma de la fracción de oligosacáridos fucosilados por HPLC.

HPLC.

20mg de la fracción de oligosacáridos fucosilados se sometieron a Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), obteniéndose un perfil cromatográfico de 25 picos, por absorbancia a 195nm, que fueron colectados por separado y que se mantienen para estudios posteriores (Figura 2).

B. METODOS *IN VITRO*.

Ensayos de inhibición con las fracciones de leche.

Se demostró que las fracciones oligosacáridas, obtenidas de la leche deslipidizada y desproteinada, eran capaces de inhibir la asociación de la cepa invasiva de *C. jejuni* a las células HEp-2, no así la de la cepa adherente. No se observó inhibición significativa de la asociación con ninguna de las fracciones lipídicas o proteicas de naturaleza no-inmunoglobulínica.

En la Tabla 2 y Figura 3 se muestra el efecto *in vitro* de los oligosacáridos de la leche materna en la interacción de las dos cepas prototipo de *Campylobacter* con las células HEp-2.

Tabla 2. Efecto *in vitro* de los oligosacáridos de la leche materna en la interacción de las cepas de *Campylobacter* con las células HEp-2*

Oligosacáridos (mg/ml)	Asociación de <i>Campylobacter</i> a células HEp-2*	
	Invasiva (INN-383IP)	Adherente (INN-10SP)
PBS	65±3.3	71±5.7
Crudos (3)	25±4.5 (62)	72±5.2 (0)
Neutros (3)	19±2.6 (70)	60±4.5 (14)
Acidos (1)	65±5.5 (0)	78±6.2 (0)
No-fucosilados (2.3)	62±2.1 (4)	69±5.8 (1.5)
Fucosilados (0.2)	30±8.1 (54)	79±2.0 (0)

* Los datos están dados como porcentaje de células infectadas. Cada valor representa la media ± DS de tres experimentos. En paréntesis está el porcentaje de inhibición con respecto al control.

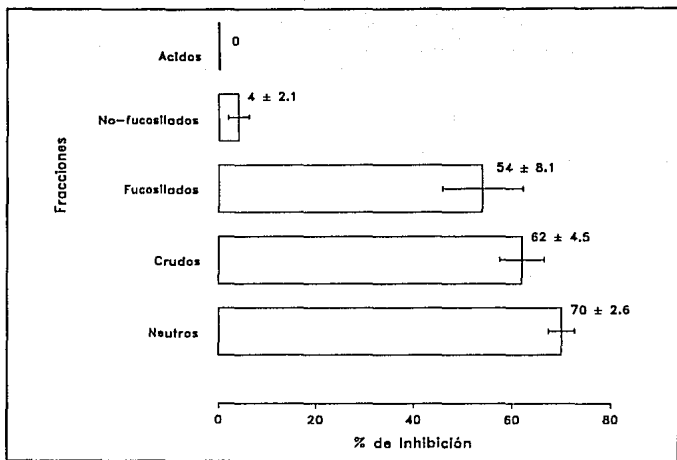


Figura 3. Efecto in vitro de los oligosacáridos de la leche materna en la interacción de la cepa invasiva de *Campylobacter* con las células HEP-2.

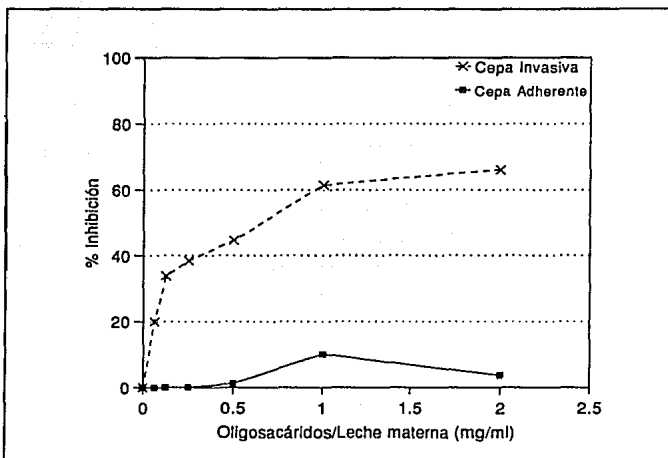


Figura 4. Inhibición de la asociación de *Campylobacter jejuni* a células HEp-2 por oligosacáridos crudos de leche materna.

Con los oligosacáridos crudos se observó un porcentaje de inhibición significativo desde una dilución 1:4 de la concentración equivalente en leche materna, porcentaje que aumentó conforme se disminuyó la dilución de la fracción hasta alcanzar un 62% con la concentración equivalente a la de la leche (Figura 4).

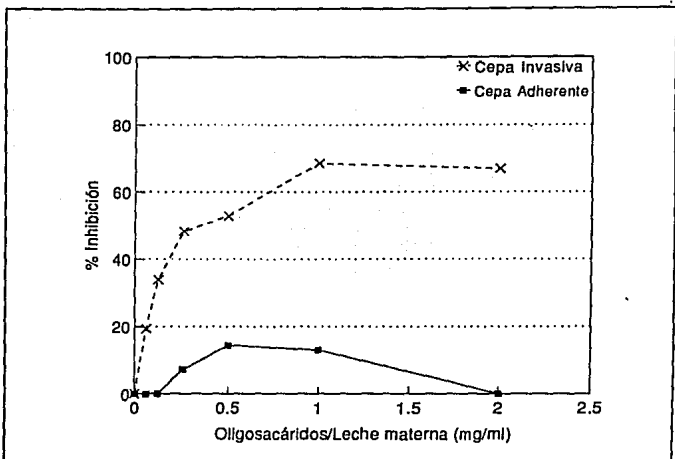


Figura 5. Inhibición de la asociación de *Campylobacter jejuni* a células HEp-2 por oligosacáridos neutros de la leche materna.

Un patrón similar se observó con los oligosacáridos neutros, resultantes de la separación de la fracción cruda por cromatografía de intercambio iónico, cuyo porcentaje de inhibición fué del 70% (Figura 5); con la segunda fracción obtenida de los oligosacáridos crudos, la fracción de oligosacáridos ácidos, no se observó inhibición significativa.

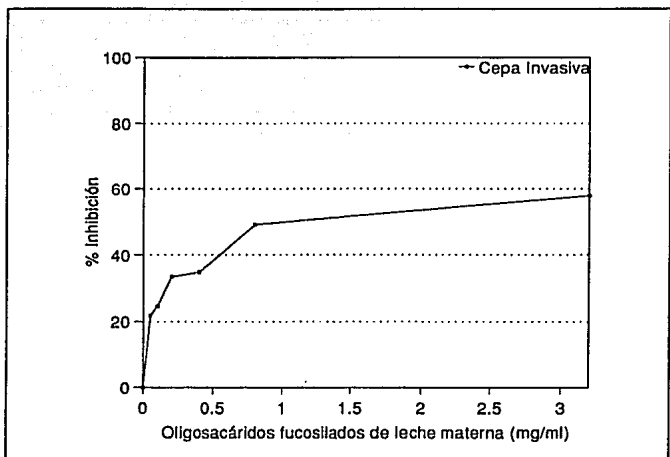


Figura 6. Inhibición de la asociación de *Campylobacter jejuni* a células HEP-2 por oligosacáridos fucosilados de la leche materna.

Se demostró que los componentes con actividad inhibitoria se encontraban principalmente entre los oligosacáridos fucosilados, ya que al pasar la fracción neutra a través de una columna con la lectina *U. europeus*, con afinidad por residuos fucosilados (72), no se observó actividad con la fracción no retenida de oligosacáridos no-fucosilados, mientras que la mayor parte se concentró en la fracción fucosilada eluída de la columna con un amortiguador de alta fuerza iónica. Se detectaron porcentajes de inhibición significativos con concentraciones por abajo (0.1mg/ml) o iguales (0.2mg/ml) a las encontradas normalmente en la leche (Figura 6).

Inhibición de la asociación de las cepas de *C. jejuni* con oligosacáridos neutros.

Para corroborar los resultados obtenidos con las cepas prototipo, se probaron un total de 47 cepas en el ensayo de inhibición utilizando oligosacáridos neutros. Se decidió utilizar esta fracción dado que con ella se encontró el mayor porcentaje de inhibición (70%), además de que durante el proceso de purificación se obtiene en mayor concentración que las fracciones subsecuentes.

Se determinó que de 22 cepas invasivas 18 (82%) fueron inhibidas por la fracción oligosacárida, mientras que sólo 5 de 25 (20%) de las cepas adherentes mostraron el mismo comportamiento. Cabe hacer notar que no se probaron cepas aisladas de casos asintomáticos, ya que sus Índices de Asociación son muy bajos (<10%), y metodológicamente no es posible determinar un grado de inhibición real.

En la Figura 7 se muestra el diagrama de dispersión de los porcentajes de inhibición para cada una de las cepas, siendo la media para las cepas invasivas de 42% y el correspondiente para las adherentes de 12%. Las diferencias entre las medias fueron probadas usando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney (28), resultando estadísticamente significativas con una $p=0.0002$.

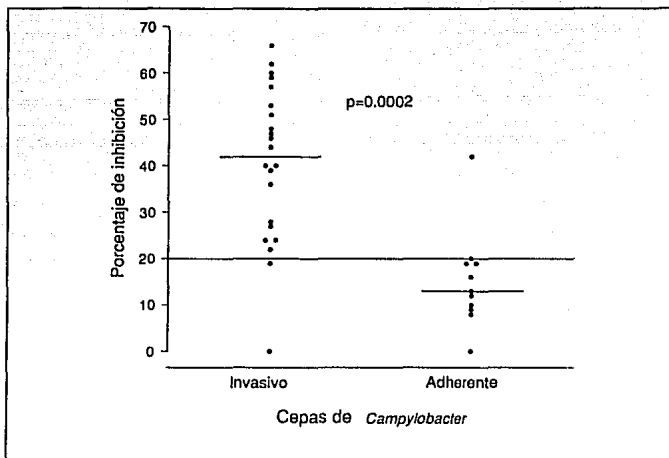


Figura 7. Porcentaje de inhibición de la asociación de diferentes cepas de *Campylobacter jejuni* a células HEp-2 por oligosacáridos neutros.

Comparación del ensayo de inhibición con oligosacáridos y el ensayo de esferas de sephadex. Los resultados obtenidos del ensayo de inhibición se compararon en tablas de contingencia con el ensayo de invasividad en esferas de sephadex, considerando a éste como el estándar de oro, para establecer si el primero podrá utilizarse como un método alternativo de identificación de cepas invasivas.

		Invasividad	
		Esferas de Sephadex	
		+	-
Inhibición de Asociación	+	18	5
	-	4	25

El ensayo mostró una sensibilidad del 81.8% y una especificidad del 83.3%, con un valor predictivo positivo de 78.3% y un valor predictivo negativo de 86.2%

C. MODELOS DE COLONIZACION.

I. Modelo *in vitro*.

Se ha demostrado que la asociación de *C. jejuni* a las células HEP-2 es un marcador de virulencia importante, para diferenciar cepas patógenas de no patógenas. En la Figura 8 se muestra el comportamiento de las tres cepas prototipo de *C. jejuni* en su interacción *in vitro* con las células HEP-2; puede observarse un incremento del Índice de Asociación (porcentaje de células con bacterias adheridas) para las dos cepas aisladas de cuadros clínicos característicos después de dos horas de contacto, alcanzando 70% de asociación después de 5 horas de incubación. No se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de asociación para ambas cepas en cualquiera de los tiempos empleados. Por otra parte, el porcentaje de asociación de la cepa no patógena se mantiene por abajo de 20%, aún después de 6 horas de incubación. En este sentido se estableció una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes determinados para esta cepa y las dos procedentes de casos de diarrea, con una $p=0.003$.

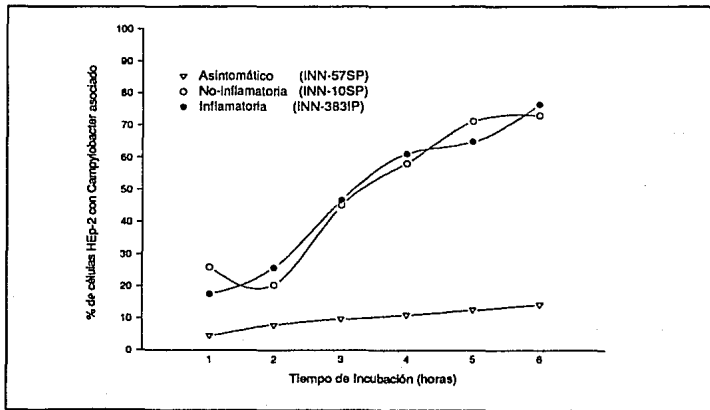


Figura 8. Comportamiento de las tres cepas prototipo de *Campylobacter jejuni* en su interacción *in vitro* con las células HEP-2.

2. Modelo *in vivo*.

El comportamiento *in vivo* de las tres cepas es muy similar al observado *in vitro* sin embargo, y aún cuando se pudo determinar la colonización por la excreción de campylobacter en las heces, en ningún caso se produjo un cuadro clínico ni se detectó pérdida de peso de los animales.

En la Figura 9 (Cada punto representa la media \pm DS de cada grupo de 6 ratones) se muestra la excreción de *Campylobacter* indicada como UFC/g de heces durante el tiempo de seguimiento; cada punto representa la media obtenida por grupo de animales indicándose la desviación estándar. La colonización ocurrió en todos los ratones con las cepas invasiva y adherente (INN-383IP e INN-10SP), utilizando un inóculo de 10^4 UFC/ml: a los cinco días se observó una excreción de $1.1 \pm 6 \times 10^9$ UFC/g de heces para la cepa invasiva y de $6.1 \pm 1.4 \times 10^6$ UFC/g de heces para la adherente. Con este inóculo no se observó excreción de la cepa no adherente/no invasiva (INN-57SP), por lo que su inóculo se incrementó en 4 logaritmos, obteniéndose una excreción de $6.3 \pm 9.6 \times 10^3$ UFC/g de heces a los cinco días de seguimiento. No obstante, se mantiene la diferencia estadísticamente significativa entre los dos tipos de cepas, las patógenas y no patógenas, con una $p < 0.005$.

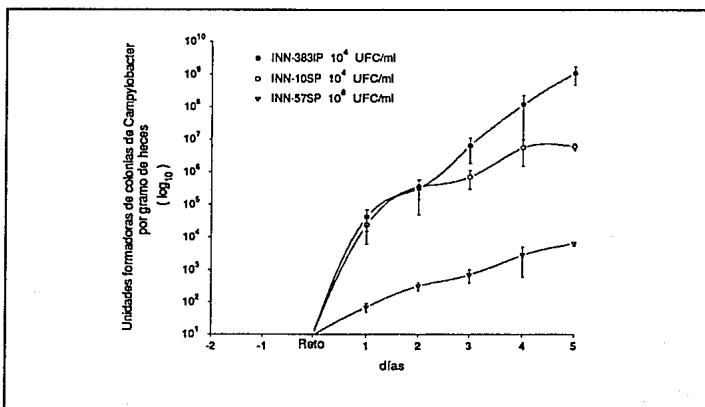


Figura 9. Colonización de ratones Balb/c (modelo *in vivo*) con las tres cepas tipo de *Campylobacter jejuni* (Ver Tabla 1, control de colonización).

Inhibición de la colonización.

En la inhibición se utilizaron oligosacáridos neutros y las tres cepas con un inóculo de 10^4 UFC/ml, para la cepa invasiva se utilizó además un inóculo de 10^8 UFC/ml.

De acuerdo con lo esperado por los ensayos *in vitro*, no se encontró inhibición de la colonización con la cepa adherente. Como se observa en la Figura 10, las curvas de seguimiento para los dos grupos de animales, el control de colonización y el de inhibición, son muy semejantes y en algunos puntos se traslapan.

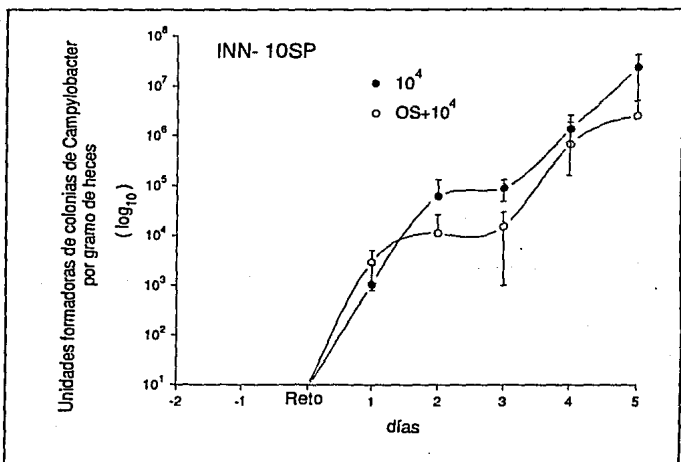


Figura 10. Ensayos de inhibición de la colonización de ratones Balb/c, con la cepa adherente (INN-10SP), por oligosacáridos neutros (Tabla 1, subgrupos de prueba ○ y colonización ●).

Por otra parte, se definieron dos tipos de comportamiento dependientes del inóculo en los ensayos de inhibición con la cepa invasiva. En la Figura 11 puede notarse que, con un reto de 10^8 UFC/ml, la inhibición por los oligosacáridos se manifestó como una disminución importante en el número de UFC/g de heces. En cambio, con un reto de 10^4 UFC/ml, con la misma concentración de oligosacáridos, sólo se logró un retraso de 48h en la aparición de *Campylobacter* en las heces, aunque las UFC/g de heces fueron menores.

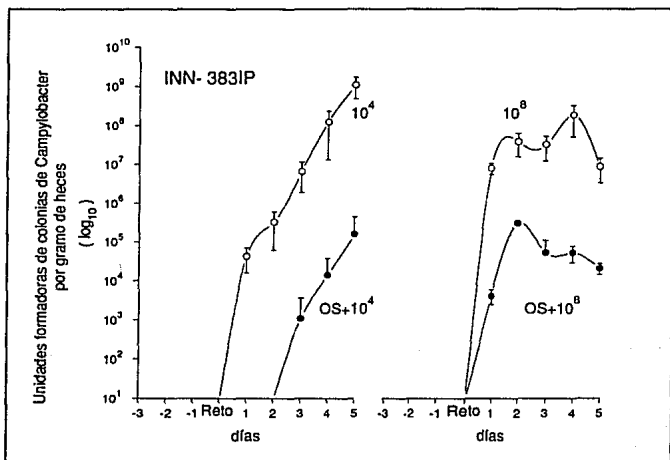


Figura 11. Inhibición de la colonización de ratones Balb/c por la cepa invasiva (INN-383IP), en inóculos de 10^4 y 10^8 bacterias/ml, con oligosacáridos neutros.

(Tabla 1, subgrupos de prueba \bullet y colonización \circ)

IX. DISCUSION

Las infecciones gastrointestinales en nuestro país, y en general en los países menos desarrollados, son causa importante de morbilidad en la población menor de 5 años (10,50); siendo *Campylobacter jejuni* uno de los principales agentes etiológicos de diarrea aguda (14,16,21,45,46).

Se ha propuesto que la adherencia es el primer paso en la infección y subsecuente colonización del intestino; *in vitro* se ha demostrado la adherencia de *C. jejuni* a diversas líneas celulares (31,37,65), mediante la interacción de posibles adhesinas con sus receptores correspondientes (32,76). Estudios realizados en el laboratorio de Infectología del INNSZ nos han permitido diferenciar cepas patógenas de no patógenas, además de clasificar las causantes de diarrea como invasivas ó adherentes (22,71).

Uno de los propósitos de determinar la habilidad de diferentes cepas para asociarse a cultivos celulares, y de estudiar los mecanismos mediante los cuales lo realizan, es el desarrollo de medidas de prevención para abolir tal interacción *in vitro* y posteriormente poder aplicarlas *in vivo*. En este sentido se ha demostrado que la leche humana cumple con esta función, ya que diversos estudios de la epidemiología de la diarrea han puesto de manifiesto que los niños que son alimentados al seno materno presentan una incidencia de diarrea mucho menor que los niños que no lo son (10,39,50,55,68). Tal protección se debe en parte a su alto contenido de IgA secretora contra diferentes enteropatógenos, entre los que se cuenta *C. jejuni* (87), pero también a la fracción oligosacárida que constituye uno de sus principales componentes (77).

Existen evidencias importantes de que los oligosacáridos presentes en la leche materna son capaces de inhibir la adherencia *in vitro* de varias bacterias (2,4,5,53,54) ó de algunos de sus productos, como por ejemplo enterotoxinas (24,63,82).

Se ha propuesto que los enteropatógenos reconocen la porción oligosacárida de los glicoconjugados de membrana como molécula blanco en su interacción con el receptor, por lo que la presencia de oligosacáridos en la leche estructuralmente semejantes, daría lugar a una inhibición competitiva que explicaría las funciones protectoras de la leche materna.

En este estudio demostramos la presencia, en leche materna, de inhibidores de la asociación de las cepas invasivas de *C. jejuni* a las células HEp-2. Para ello en la primera fase de nuestro trabajo, utilizamos dos cepas bien caracterizadas como adherente e invasiva respectivamente. Hay que hacer notar que en ninguno de los ensayos con la cepa invasiva se logró el 100% de inhibición (Figuras 4-6,11), lo que nos hace pensar que posiblemente la asociación de las cepas a las células es un proceso complejo, que puede estar mediado por varios componentes de la superficie bacteriana, entre los que se cuentan protefnas de membrana externa (32), el flagelo y el lipopolisacárido (76). Por otra parte, la no inhibición de las cepas adherentes nos hace suponer que existen diferencias importantes entre los dos tipos de cepas, posiblemente antígenos asociados específicamente con invasividad (64,95).

Se presume que tales inhibidores son oligosacáridos fucosilados, los cuales probablemente actúan compitiendo con los receptores presentes en las células epiteliales para las cepas invasivas, pero no para las adherentes; los mecanismos de interacción y los receptores de membrana pueden ser diferentes para los dos tipos de cepas. Estos hallazgos apoyan también la existencia de cepas con diferentes mecanismos patogénicos, aunque se requiere hacer más estudios con otros aislados invasivos, adherentes y de infecciones asintomáticas, para validar esta conclusión.

En estudios previos se ha relacionado a la fucosa con la inhibición no sólo de la adherencia de *Campylobacter* a las células INT 407 (23), sino también con la inhibición de la adherencia de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* a eritrocitos humanos (57).

Cinco y cols. (23) especulan que las bacterias de los géneros *Vibrio* y *Campylobacter*, por tener características en común, exhiben la misma especificidad en sus adhesinas en los modelos celulares que se han utilizado para medir su habilidad de asociación. Sin embargo, estudios más

recientes han demostrado que también son residuos fucosilados los responsables de la inhibición de la actividad de la enterotoxina termoestable de *E. coli* en ratones lactantes (82).

Por su parte, Cravioto y cols. (30) han reportado que la adherencia localizada de cepas de EPEC a células HEP-2 es mediada por un mecanismo que involucra el reconocimiento preferencial de tetra- y pentasacáridos fucosilados, como los que se presentan en leche materna, siendo el mejor inhibidor de la adherencia localizada una mezcla de pentasacáridos que contenía sólo especies fucosiladas.

La siguiente fase del proyecto comprendió estudios *in vivo*, que consideramos necesarios para confirmar la actividad inhibitoria de los oligosacáridos contra la infección por *Campylobacter*.

La recuperación de un gran número de microorganismos de las heces diarreicas indica que *C. jejuni* es altamente eficiente para colonizar y multiplicarse en el tracto intestinal humano (41,83,103). Se ha reportado que el principal sitio de colonización es el ileon distal, aún cuando el colon también puede estar involucrado (69). Sin embargo, el mecanismo exacto por el que *C. jejuni* es capaz de producir diarrea no ha sido dilucidado; el establecimiento de un modelo animal adecuado de la enteritis por *Campylobacter* se ha considerado esencial para la comprensión de la patogénesis del padecimiento.

Con nuestro modelo experimental, demostramos que es posible infectar oralmente ratones Balb/c logrando una rápida y persistente colonización con las dos cepas de *C. jejuni* procedentes de casos de diarrea (INN-383IP e INN-10SP). Diferentes investigadores han intentado colonizar ratones con *C. jejuni* (13,38,40,41,69,84,109).

Jesudason y cols. (56) y Field y cols. (40,41) han mostrado que el tracto gastrointestinal de los ratones adultos se coloniza irregularmente, a menos de que el animal sea pretratado con antibióticos para eliminar la flora normal. Blaser y asociados (13) por su parte, logran la colonización sin requerir del tratamiento antimicrobiano pero con dosis infectivas altas. En

nuestro modelo, logramos la colonización con dosis mucho menores que las utilizadas por Blaser, siendo la diferencia entre ambas de cuatro logaritmos, y sin el tratamiento antimicrobiano, al trabajar con ratones de 10 a 15 días de nacidos.

Aún cuando en ningún caso se provocó un cuadro clínico en los ratones y sólo medimos la colonización por la excreción de *Campylobacter* en heces (UFC/g), existió una clara diferencia en el comportamiento de la cepa no patógena (INN-57SP) cuya excreción con respecto a las patógenas fué menor siendo la diferencia estadísticamente significativa (Figura 9). Esto nos hace pensar que este modelo puede ser útil para evaluar los efectos causados por medidas profilácticas.

En cuanto a la inhibición de la colonización por los OS-N, se observó que ésta es dependiente del inóculo, es decir, con un reto de 10^8 UFC/ml se manifestó como una disminución importante de las UFC/gr de heces. En cambio, con un reto menor de 10^4 UFC/ml, se logró un retraso en la aparición de *Campylobacter* en las heces. En ambos casos, la diferencia existente con el ensayo control es significativa, con lo que confirmamos la presencia de los inhibidores para la cepa invasiva.

Quedan por realizar ensayos similares con un mayor número de cepas invasivas, adherentes y las no adherentes/no invasivas, para confirmar la especificidad de la inhibición hacia las cepas invasivas, o bien, establecer si existen diferentes grados de inhibición para cada grupo de cepas de *C. jejuni* que pudieran ser importantes, tanto *in vitro* como *in vivo*.

La purificación llevada a cabo nos permitió obtener cantidades suficientes de cada una de las fracciones oligosacáridas para los ensayos posteriores de verificación de los métodos y para los estudios *in vivo*, ya que es necesario definir la estructura de los residuos fucosilados responsables de la actividad inhibitoria. De acuerdo al estudio de Cravioto y cols. (30), el tamaño de la cadena oligosacárida es muy importante; además no todos los compuestos fucosilados tienen tal propiedad ya que dependen de su afinidad por el microorganismo. Esto se demuestra en el trabajo de Brassart y cols. (18), en el que los oligosacáridos de 3 a 7 residuos con secuencias

Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β son inhibitorios de la adherencia de *C. albicans* a células epiteliales bucales, pero no lo son aquellos que presentan las secuencias Fuc α 1 \rightarrow 3/4GlcNAc β .

Dado que el número de oligosacáridos fucosilados en la leche materna varía de acuerdo a los grupos sanguíneos (102), será importante su cuantificación y caracterización para definir si existe variación en la actividad protectora de la leche de diferentes madres contra *C. jejuni*.

X. CONCLUSIONES

En este estudio se demostró la presencia de una actividad inhibitoria para *Campylobacter* en la leche materna.

La actividad inhibitoria pudiera deberse a la presencia de receptores análogos para *Campylobacter*, pudiendo ser oligosacáridos fucosilados que probablemente actúan compitiendo con los receptores presentes en las células epiteliales para las cepas invasivas de *Campylobacter*, pero no para las adherentes, sugiriendo que los mecanismos de interacción y los receptores de membrana pueden ser diferentes para las cepas adherentes e invasivas.

Estos hallazgos apoyan la existencia de cepas con diferentes mecanismos patogénicos.

Se estableció un modelo experimental de colonización que puede ser útil para evaluar los efectos causados por medidas profilácticas.

Se demostró que la actividad inhibitoria para *C.jejuni* presente en leche materna es similar *in vitro* e *in vivo*.

Se requiere hacer ensayos inhibitorios *in vivo* con una gama variada de cepas de *Campylobacter*, incluyendo cepas invasivas, adherentes y de casos asintomáticos.

Se requiere, además, realizar una caracterización bioquímica detallada de la actividad inhibitoria.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Agüero-Rosenfeld ME, Yang XH, Nachamkin I. Infection of adult syrian hamsters with flagellar variants of *Campylobacter jejuni*. Infect Immun 1990; 58(7):2214-2219.
2. Alphen L, Geelen-van den Broek L, Blaas L, van Ham M, Dankert J. Blocking of fimbria-mediated adherence of *Haemophilus influenzae* by sialyl gangliosides. Infect Immun 1991; 59(12):4473-4477.
3. Amano J, Straehl P, Berger EJ, Kochibe N, Kobata A. Structures of mucin-type sugar chains of the galactosyltransferase purified from human milk. Occurrence of the ABO and Lewis blood group determinants. J Biol Chem 1991; 266(18):11461-11477.
4. Andersson B, Porras O, Hanson LA, Lagergard T, Svanborg-Eden C. Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. J Infect Dis 1986; 153(2):232-237.
5. Andersson B, Porras O, Hanson La, Svanborg-Eden C, Leffler H. Nonantibody containing fractions of breast milk inhibit epithelial attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. Lancet 1985; 1:643.
6. Aronson M, Medalia O, Schori L, Mirelman D, Sharon N, Ofek I. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl- α -D-mannopyranoside. J Infect Dis 1979; 139(3):329-332.
7. Attridge S, Rowley D. The role of the flagellum in the adherence of *Vibrio cholerae*. J Infect Dis 1983; 147(5):864-872.

8. Bar-Shavit Z, Ofek I, Goldman R, Mirelman D, Sharon N. Mannose residues on phagocytes as receptors for the attachment of *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Biochem Biophys Res Comm* 1977; 78(1):455-460.
9. Bartus H, Actor P, Snipes E, Sedlock D, Zajac I. Indications that the erythrocyte receptor involved in enterotoxigenic *Escherichia coli* attachment is a sialoglycoconjugate. *J Clin Microbiol* 1985; 21(6):951-954.
10. Black RE, Lopez G, Brown KH, Bravo N, Grados O, Creed H. Incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in Huascar, Peru. *Am J Epidemiol* 1989; 129(4):785-799.
11. Beachey E. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 1981; 143(2):325-345.
12. Beachey E. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 1981; 143(2):472-479.
13. Blaser MJ, Duncan DJ, Warren GH, Wang WL. Experimental *Campylobacter jejuni* infection of adult mice. *Infect Immun* 1983; 39(2):908-916.
14. Blaser MJ, Glass RI, Imdadul HM, Stoll B, Kibriya GM, Alim RMA. Isolation of *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from bangladeshi children. *J Clin Microbiol* 1980; 12(6):744-747.
15. Blaser MJ, Reller L. *Campylobacter* enteritis. *N Engl J Med* 1981;305:1444-1452.
16. Blaser MJ, Taylor DN, Feldman RA. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *Epidem Rev* 1983; 5:157-176.

17. Boedeker E. Enterocyte adherence of *Escherichia coli*: its relation to diarrheal disease. *Gastroenterol* 1982; 83(2):489-492.
18. Brassart D, Woltz A, Golliard M, Nesser JR. *In vitro* inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc α 1 \rightarrow 2Gal β -bearing complex carbohydrates. *Infect Immun* 1991; 59(5):1605-1613.
19. Butzler JP, Goossens H. *Campylobacter jejuni* infection as a hospital problem: an overview. *J Hosp Infect* 1988; 11(Suppl.A):374-377.
20. Caldwell MB, Walker RI, Stewart SD, Rogers JE. Simple adult rabbit model for *Campylobacter jejuni* enteritis. *Infect Immun* 1983; 42(3):1176-1182.
21. Calva JJ, Rufz-Palacios GM, López-Vidal AB, Ramos A, Bojalil R. Cohort study of intestinal infection with campylobacter in mexican children. *Lancet* 1988; March:503-506.
22. Cervantes LE, Calva JJ, Rufz-Palacios GM. Assessment of virulence factors for the definition of pathogenic strains in *Campylobacter* diarrhea. In: Rufz-Palacios G, Calva E, Rufz-Palacios B, eds, *Campylobacter* V. Proceedings of the Fifth International Workshop on *Campylobacter* Infections. Instituto Nacional de la Nutrición. International Congress Series ISBN 968-6685-00-6, 1991, pp 196-198.
23. Cinco M, Banfi E, Ruaro E, Crevatin D, Crotti D. Evidence for L-fucosa (6-deoxy-L-galactopyranose)- mediated adherence of *Campylobacter spp.* to epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 1984; 21:347-351.
24. Cleary TG, Chambers JP, Pickering LK. Human milk protects suckling mice from heat-stable enterotoxin of *E. coli*. *J Infect Dis* 1983; 148(6):1114-1119.

25. Cohen M, Guarino A, Shukla R, Giannella R. Age-related differences in receptors for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in the small and large intestine of children. *Gastroenterol* 1988; 94:367-373.
26. Cohen P, Arruda J, Williams T, Laux D. Adhesion of a human fecal *Escherichia coli* strain to mouse colonic mucus. *Infect Immun* 1985; 48(1):139-145.
27. Contrepolis M, Girardeau J. Additive protective effects of colostral antipili antibodies in calves experimentally infected with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1985; 50(3):947-949.
28. Cotton T. *Statistics in medicine*. Boston: Little, Brown, 1974.
29. Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1979; 3:95-99.
30. Cravioto A, Tello A, Villafan H, Ruiz J, del Vedovo S, Nesser JR. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis* 1991; 163(6):1247-1255.
31. De Melo MA, Gabbiani G, Pechere JC. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEP-2 cells. *Infect Immun* 1989; 57(7):2214-2222.
32. De Melo M, Pechere JC. Identification of *Campylobacter jejuni* surface proteins that bind to eucaryotic cells *in vitro*. *Infect Immun* 1990; 58(6):1749-1756.

33. Drumm B, Robertson Am, Sherman PM. Inhibition of attachment of *Escherichia coli* RDEC-1 to intestinal microvillus membranes by rabbit ileal mucus an mucin *in vitro*. *Infect Immun* 1988; 56(9):2437-2442.
34. Ebner KE, Schanbacher FL. Biochemistry of lactose and related carbohydrates. In: *Lactation a comprehensive treatise*. Larson BL and Smith VR, eds. pp. 77-113, Academic Press, New York, 1974.
35. Eden C, Thurin J. Specificity of binding of a strain of uropathogenic *Escherichia coli* to Gal α 1 \rightarrow 4Gal- containing glycosphingolipids. *J Biol Chem* 1985; 260:8545-8551.
36. Egge H, Dell A, Von Nicolai H. Fucose containing oligosaccharides from human milk. *Arch Biochem Biophys* 1983; 224:235-253.
37. Fauchere JL, Rosenau A, Veron M, Moyen EN, Richards S, Pfister A. Association with HeLa cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human feces. *Infec Immun* 1986; 54(2):283-287.
38. Fauchere JL, Veron M, Lellouch-Tubiana A, Pfister A. Experimental infection of gnotobiotic mice with *Campylobacter jejuni*: colonization of intestine and spread to lymphoid and reticulo-endothelial organs. *J Med Microbiol* 1985; 20:215-224.
39. Feachem RG, Koblinsky MA. Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: promotion of breast-feeding. *Bull WHO* 1984; 62:271-291.
40. Field LH, Underwood JL, Pope LM, Berry LJ. Intestinal colonization of neonatal animals by *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Infect Immun* 1981; 33(3):884-892.

41. Field LH, Underwood JL, Pope LM, Berry LJ. The role of gut flora and animal passage in the colonization of adult mice with *Campylobacter jejuni*. J Med Microbiol 1984; 17:59-66.
42. Firehammer BD, Meyers LL. *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni*: its possible significance in enteric disease of calves and lambs. Am J Vet Res 1981; 42:918-922.
43. Forstner J. Intestinal mucins in health and disease. Digestion 1978; 17:234-263.
44. Gaastra W, Graaf F. Host-specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol Rev 1983; 46:129-161.
45. Georges-Courbout MC, Beraud-Cassel AM, Gouandjika I, Georges AJ. Prospective study of enteric campylobacter infections in children from birth to 6 months in The Central African Republic. J Clin Microbiol 1987; 25(5):836-839.
46. Glass RI, Stoll BJ, Huq MI, Struelens MJ, Blaser M, Kibriya AK. Epidemiologic and clinical features of endemic *Campylobacter jejuni* infection in Bangladesh. J Infect Dis 1983; 148(2):292-296.
47. Goldman AS, Goldblum RM, Hanson LA. Anti-inflammatory systems in human milk. The University of Texas Medical Branch Galveston, Texas, 1989.
48. Goldman AS, Thorpe LW, Goldblum RM, Hanson LA. Anti-inflammatory properties of human milk. Acta Pediatr Scand 1986; 75:689-695.
49. Goossens H, Viaes L, De Boeck M, Pot B, Kesters K, Levy J. Is *Campylobacter upsaliensis* an unrecognised cause of human diarrhea?. Lancet 1990; 1:584-586.

50. Guerrant RL, Kirchoff LV, Shields DS, Nations MK, Leslie J, deSousa MA, Araujo JG, Correia LL, Saver KT, McClelland KE, Trowbridge FL, Hughes JM. Prospective study of diarrheal illness in Northeastern Brazil: Patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. *J Infect Dis* 1983; 148(6):986-997.
51. Guerrant RL, Wanke CA, Pennie RA, Barret LJ, Lima A, O'brien A. Production of a unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1987; 55(10):2526-2530.
52. Holmgren J, Fredman P, Lindblad M, Svennerholm AM, Svennerholm L. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. *Infect Immun* 1982; 38(2):424-433.
53. Holmgren J, Svennerholm AM, Ahren C. Nonimmunoglobulin fraction of human milk inhibits bacterial adhesion (hemagglutination) and enterotoxin binding of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* 1981; 33(1):136-141.
54. Holmgren J, Svennerholm AM, Lindblad M. Receptor-like glycoconjugates in human milk that inhibit classical and El Tor *Vibrio cholerae* cell adherence. (Hemagglutination). *Infect Immun* 1983; (1):147-154.
55. Jason JM, Nieburg P, Marks JS. Mortality and infectious disease associated with infant-feeding practices in developing countries. *Pediatrics* 1984; 74(suppl):702-727.
56. Jesudason MV, Hentges DJ, Pongpech P. Colonization of mice by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 1989; 57(8):2279-2282.
57. Jones GW, Freter R. Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: nature of the interaction with isolated rabbit brush border membranes and human erythrocytes. *Infect Immun* 1976; 14:240-245.

58. Kabara JJ. Lipids as hostresistance factors of human milk. *Nutrit Rev* 1980; 38(2):65-72.
59. Keusch G. Specific membrane receptors: pathogenic and therapeutic implications in infectious disease. *Infect Dis Rev* 1979; 1:517-529.
60. Knutton S, Lloyd D, Candy D, McNeish A. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to human small intestinal enterocytes. *Infect Immun* 1985; 48(3):824-831.
61. Kobata A. Milk glycoproteins and oligosaccharides. In: "The glycoconjugates". Horowitz MS and Pigman W, eds. Vol.1, pp.423-440, Academic Press, New York, 1978.
62. Kobata A. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur J Biochem* 1992; 209:483-501.
63. Kolsto A, Laegrid A, Ertresvag K. Inhibition of enterotoxin from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* by gangliosides from human milk. *Infect Immun* 1983; 40(2):563-569.
64. Konkel ME, Babakhani F, Joens LA. Invasion-related antigens of *Campylobacter jejuni*. *J Infect Dis* 1990; 162(4):888-895.
65. Konkel M, Joens LA. Adhesion to and invasion of HEP-2 cells by *Campylobacter spp.* *Infect Immun* 1989; 57(10):2984-2990.
66. Kornfeld R, Kornfeld S. Comparative aspects of glycoprotein structure. *A Rev Biochem* 1976; 45:217-238.
67. Koshiyama I. Isolation of a glycopeptide from a 7S protein in soybean globulins. *Arch Biochem Biophys* 1969; 130:370-373.

68. Kovar MG, Serdula MK, Marks JS, Fraser DW. Review of the epidemiologic evidence for an association between infant feeding and infant health. *Pediatrics* 1984; 74(suppl):615-638.
69. Lee A, O'Rourke J, Barrington P, Trust T. Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infect Immun* 1986; 51(2):536-546.
70. Leffler H, Svanborg-Eden C. Chemical identification of a glycosphingolipid receptor for *Escherichia coli* attaching to human urinary tract epithelial cells and agglutinating human erythrocytes. *FEMS Microbiol Lett* 1980; 8:127-134.
71. Lindblom GB, Cervantes LE, Sjogren E, Kaijser B, Ruiz-Palacios GM. Adherence, enterotoxigenicity, invasiveness and serogroups in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from adult humans with acute enterocolitis. *APMIS* 1990; 98:179-184.
72. Lis H, Sharon N. Lectins as molecules and as tools. *Ann Rev Biochem* 1986; 55:35-67.
73. Magnani JL. Immunostaining free oligosaccharides directly on thin-layer chromatograms. *Anal Biochem* 1985; 150:13-17.
74. Mantle M, Basaraba L, Peacock SC, Gall DG. Binding of *Yersinia enterocolitica* to rabbit intestinal brush border membranes, mucus, and mucin. *Infect Immun* 1989; 57(11):3292-3299.
75. May JT. Microbial contaminants and antimicrobial properties of human milk. *Microbiological Sciences* 1982; 5(2):42-46.

76. Mc Sweegan E, Walker RI. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infect Immun* 1986; 53(1): 141-148.
77. Montreuil J, Mullet S. Etude des variations des constituents glucidiques du lait de femme au cours de la lactation. *Bull Soc Chim Biol* 1960; 42:365-377.
78. Mouricout M, Julien R. Pilus-mediated binding of bovine enterotoxigenic *Escherichia coli* to calf small intestinal mucins. *Infect Immun* 1987; 55(5):1216-1223.
79. Mouricout M, Petit J, Carias J, Julien R. Glycoprotein glycans that inhibit adhesion of *Escherichia coli* mediated by K99 fimbriae: treatment of experimental colibacillosis. *Infect Immun* 1990; 58(1):98-106.
80. Neeser J, Koellreutter B, Wuersch P. Oligomannoside-type glycopeptides inhibiting adhesion of *Escherichia coli* strains mediated by type 1 pili: preparation of potent inhibitors from plant glycoproteins. *Infect Immun* 1986; 52(2):428-436.
81. Newburg DS, Daniel PF, O'Neil NE, McCluer RH. High performance liquid chromatography of oligosaccharides from human milk and colostrum. In: *Human Lactation 2*. Hamosh M and Goldman AS, eds. pp 581-588, Plenum Publishing Corporation, 1986.
82. Newburg DS, Pickering LK, McCluer RH, Cleary TG. Fucosylated oligosaccharides of human milk protect suckling mice from heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1990; 162(5):1075-1080.
83. Newell DG. Experimental studies of *campylobacter* enteritis. In: Butzler JP, ed. *Campylobacter* infection in man and animals. Boca Raton: CRC Press Inc, 1984:114-131.

84. Newell DG, Pearson A. The invasion of epithelial cell lines and the intestinal epithelium of infant mice by *Campylobacter jejuni/coli*. J Diar Dis Res 1984; 1:19-26.
85. Pavlovskis OR, Rollins DM, Haberberg RL, Green AE, Habash L, Strocko S, Walker RI. Significance of flagella in colonization resistance of rabbits immunized with *Campylobacter spp.* Infect Immun 1991; 59(7):2259-2264.
86. Polonouski M, Lespagnol A. Nouvelles acquisitions sur les composés glucidiques du lait de femme. Bull Soc Chim Biol 1933; 15:320-328.
87. Ruiz-Palacios G, Calva JJ, Pickering LK, Lopez-Vidal Y, Volkow P, Pezzarosi H, West MS. Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. J Pediatr 1990; 116:707-713.
88. Ruiz-Palacios GM, Escamilla E, Torres N. Experimental *Campylobacter* diarrhea in chickens. Infect Immun 1981; 34(1):250-255.
89. Ruiz-Palacios GM, Torres J, Torres NI, Escamilla E. Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Characterization and clinical significance. Lancet 1983; ii:250-253.
90. Russell RG, Sarmiento JJ, Fox J, Panigrahi P. Evidence of reinfection with multiple strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in *Macaca nemestrina* housed under hyperendemic conditions. Infect Immun 1990; 58(7):2149-2155.
91. Ryley LW, Finch MJ. Results of the first year of national surveillance of *Campylobacter* infections in the United States. J Infect Dis 1985; 151(5):956-962.

92. Sanford BA, Thomas VL, Ramsay MA. Binding of staphylococci to mucus *in vivo* and *in vitro*. *Infect Immun* 1989; 57(12):3735-3742.
93. Schrotten H, Hanisch FG, Plogmann R, Hacker J, Uhlenbruck G, Nobis-Bosch R, Wahn V. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. *Infect Immun* 1992; 60(7):2893-2899.
94. Sharon N, Lis H, Carbohydrates in cell recognition. *Scientific Amer* 1993; Jan:74-81.
95. Soto LE, Cervantes LE, Lopez-Vidal Y, Ruiz-Palacios GM. Role of outer membrane proteins and lipopolysaccharides (LPS) on adherence and invasion by *Campylobacter jejuni*. In: Ruiz-Palacios G, Calva E, Ruiz-Palacios B, eds, *Campylobacter V*. Proceedings of the Fifth International Workshop on *Campylobacter* Infections. Instituto Nacional de la Nutrición. International Congress Series ISBN 968-6685-00-6, 1991, pp 192-195.
96. Spiro R. Glycoproteins. Their biochemistry, biology and role in human disease. *New Engl J Med* 1969; 381:991-1000, 1043-1056.
97. Spiro R. Glycoproteins. *A Rev Biochem* 1970; 39:559-638.
98. Strecker G, Fièvre S, Wieruszkeski JM, Michalski JC, Montreuil J. Primary structure of four human milk octa-, nona-, and undeca- saccharides established by ¹H- and ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydr Res* 1992; 226:1-14.
99. Svanborg-Eden C, Freter R, Hagberg L, Hull R, Hull S, Leffler H, Schoolnik G. Inhibition of experimental ascending urinary tract infection by an epithelial cell-surface receptor analogue. *Nature* 1982; 298(5):560-562.

100. Svennerholm L, Fredman P. A procedure for the quantitation and isolation of brain gangliosides. *Biochem Biophys Acta* 1980; 617:97-109.
101. Taylor NS, Ackerman J, Fox JG. Adherence to tissue cultured cells of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from symptomatic and asymptomatic human and animal sources. In: Pearson AD, Skirrow MB, Rowe B, Davies JR and Jones DM, eds. *Campylobacter* III. London: Public Health Laboratory Service, 1983.
102. Viverge D, Grimmonprez L, Cassanas G, Bardet L, Bonnet H, Solere M. Variations of lactose and oligosaccharides in milk from women of blood types secretor A or H, secretor Lewis, and secretor H/non secretor Lewis during the course of lactation. *Ann Nutr Metab* 1985; 29:1-11.
103. Walker RI, Caldwell MB, Ruiz-Palacios GM. Pathophysiology of *Campylobacter* infections. *Microb Rev* 1986; 50:81-94.
104. Warner L, Kim YS. Intestinal receptors for microbial attachment. In: Farthing MJG, Keusch GT, eds. *Enteric infection mechanism, manifestations and management*. London: Chapman and Hall Medical, 1989; 31-49.
105. Wells M, Dittmer J. The use of sephadex for the removal of nonlipid contaminants from lipid extracts. *Biochemistry* 1963; 2:1259-1263.
106. Whistler RL, BeMiller JN. Carbon column chromatography. In: "Methods in carbohydrate chemistry". Whistler RL and BeMiller eds., Vol 1, pp 42-44. Academic Press, New York, 1962.

107. Wieruszkeski JM, Chekkor A, Bouquelet S, Montreuil J, Strecker G. Structure of two new oligosaccharides isolated from human milk: sialylated lacto-*N*-fucopentaoses I and II. *Carbohydr Res* 1985; 137:127-138.
108. Yamashita K, Tachibana Y, Kobata A. Oligosaccharides of human milk. *Arch Biochem Biophys* 1976; 174:582-591.
109. Yrios JW, Balish E. Pathogenesis of *Campylobacter spp.* in athymic and euthymic germfree mice. *Infect Immun* 1986; 53(2):384-392.