



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

" ESTANDARIZACION DE UNA TECNICA DE  
INMUNOFLUORESCENCIA PARA ESTUDIOS DE  
ADHERENCIA DE *Campylobacter jejuni* A CELULAS  
EPITELIALES "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA DEL PILAR RAMOS CERVANTES

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE** Prof. ELDA B. PENICHE QUINTANA.

**VOCAL** Prof. FERNANDO GARCIA TAMAYO.

**SECRETARIO** Prof. GUILLERMO RUIZ-PALACIOS.

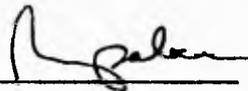
**1er. SUPLENTE** Prof. CONSTANTINO III ROBERTO LOPEZ MACIAS.

**2do. SUPLENTE** Prof. LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ.

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Area de Investigación del Departamento de Infectología  
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán".

Asesor del tema: Dr. GUILLERMO RUIZ-PALACIOS



Sustentante: MARIA DEL PILAR RAMOS CERVANTES



**Agradezco al Dr. Guillermo Ruiz-Palacios, Jefe del Departamento de Infectología, el haberme permitido desarrollar este trabajo en su laboratorio.**

A Dios, por ser mi fuerza y mi luz.  
Gracias Dios mío por permitirme alcanzar este sueño.

A mi tío José y abuelito Tino,  
esos dos seres que sé, desde allá, junto a Dios,  
están conmigo y cuyo recuerdo es un impulso para seguir adelante.

A mis padres, Teresa y Blas, por haberme dado la vida,  
y ser mi mejor ejemplo y mi guía.  
Con todo mi amor.

A mis hermanos Teresa, Jesús, Beatriz y Francisco,  
mis mejores amigos y compañeros de toda la vida.  
Con todo mi cariño.

A mi tía Luz,  
por dedicarme con amor y paciencia, gran parte de su vida.  
Te quiero mucho.

A mi abuelita Pilar,  
por estar conmigo en los buenos y malos momentos  
y hacerme la vida divertida. Te quiero abue.

A Luce,  
por sus consejos y su apoyo de toda la vida.

A mis tíos y primos,  
porque son una parte muy importante en mi vida.

**A mis queridísimos amigos Euclides, Lupita, Liz y Luis,  
Martha, Susi, Agustín, Vero R., Claus, Vero A., Omar, Mónica,  
Dea, Gustavo, Ricardo y Karl, por todas esas locuras que compartimos.**

**A Ana, Julia, Lupita y Rosi,  
por haberme brindado su amistad.**

**A todos los miembros del Departamento de Infectología,  
Muchísimas gracias.**

**Este trabajo fué realizado en el área de Investigación del Departamento de Infectología del  
Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", bajo la dirección del  
Dr. Guillermo Ruiz-Palacios.**

## CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION .....	2
II. ANTECEDENTES .....	4
III. JUSTIFICACION .....	24
IV. OBJETIVOS .....	25
V. PARTE EXPERIMENTAL .....	26
VI. RESULTADOS .....	34
VII. DISCUSION .....	45
VIII. CONCLUSIONES .....	50
IX. APENDICE .....	51
X. BIBLIOGRAFIA .....	55

## I. INTRODUCCION

*Campylobacter jejuni* es una bacteria perteneciente al género *Campylobacter*, siendo además, uno de los agentes etiológicos mas comunmente aislados de casos de diarrea en niños menores de cinco años, en nuestro país, por lo que el determinar la epidemiología, fisiología y patofisiología del microorganismo, reviste gran importancia.

Hasta la fecha, los mecanismos de patogenicidad de este microorganismo no han sido completamente demostrados, aunque se ha propuesto, como en el caso de otro tipo de infecciones bacterianas, que la adherencia de la bacteria a la mucosa intestinal sea el primer paso para que se lleve a cabo la infección.

Los sistemas de cultivos *in vitro* son usados con frecuencia para investigar la interacción entre los microorganismos patógenos y las células del hospedero, y que han permitido dividir el proceso de infección en dos fases: adherencia e invasión. Existen diversos estudios que establecen la capacidad de *Campylobacter jejuni* para adherirse a diferentes líneas celulares, entre las que se cuentan células HeLa, INT 407 y HEp-2.

En estos estudios se han empleado elementos radioactivos como (<sup>3</sup>H)alanina, (<sup>3</sup>H)leucina, o (<sup>3</sup>H)acetato para evaluar el número de bacterias adheridas a las células; y aún cuando tales métodos son sensibles y específicos, implican por un lado, riesgos para la salud por el tipo de reactivos empleados, y por otro, un gran costo por el uso de equipo sofisticado, lo que limita el ensayo a laboratorios de alto nivel que cuenten con el equipo adecuado.

Existen otro tipo de técnicas para revelar esta asociación como son las técnicas de tinción diferencial para evaluar, microscópicamente, la asociación de *Campylobacter* a células epiteliales; sin embargo, estos son menos sensibles que los métodos de centelleo. Por ello, en este trabajo se propone el desarrollo de una técnica mas sensible que las técnicas de tinción

diferencial, que permita determinar la asociación de *Campylobacter jejuni* a células epiteliales, sin involucrar elementos radioactivos, y una técnica que posee estas características es la inmunofluorescencia, ya que por el uso de un anticuerpo conjugado con un compuesto fluorescente, se tiene una reacción específica, sensible y además de fácil visualización al microscopio.

## II. ANTECEDENTES

### ANTECEDENTES HISTORICOS

En 1909, se aisló por primera vez un microorganismo semejante a *Vibrio* que se relacionaba con abortos en bovinos; sin embargo, no es sino hasta 1947 cuando *Campylobacter* se considera patógeno para el humano, al describirse un caso de bacteremia en una mujer embarazada, causada por *Campylobacter fetus*. (55)

A partir de entonces, *C. fetus* se aisló ocasionalmente de muestras de sangre, fluido cerebroespinal y abscesos principalmente, de pacientes que referían enfermedades de base como alcoholismo, diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular y otras en las que el paciente se encontraba inmunocomprometido, lo que dio pie a que se le considerara como un patógeno oportunista. (55,56)

En 1957 King describió que ciertos microorganismos, relacionados con el género *Vibrio*, podrían estar asociados con la diarrea en humanos y podían dividirse en 2 grupos de acuerdo a sus características termofílicas, bioquímicas y serológicas. Así, los microorganismos aislados de muestras de sangre de los pacientes con diarrea, presentaban una temperatura óptima de crecimiento de 42°C. (63)

Inicialmente el género *Campylobacter* se clasificó dentro de la familia *Vibrionaceae*, debido a su similitud morfológica con *Vibrio cholerae*. (55)

En 1963, Sebald y Veron propusieron el término *Campylobacter* (del griego *kampylos*, curvo y *bacter*, bacilo) como nombre genérico para estas bacterias, al reconocerse que no pertenecían a la familia *Vibrionaceae* ya que no fermentaban azúcares como las especies de *Vibrio* y el contenido de DNA era diferente, ubicándolos dentro de la familia *Spirillaceae*. (47,55). Es hasta 1972, cuando Butzler y col. (50) reportaron por primera vez el aislamiento de *Campylobacter* a

partir de heces, reconociéndolo como una causa importante de diarrea en niños (56); y en 1973, Veron y Chatelain describen un sistema de clasificación taxonómica completa, en la que se reconocen 4 especies dentro del género. (47)

Posteriormente, en 1977, Skirrow desarrolló una técnica de aislamiento, con un medio de cultivo selectivo, incubación a 43°C, y con una tensión de O<sub>2</sub> reducida, lo que permitió el aislamiento rutinario de la bacteria a partir de heces de una forma simple. (63)

### TAXONOMIA

Actualmente el género *Campylobacter* se clasifica dentro de la familia *Spirillaceae* y comprende 16 especies: (20,55)

- C. jejuni* subsp. *jejuni*
- C. jejuni* subsp. *doyle*
- C. coli*
- C. lari*
- C. upsaliensis*
- C. fetus* subsp. *fetus*
- C. fetus* subsp. *veneralis*
- C. hyointestinalis*
- C. concisus*
- C. mucosalis*
- C. sputorum* bv. *sputorum*
- C. sputorum* bv. *bulbus*
- C. sputorum* bv. *faecalis*
- C. curvus*
- C. rectus*
- C. showae*

de las cuales, sólo 5 se han identificado como patógenas para el humano (55):

-*C. fetus subsp. fetus*. Esta especie se ha venido reconociendo como patógena de ovinos y bovinos, ya que se aísla de abortos esporádicos, pero en el humano, se ha reportado como una causa poco frecuente de infecciones extraintestinales como septicemia, meningitis, salpingitis, infecciones fetales, abortos e infecciones del sistema cardiovascular, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o con daño vascular preexistente. El número de aislamientos de este microorganismo del tracto gastrointestinal en pacientes con diarrea se ha incrementado, lo que apoya la idea de que también es causante de enteritis. (47,48)

-*C. fetus subsp. venerealis*. Microorganismo causante de esterilidad enzoótica y abortos en vacas. Se transmite sexualmente y se ha aislado de moco vaginal y semen en los bovinos, pero las infecciones en humanos son raras, por lo que no se considera como patógena para el hombre. (47,48)

-*C. laris*. En un principio se identificó como *Campylobacter* termofílico resistente al ácido nalidíxico, pero como se aisló originalmente del contenido cloacal de las gaviotas del género *Larus*, posteriormente se le designó como *C. larus*. Aún cuando es clínica, epidemiológica y microbiológicamente similar a *C. jejuni*, distinguiéndose de éste únicamente por su resistencia al ácido nalidíxico, raramente causa diarrea en humanos. (47,48)

-*C. upsaliensis*. Se caracteriza por ser un productor débil de catalasa y por su sensibilidad a cefalotina; se ha aislado de perros y gatos, y se ha reconocido como agente causal de diarrea y bacteremia en humanos.

-*C. jejuni* y *C. coli*. Tanto *C. jejuni* como *C. coli*, son causantes de diarrea en el hombre, aunque el primero es el más común.

*C. jejuni* está ampliamente distribuido en animales domésticos como perros, gatos, bovinos,

cerdos, así como también en aves y animales salvajes causando abortos esporádicos en borregos y enteritis en bovinos. Se divide en dos subespecies, *C. jejuni* subsp. *jejuni*, que se considera el principal agente causal de gastroenteritis en humanos, y *C. jejuni* subsp. *doyle* que se ha aislado de biopsias gástricas de pacientes adultos y a partir de heces de niños con diarrea.

El reporte del primer aislamiento de esta especie por Butzler y col. generó un interés muy grande por estudiar al género *Campylobacter*, lo que llevó a considerar a esta especie como la causa mas frecuente de diarrea en humanos, particularmente en la población infantil.

*C. coli* también causa diarrea en el hombre y ésta es indistinguible de la producida por *C. jejuni*. El cerdo es su principal reservorio, aunque también se encuentra en animales domésticos en menor frecuencia que el segundo. Debido a la similitud de ambas especies, es necesaria la realización de pruebas bioquímicas para distinguirlas. (44,48)

## **EPIDEMIOLOGIA**

Las infecciones entéricas por *Campylobacter* son comunes a nivel mundial. Se ha considerado a *C. jejuni* como el principal agente etiológico causante de diarrea en el humano, además, cabe hacer notar que de los microorganismos aislados pertenecientes a este género, 98% son identificados como *C. jejuni*. (55,56)

La prevalencia de *C. jejuni* es más alta en países en desarrollo, que en los países industrializados; diversos estudios epidemiológicos han reportado que en éstos, *C. jejuni* se aísla en aproximadamente el 15% de los casos de enteritis infecciosa, siendo más frecuente que *Salmonella* y *Shigella*, y que el porcentaje de portadores asintomáticos es muy baja.

En países en desarrollo, por el contrario, el porcentaje de aislamiento va de un 20% hasta un 40% en niños menores de 5 años, con un porcentaje de portadores asintomáticos muy alto que en algunos reportes alcanza hasta un 30-40%. (4,15,55)

*C. jejuni* se presenta primordialmente en niños de 0 a 5 años de edad y en adultos de 15 a 29 años, representando una distribución de edad de tipo bimodal.

En los países con clima templado, el número de aislamientos es mayor durante el verano, y en los países de clima tropical, este incremento se da durante la temporada de lluvia. En nuestro país, *C. jejuni* se ha reportado como el principal agente etiológico de gastroenteritis de origen infeccioso en niños menores de cinco años (cuadro 1). (11,17)

**CUADRO 1**

---

**FRECUENCIA EN EL AISLAMIENTO DE ENTEROPATOGENOS EN UNA COMUNIDAD  
DE NIÑOS MENORES A LOS 2 AÑOS DE EDAD**

---

AGENTE ETIOLOGICO	%
<i>Campylobacter jejuni</i>	16.25
<i>Rotavirus</i>	12.38
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (LT y ST)	11.15
<i>E. coli</i> enteropatógena	10.61
<i>Shigella sp</i>	1.76
<i>E. histolytica</i>	1.59
<i>Salmonella sp</i>	0.53
<i>Giardia lamblia</i>	0.17
Etiología no determinada	45.65
Total	100.00

---

**DATOS TOMADOS DE LA CLINICA DE DIARREAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA  
NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN". (MARZO 1990)**

---

## **RESPUESTA INMUNE**

Aunque no se sabe exactamente como es la respuesta inmune del hospedero en la infección por *C. jejuni*, se ha sugerido que la inmunidad humoral es la que juega un papel importante en el desarrollo de resistencia a la infección. (3,29)

El desarrollo de inmunidad se asocia con una o más infecciones naturales (42); en niños que viven en zonas endémicas, se ha observado un título elevado de anticuerpos específicos para *C. jejuni*, resultado de una exposición intensa al microorganismo, sobre todo por la gran incidencia de infecciones en el primer año de vida, lo que al parecer le confiere una protección efectiva contra el desarrollo de la enfermedad.

En diversos estudios realizados en zonas con alta prevalencia de *C. jejuni* se ha observado, que después de la alta incidencia de infección durante el primer año de vida, sigue un decremento progresivo en el desarrollo de enfermedad, dándose una relación inversa entre los niveles de anticuerpos y la incidencia de diarrea. En estos niños, los títulos de anticuerpos se incrementan con la edad, mientras que la diarrea disminuye. (12,56)

Se cree que la producción localizada de anticuerpos en el intestino, es el principal mecanismo responsable de la eliminación rápida del microorganismo, ya que tales anticuerpos pueden estar dirigidos contra estructuras necesarias para la adhesión e invasión del tracto gastrointestinal. (56)

## **VIAS DE TRANSMISION**

Existen diferentes vías de transmisión de *C. jejuni*, entre las que se incluyen la ruta fecal-oral, a través de agua o comida contaminada, y el contacto directo con materia fecal de animales o humanos infectados. (55)

En diversos brotes de diarrea causada por este microorganismo, se ha propuesto que la transmisión se ha originado por la ingestión de comida contaminada como aves, carne roja mal cocinada y leche no pasteurizada, por la ingestión de agua contaminada (55,56), o por contacto directo con animales como perros, gatos, pollos, ganado bovino y vacuno. (50,56)

Aún cuando se ha reportado la transmisión de persona a persona, no es un hecho común (55), aunque existen reportes de transmisión por contacto sexual entre pacientes inmunodeficientes. (45)

Las vías de transmisión en los países desarrollados son diferentes a las que se presentan en países en desarrollo. En los primeros, el problema se concentra en el manejo, preparación y consumo de alimentos crudos o mal preparados, principalmente pollo, o por la ingestión de agua contaminada.

En los países en desarrollo, los mecanismos de transmisión son multifactoriales y no están completamente identificados, pero se sabe que existe una interacción de varios factores que contribuyen a la alta incidencia de este microorganismo. Entre los que revisten gran importancia, y que se han documentado en diversos estudios (50,56) se cuentan las aves, ya que son el reservorio natural del microorganismo, y la mayoría de los pollos destinados para consumo humano están contaminados (51) y, en menor proporción, lo están los cerdos y las reses (52); además, la existencia de aves de corral dentro de la casa, se considera el factor de riesgo más importante en las áreas rurales. La falta de drenaje y ausencia de instalaciones sanitarias también son factores muy importantes.

#### **DOSIS INFECTIVA**

No se ha definido la dosis infectiva necesaria para que *Campylobacter* produzca enfermedad, ya que existen personas que presentan síntomas después de ingerir 500 microorganismos y otros que, por el contrario, ingieren más de  $10^6$  bacterias y no presentan síntomas, lo que refleja la

existencia de una susceptibilidad individual a la infección por este microorganismo. (50,55,63)

## **MANIFESTACIONES CLINICAS**

Una vez establecida la infección, la diarrea de tipo agudo es la presentación clínica mas común y más del 90% de los casos son debidos a *C. jejuni*. (55,56,63)

El período de incubación varía de 1 a 7 días. En general, la enfermedad es autolimitada, con una duración aproximada de una semana en el 60 al 70% de los casos, y de dos semanas en un 20 a un 30%, aún cuando se han reportado períodos más prolongados en el 5 al 10% de los casos. El período de excreción del microorganismo varía de dos semanas a tres meses en pacientes que no han recibido tratamiento antibiótico; en los pacientes que sí han recibido tratamiento, se ha observado una disminución en la excreción de la bacteria. (55,63)

En el período prodrómico, los pacientes pueden presentar fiebre, dolor de cabeza y mialgia. A estos síntomas sigue la aparición de la diarrea, acompañada por náuseas, vómito, cólicos y dolor generalmente periumbilical que afecta a más del 90% de los pacientes mayores de 2 años, y puede llegar a ser tan severo que puede confundirse con apendicitis. (55,56)

En países desarrollados la incidencia de diarrea con sangre es de más del 50%, y la presentación clínica puede ser indistinguible de la ocasionada por infecciones con *Shigella*, caracterizándose por malestar general, fiebre, cólicos, tenesmo y presencia de sangre y leucocitos en las heces.

En pacientes muy graves puede observarse colon hemorrágico e inflamación exudativa colónica y la observación histológica de biopsias rectales muestra inflamación del tejido con infiltración de neutrófilos, eosinófilos y células mononucleares en la lámina propia; puede existir también ulceración de la mucosa con disminución de la cantidad de moco, y formación de abscesos en las criptas con degeneración de las glándulas epiteliales. (15,55,56)

En los países en desarrollo, la diarrea de tipo secretor es la presentación clínica más común, y aunque en sólo un 20% de los casos se presenta sangre en las heces, éstos son, en su mayoría, causados por *C. jejuni*, seguido por *Shigella* y *E. histolytica*. (55)

Se han reportado casos de infecciones extraintestinales tanto en pacientes inmunocomprometidos, como en pacientes inmunocompetentes, entre los que se incluyen colecistitis, meningitis, infecciones del tracto urinario, septicemia y artritis séptica. (56)

La infección por *C. jejuni* se ha asociado, de manera importante, con varios síndromes como Guillain-Barré, Miller-Fischer y Reiter; así como también se han descrito complicaciones tales como artritis reactiva y eritema nodoso. (1,55,63)

#### **CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS**

*Campylobacter jejuni* es un bacilo Gram negativo, no esporulado, con una morfología curva característica, se describe como S, espiral o "alas de gaviota" y que mide de 0.5 a 8  $\mu$  de largo y 0.2 a 0.5  $\mu$  de ancho.

Es un microorganismo pleomórfico, en cultivos en fase log presenta forma helicoidal, mientras que en cultivos de 48 horas predominan las formas cocoides. (9,63)

Es móvil, con un movimiento rápido de sacacorcho o tirabuzón, debido a la presencia de uno o más flagelos, que pueden ser monotricos o anfitricos. Su contenido de G+C es bajo, y varía de 28 a 38%. (48,56)

Posee un metabolismo respiratorio; no fermenta ni oxida carbohidratos, por lo que su energía la obtiene de aminoácidos e intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico. Es oxidasa positivo y reduce los nitratos a nitritos. (48,50)

## **AISLAMIENTO**

Debido a que *C. jejuni* crece más lentamente que la flora entérica normal, para su aislamiento a partir de heces se requiere el uso de medios selectivos. Se han desarrollado dos métodos de aislamiento, generalmente basados en dos principios.

El primero de estos métodos consiste en un medio de agar sangre suplementado con antibióticos que inhiben el crecimiento de la flora normal o un medio libre de sangre, que contiene carbón activado.

*C. jejuni* puede crecer sobre una variedad de medios basales, entre los que se encuentran agar Brucella y Muller-Hinton, suplementado con sangre completa o lisada de animales, adicionada de sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio. (50)

Con respecto a los medios libres de sangre, se basan en el uso de compuestos como el sulfato ferroso, metabisulfito de sodio y piruvato de sodio, mas carbón activado. Entre estos medios se encuentran el medio de *Campylobacter* libre de sangre de Preston al 1.2% (CCD) y el medio selectivo libre de sangre con carbón activado (CSM). (6,50)

El segundo método de aislamiento se basa en la filtración de la muestra a través de una membrana de triacetato de celulosa de 0.45 $\mu$  de poro, colocada directamente en un medio enriquecido que no contiene antibióticos como gelosa sangre, gelosa chocolate o agar Brucella. La muestra fecal se aplica en el filtro y después de 30 minutos, las especies de *Campylobacter* atraviesan el filtro, mientras que los otros microorganismos que se encuentren en la muestra, no lo hacen. El filtro se retira de la caja y se incuba, en atmósfera microaerofílica por 48 horas. (4) Este método tiene la ventaja de permitir el crecimiento de cepas que son susceptibles a alguno o algunos de los antibióticos usados en los medios selectivos; sin embargo, el inóculo que se requiere es mayor de 10<sup>5</sup> UFC por gramo de heces, mientras que en los selectivos, el inóculo es pequeño. (56)

## CONDICIONES DE CRECIMIENTO

*Campylobacter jejuni* es estrictamente microaerofílico, muy sensible a la desecación y a concentraciones elevadas de O<sub>2</sub> como las que existen en el medio ambiente, por lo que las muestras de materia fecal deben sembrarse rápidamente o bien, colocarse en un medio de transporte como el de Cary-Blair. (50,63)

Por ser microaerofílico, para su crecimiento requiere una atmósfera con 5% de O<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y 85% de N<sub>2</sub>, condiciones que pueden lograrse por dos métodos principalmente:

-El método de la jarra con vela. Por este método se reduce inicialmente el nivel de O<sub>2</sub> aproximadamente a un 17% y también proporciona CO<sub>2</sub>, dando resultados satisfactorios en lo que se refiere a crecimiento, pero esto sólo es cuando se incuba a 42°C, porque a 37°C los resultados no lo son. (54)

-Sistemas generadores de gases. Proporcionan las concentraciones adecuadas de gas y se encuentran disponibles comercialmente como el sistema Poly-Bag y el sistema Campy-Pak. (55)

## IDENTIFICACION

La identificación de un cultivo positivo se realiza por morfología macro y microscópica, después de 24 a 48 horas de incubación.

Se pueden encontrar colonias no hemolíticas, planas, grises, con tendencia a diseminarse a lo largo de la estría, y a coalescer. El diámetro puede llegar a ser de 10 mm, algunas son muy irregulares con un punto elevado en su centro, o bien, colonias redondas de 1 a 2 mm de diámetro, convexas, elevadas, con bordes enteros y algunas pueden presentar un color rosado (50,56). Para la observación al microscopio los frotis se tiñen con un colorante fuerte como cristal violeta o carbol fucsina, o bien con safranina, encontrándose bacilos delgados de forma espiral, "alas de gaviota" o en S, si son cultivos de 24 horas; si se trata de cultivos de 48 ó 72

horas, las formas cocoides comienzan a predominar. (9,15,48)

Dado que *Campylobacter* no fermenta ni oxida carbohidratos, las pruebas bioquímicas por las cuales las especies del género se pueden diferenciar son relativamente pocas. Sin embargo, algunas de sus propiedades se pueden utilizar para diferenciarlas de otros microorganismos ya que no requieren suero para su crecimiento, no hidrolizan ni fermentan urea o gelatina, son negativas al rojo de metilo y Voges Proskauer y no tienen actividad de lipasa. (48,50)

En el cuadro 2 se muestran las pruebas fisiológicas para la caracterización de *Campylobacter*; el grupo de *C. jejuni-coli* se diferencia principalmente por la prueba de la catalasa, su propiedad de crecimiento a 42°C, su sensibilidad a ácido nalidíxico y su resistencia a cefalotina. Entre ellos, la única prueba existente para diferenciarlos es la hidrólisis del hipurato, ya que sólo *C. jejuni* es capaz de hidrolizarlo. Hasta la fecha se han desarrollado dos métodos de serotipificación para *C. jejuni* y *C. coli*, sobre todo con fines epidemiológicos.

El primero de ellos fué propuesto en 1980 por Penner y col. (49), y se basa en la extracción salina de los antígenos termoestables, tales como el antígeno somático O del lipopolisacárido (LPS), que se determinan por la reacción de anticuerpos contra las distintas variantes del Ag O.

El segundo de ellos que Lior et al. describieron en 1982 (40), basándose en la reacción de anticuerpos contra antígenos termolábiles. Actualmente se han identificado mas de 90 diferentes serotipos por el método de Penner y 50 por el de Lior.(4)

El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular para la identificación y tipificación de *C. jejuni* ha suscitado un interés muy grande dado que presentan varias ventajas sobre los otros métodos ya mencionados, como el hecho de que en varios de ellos no es necesario aislar a *Campylobacter* para identificarlo y tipificarlo, además de que son más rápidos y sensibles. (26,65,66)

CUADRO 2. PRUEBAS FISIOLÓGICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE *CAMPYLOBACTER*

Características	<i>C.fetus</i>		<i>C.jejuni</i>	<i>C.coli</i>	<i>C.sputorum</i>			
	<i>s.fetus</i>	<i>s.veneralis</i>			<i>s.sputorum</i>	<i>s.bubulus</i>	<i>s.mucosalis</i>	<i>s.concisus</i>
Requerimiento de agua para crecimiento aerofilico	-	-	-	-	-	-	+	+
Catalasa	+	+	+	+	-	-	-	-
Reducción por nitrito	-	-	-	-	+	+	+	+
Producción de H <sub>2</sub> S (TSI ó SIM)	-	-	-	-	+	+	+	+
Producción de H <sub>2</sub> S (TSI) (Tiras de papel con acetato de Pb)	d	d	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en presencia de:								
Glicina al 1%	-	-	-	-	-	+	+	-
NaCl al 3.5%	-	-	-	-	-	+	+	-
Crecimiento a:								
25°C	+	+	-	-	-	d	-	-
42°C	-	-	+	+	+	-	+	+
Inhibición por:								
Ac. nalidíxico	-	-	+	+	-	d	d	-
Cefalotina	+	+	-	-	+	+	+	-
Hidrólisis de hipurato	-	-	+	-	-	-	-	-
Crecimiento anaerobio con:								
Fumarato sin H <sub>2</sub> ó formato	-	-	-	-	+	+	-	-
Fumarato con H <sub>2</sub> ó formato	-	-	-	-	-	-	+	+
Colonias color amarillo sucio	-	-	-	-	-	-	+	-
Porcentaje molar de G+C en DNA	33-36	33-36	32	32-34	29-31	29-31	34	34-38

s: subespecie; d: tardío

## **ESTRUCTURAS ANTIGENICAS**

La membrana externa bacteriana juega un papel muy importante en la relación hospedero-parásito, ya que se ha propuesto que sus componentes pueden participar en la adherencia e invasión de la bacteria a la célula huésped, en la resistencia a la actividad bactericida del suero, en la fagocitosis y en los mecanismos de muerte fagocítica. (5,21,30)

Los componentes de superficie de *C. jejuni* forman un complejo antigénico muy variado que se ha estudiado ampliamente; sin embargo, el papel que desempeña cada uno de ellos en la patogénesis de la infección no está completamente claro (34). Mediante el uso de procedimientos de extracción ácida y de extracción con sarcosil, se han identificado proteínas, con diferentes pesos moleculares y que son inmunogénicas. Entre ellas destacan: la proteína flagelar, conocida como flagelina, con un peso molecular relativo de 63 kDa; una proteína de 45 kDa que corresponde a una porina, responsable del mantenimiento de los canales a través de la membrana; una proteína de 31 kDa, extraída con glicina ácida, que se reconoce como un antígeno común a todas las cepas de *Campylobacter*; con la extracción por sarcosil, se han identificado 4 proteínas más, con pesos moleculares de 92, 55, 37 y 20 kDa. (19,53,64,67)

Hay que hacer notar que ya se han identificado dos proteínas, PBE1 y PBE3, relacionadas con ciertos mecanismos de patogenicidad, extraídas con sarcosil, y con pesos moleculares de 28 y 30 kDa respectivamente. Se ha considerado a PBE1 como uno de los principales factores de adherencia de *C. jejuni* en estudios realizados en células HeLa, se encuentra altamente conservado por lo que se cree que juega un papel muy importante en la colonización del intestino. (46)

Otro componente importante de la membrana externa de *C. jejuni* es el LPS, es de bajo peso molecular y le confiere a la bacteria una seroespecificidad heterogénea, aunque su papel en la patogénesis no se ha demostrado.(68)

## **PATOGENESIS**

Aun cuando los mecanismos por los cuales *C. jejuni* causa enfermedad no se han dilucidado completamente, se han propuesto tres procesos infecciosos que se asocian con cuadros clínicos característicos (55):

-Adherencia y producción de una enterotoxina, lo que provoca una diarrea de tipo secretor.

-Invasión y proliferación dentro del epitelio intestinal, lo que provoca daño celular y una respuesta inflamatoria, que se manifiesta como una diarrea de tipo inflamatoria, con presencia de leucocitos en las heces.

-Translocación, en la cual el microorganismo penetra la mucosa intestinal sin dañarla, prolifera en la lámina propia y en los nódulos linfáticos mesentéricos, con la aparición posterior de infecciones extraintestinales. (37)

### **a) TOXINAS**

*C. jejuni* es capaz de producir dos exotoxinas: una enterotoxina termolábil (CJT) y una citotoxina. La CJT fué descrita por Ruíz Palacios et al en 1983 (57) y se encuentra inmunológicamente relacionada con la toxina del cólera (CT), y con la toxina termolábil de *Escherichia coli* (LT). (10,62)

CJT, al igual que CT, induce la secreción de fluido extraluminal, por la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa en las células de la mucosa intestinal, incrementando la concentración intracelular de AMP cíclico y por ende, alterando el transporte normal de electrolitos y agua en los enterocitos, como se ha visto en ensayos realizados en asa ligada de rata. (16,18,56)

La citotoxina que produce *C. jejuni* es muy potente, como se ha demostrado en ensayos de citotoxicidad en células CHO, HeLa y Vero y es diferente de las producidas por *Clostridium difficile* y *Shigella*, pero su contribución en la virulencia de la bacteria no se ha esclarecido. (16,18,41,56)

#### **b) INVASIVIDAD**

Aún cuando *C. jejuni* da la prueba de Sereny negativa, las características clínicas y patológicas de la enteritis por *C. jejuni* en la que se encuentran moco y sangre en las heces de los pacientes, sugiere que la bacteria es capaz de invadir el epitelio intestinal. Evidencias clínicas y experimentales han demostrado que la invasividad juega un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad. (36)

Entre los modelos "in vivo" que han demostrado esta capacidad, se encuentra el realizado por Ruiz-Palacios y cols quienes trabajaron con pollos recién nacidos, Blaser y cols quienes trabajaron con ratones adultos, Fauchère quien trabajó con ratones gnotobióticos y diversos estudios realizados en monos. También se ha demostrado esta capacidad por ensayos "in vitro" por la invasión de diferentes líneas celulares como HeLa y HEP-2. (15,34,36,59)

#### **c) ADHERENCIA**

La adhesión de la bacteria a la superficie intestinal se considera como el primer paso que utilizan los microorganismos para prevalecer en el hospedero, lo que les permite colonizar la superficie mucosa y posteriormente iniciar una secuencia de eventos capaces de producir daño al hospedero (23,24,25). Si la bacteria es incapaz de adherirse, puede ser eliminada rápidamente por los mecanismos locales de defensa, no específicos, como el movimiento peristáltico, el movimiento ciliar, los fluidos gastrointestinales y la competencia con la flora normal. (21,27,60)

Se ha propuesto que la adherencia es dependiente de un reconocimiento específico entre sitios

determinados de la membrana de las células del hospedero, llamados receptores y estructuras de la superficie bacteriana, llamadas adhesinas, por lo que esta adherencia debe considerarse como una interacción célula-célula (5) mediada por la interacción específica adhesina-receptor y que además es irreversible. (30,31)

Entre las adhesinas descritas en la literatura se encuentran proteínas, polisacáridos, ácido lipoteicoico, o conjugados de éstos. Las estructuras bacterianas más reconocidas como adhesinas son: flagelo, cápsula, pili, fimbrias, LPS, lectinas asociadas y proteínas de membrana externa (OMP).

Estudios realizados con *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), han demostrado que su adherencia a células epiteliales está mediada por fimbrias; a la fecha, se han identificado 8 clases especiales de fimbrias de naturaleza proteica que se unen a receptores de la mucosa intestinal del hospedero. Otros microorganismos que también median su adherencia por fimbrias son: *V. cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella* y *Salmonella*. (24,32)

Otros ejemplos de mediadores de la adherencia son el ácido lipoteicoico de *Streptococcus pyogenes* (estreptococo del grupo A) y las proteínas de membrana externa de *Mycoplasma*. (24,32)

En lo que se refiere a los receptores, se propone que pueden estar constituidos por proteínas y/o carbohidratos; sin embargo, existen diversos estudios que apoyan la idea de que son principalmente glicoconjugados, y se cree que es la porción carbohidrato la responsable principal de este reconocimiento específico. (21,25,32)

Basados en lo anterior, se han propuesto tres mecanismos de asociación intestinal (38):

- 1) Adhesión, en la cual la bacteria es capaz de adherirse al epitelio por medio de adhesinas o por el desarrollo de estructuras de inserción especializadas.

2) Colonización del moco, en la cual, ciertos microorganismos tienen la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en las áreas externas de la mucosa que cubre la superficie del intestino.

3) Asociación a las capas más profundas de la mucosa y a las criptas intestinales, en las que pueden observarse agrupaciones muy densas de bacterias.

Se ha postulado que la adherencia de *C. jejuni* puede estar mediada por diferentes estructuras de superficie de la bacteria, y aunque no posee fimbrias o pilis, otras estructuras como el flagelo, LPS y diferentes OMP pueden funcionar como adhesinas (61). Tal es el caso de un antígeno de superficie llamado PBE1 que se ha reconocido como una adhesina muy importante, además de que se encuentra muy conservada en las cepas de *C. jejuni* (34,35), aún cuando no se cree que sea el único factor implicado, sino que es un evento multifactorial.

Estudios realizados con microscopía electrónica, han demostrado que existe una interacción entre la superficie de las células epiteliales y los componentes de la superficie bacteriana. (39,58,59)

Hasta ahora, se han realizado estudios en diversas líneas celulares como INT 407, HEp-2, HeLa, Vero, 293, CHO-K1, MDCK y Caco 2, observándose que *C. jejuni* es capaz de adherirse con igual eficiencia en cada una de ellas. En estos estudios se ha observado que el número de bacterias internalizadas varía, encontrándose un mayor número en las células de origen epitelial humano (INT 407, HEp-2, HeLa, 293); se ha sugerido que esta variación se debe principalmente a la expresión de diferentes tipos o cantidad de receptores en cada una de ellas (35,54,58); por otro lado, también se ha demostrado adherencia a bordes en cepillo de cerdo (13).

En el laboratorio de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", se han estandarizado técnicas que permiten evaluar la capacidad de *C. jejuni* para asociarse a la línea celular HEp-2, definiéndose 2 parámetros:

-Índice de Asociación (IA), definido mediante ensayos en placas de microcultivo, como el porcentaje de células con bacterias adheridas. Una cepa se considera adherente cuando el IA>20%.

-Índice de invasividad (II), que se define como el porcentaje de bacterias que son capaces de penetrar en un ensayo con cultivos celulares en esferas de sefadex, considerando a una cepa como invasiva cuando II>60%.

Por estos parámetros, las cepas de *C. jejuni* pueden ser agrupadas en tres tipos: cepas no adherentes/no invasivas (IA<20% e II<60%), cepas adherentes (IA>20% e II<60%) y cepas invasivas (IA>20% e II>60%). De acuerdo a esta clasificación, se ha encontrado una relación entre el tipo de cepa aislado y la presentación clínica de la enfermedad, como ya antes lo habían observado Taylor y cols. (54)

Gran parte de los métodos descritos en la bibliografía para el estudio de la adherencia de la bacteria, involucran el uso de elementos radioactivos como (<sup>3</sup>H)alanina, (<sup>3</sup>H)leucina, (<sup>3</sup>H)acetato para cuantificar, por centelleo, el número de bacterias adheridas a las células, y aún cuando tales métodos son sensibles y específicos, implican por un lado, riesgos para la salud por el tipo de reactivos empleados y, por otro, un gran costo por el uso de equipo especial.

En general, se utilizan técnicas de tinción diferencial para evaluar microscópicamente, la asociación de *Campylobacter* a células epiteliales; sin embargo, éstas son menos sensibles que los métodos de centelleo. (39,54,58)

### **III. JUSTIFICACION**

Debido a que *Campylobacter jejuni* es uno de los agentes principales causantes de enteritis infecciosa a nivel mundial, es muy importante el estudio de sus mecanismos de patogenicidad, y siendo la adherencia uno de los principales mecanismos en el desarrollo de la enfermedad, su estudio reviste gran importancia.

Debido a que las técnicas utilizadas para su estudio presentan algunos inconvenientes, es necesario el desarrollo de otras técnicas que permitan este estudio.

#### **IV. OBJETIVO**

En este trabajo se propone el desarrollo de una técnica sensible que permita determinar la asociación de *Campylobacter jejuni* a células epiteliales, sin involucrar elementos radioactivos y empleando una técnica de inmunofluorescencia.

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Estandarización de un método de inmunofluorescencia para determinar la asociación de *Campylobacter jejuni* a la línea celular HEP-2.

1.1 Estandarización del proceso de marcaje de *C. jejuni* con Digoxigenina.

1.2 Estandarización del proceso de revelado con un conjugado anti Digoxigenina-FLUOS y coloración de contraste con Azul de Evans para observación de la adherencia de la bacteria a la célula.

2. Aplicación del método estandarizado en ensayos de asociación de *Campylobacter jejuni*, para evaluar el método estandarizado.

## **V. PARTE EXPERIMENTAL**

### **MATERIAL**

#### **Material biológico**

Anticuerpo anti Digoxigenina conjugado con FLUOS (5(6)-Carboxy-fluorescein-N-hydroxy-succinimide ester)

Aprotinina

Cepas de *C.jejuni* proporcionadas por el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" procedentes de diversos estudios de campo y caracterizadas previamente como invasiva, adherente, no adherente/no invasiva

Línea celular HEP-2

Suero de Ternera Neonato (NCS)

#### **Medios de cultivo**

Agar sangre de carnero

Campy-Bap

Medio basal de Eagle (BME)

#### **Soluciones**

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Solución de Azul de Evans

Solución de Azul tripano

Solución de bicarbonato de sodio

Solución de EDTA

**Solución de EDTA-Tripsina**

**Solución de Glicerol-PBS 1:1**

**Solución de hidróxido de sodio**

**Solución de PBS-Tween**

**Solución de PBS-Tween-Albúmina sérica bovina (PBS-Tween-BSA)**

**Digoxigenina/Dimetil sulfóxido (DIG/DMSO)**

**Solución de Glicerol/PBS**

### **Reactivos**

Acido sulfúrico ( $H_2SO_4$ )

Cloruro de Bario ( $BaCl_2$ )

Cloruro de sodio ( $NaCl$ )

Formalina

Fosfato dibásico de sodio ( $Na_2HPO_4$ )

Fosfato monobásico de sodio ( $NaH_2PO_4$ )

Gentamicina

### **Material de vidrio**

Cámara de Neubauer

Frascos de vidrio de 100, 250 y 500 ml

Jarra para atmósfera microaerofílica

Matraces aforados 250 y 1,000 mL

Matraces Erlenmeyer 25 mL

Pipetas Pasteur

Portaobjetos

Tubos de ensaye de 13X100 mm y 16X150 mm

Vaso de precipitados

**Material diverso**

Asas desechables

Botella para cultivo de tejidos de 75 cm<sup>3</sup>

Cajas petri de 15X100 mm

Filtros Millipore de 0.22  $\mu$

Filtros tipo Swinex

Jeringas de 1 mL

Microcámaras de cultivo de 8 pozos

Micropipetas

Pipetas serológicas de 2, 5, 10, 25 ml

Probeta de 1 L

Viales de 1 mL

**Equipo**

Campana de flujo laminar

Incubadora a 37°C

Incubadora a 42°C

Lampara de fluorescencia

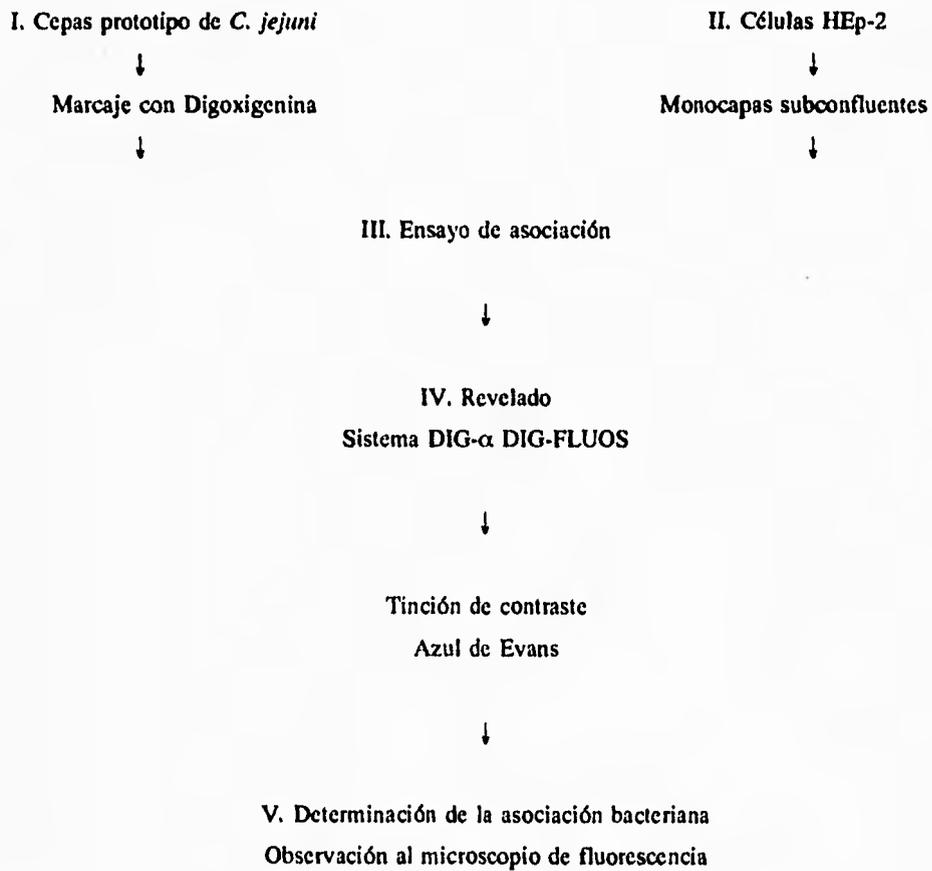
Microcentrífuga

Microscopio de luz

Microscopio invertido

## **METODOS**

### **Diagrama de flujo general**



## **I. *Campylobacter jejuni*.**

### **1. Cepas y condiciones de crecimiento.**

Se utilizaron tres cepas de *C. jejuni*, INN-287IP, INN-10SP, INN-57SP, caracterizadas previamente como invasiva, adherente y no adherente no invasiva, respectivamente y que se encontraban almacenadas a -70°C.

Cada cepa se descongeló y se sembró en medio de Campy-Bap y agar sangre de carnero, incubándose a 42°C durante 24 h en atmósfera microaerófila. La pureza de la cepa se verificó por tinción con safranina y observación al microscopio de la morfología bacilar típica.

### **2. Marcaje con DIG.**

El marcaje de la bacteria con Digoxigenina se realizó de acuerdo al método descrito por Borén y cols (8) para *H. pylori*. Brevemente, a partir de cultivos bacterianos en fase log, se prepararon suspensiones en PBS (pH 8.5, 10mM), ajustándose al tubo 10 de McFarland; se adicionó a cada tubo 2 µg/mL de aprotinina, con el fin de inhibir cualquier actividad proteolítica en la suspensión. A partir de un patrón de DIG de 10 mg/ml en dimetilsulfóxido, se probaron 50 y 100 µg por mL de mezcla de reacción. La suspensión se incubó por 2 h a temperatura ambiente, con agitación suave.

Dada la importancia de eliminar la DIG libre en la suspensión posterior a la incubación, se probaron diferentes condiciones de centrifugación que permitieran la formación de una pastilla bacteriana homogénea y la consecuente eliminación de la DIG libre en el sobrenadante; se probaron diferentes velocidades 3,000, 7,000 y 12,000 rpm en tiempos variables de 5 y 10 minutos.

## II. Células HEp-2.

### 1. Mantenimiento.

Las células se mantuvieron en medio de crecimiento, BME, suplementado con 5% de suero de ternera neonato y gentamicina (500 µg/100 mL de BME), incubándose a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta la formación de monocapas confluentes.

### 2. Monocapas subconfluentes.

Las células se desprendieron por tratamiento con tripsina-EDTA e incubación a 37°C por 5 minutos, resuspendiéndose en 2 mL de BME. Se ajustó la concentración de células a 4x10<sup>5</sup> células viables/mL por el método de exclusión con Azul Tripano en cámara de Neubauer, contando los cuadrantes externos y aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\frac{\text{No. de células}}{\text{No. cuadrantes}} \times \text{Dilución empleada (10)} \times \text{Factor cámara (10,000)}}{\text{No. de células deseadas/mL}}$$

Las monocapas subconfluentes se obtuvieron al depositar 400 µL/pozo de la suspensión celular en microcámaras de cultivo de 8 pozos (Nunc, Naperville, IL. USA), y después de incubar a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>, durante 18 horas.

## III. Ensayo de asociación.

Aún cuando en el laboratorio de Infectología se contaba con métodos para la valoración de la asociación bacteriana a células HEp-2, era necesario establecer las condiciones óptimas de este método alternativo.

Se probaron 4 concentraciones bacterianas de acuerdo a los tubos 1, 2, 3 y 4 del nefelómetro de McFarland, y que corresponden a  $3 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$  y  $12 \times 10^8$  bacterias/mL; las suspensiones se prepararon en medio de BME, suplementado con 5% de NCS, y se pusieron en contacto con las monocapas subconfluentes de células HEp-2. Para cada concentración se probaron tres volúmenes diferentes por pozo, 50, 100 y 200  $\mu$ L, incubándose durante 3.5 h a 37°C en atmósfera microaerofílica.

Dado que cabía la posibilidad de que existiera asociación inespecífica, se evaluó también el uso de albúmina sérica bovina (BSA) al 0.2% en BME, para la preparación de las suspensiones bacterianas.

Una vez transcurrido el período de incubación, era necesario realizar la fijación de la monocapa celular con las bacterias adheridas; sin embargo, para establecer si este paso interfería o no con el revelado subsecuente, se decidió probar dos alternativas; la primera, fijar con formalina al 10% antes del revelado con el sistema anti DIG-FLUOS y, la segunda, fijar después de la reacción antígeno anticuerpo.

#### **IV. Revelado.**

El revelado consiste en poner de manifiesto las bacterias adheridas mediante una reacción antígeno-anticuerpo, en la que el anticuerpo marcado con un componente fluorescente (FLUOS), reconoce la DIG en la superficie bacteriana.

El primer paso consistió en la estandarización de la concentración óptima de anticuerpo; partiendo de una solución patrón con 200  $\mu$ g/mL, se prepararon diluciones 1:10, 1:50 y 1:100 en PBS-BSA 0.5%, pH 7.4, correspondientes a una concentración final de anticuerpo de 20, 4 y 2  $\mu$ g/mL respectivamente. A cada pozo se adicionaron 50  $\mu$ L de la dilución por probar, incubándose durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación y protegiéndolo de la luz. Finalmente se lavó 3 veces con PBS (10 mM, pH 7.4) para eliminar el exceso de anticuerpo.

Igualmente se estandarizó la tinción de contraste con Azul de Evans, agregando el colorante diluido 1:100 en agua desionizada, de tres formas diferentes para determinar cuál de ellas era la más conveniente: i) agregar el Azul de Evans junto con la bacteria durante el período de adherencia, ii) agregarlo junto con el anticuerpo durante el revelado, y iii) agregarlo después de revelar con el anticuerpo.

Se evaluó cada una de estas alternativas en la observación al microscopio.

#### **V. Determinación de la asociación bacteriana.**

Cada uno de los ensayos se observó al microscopio de fluorescencia, para evaluar cada uno de los parámetros probados durante el proceso de estandarización y poder determinar las condiciones óptimas para la realización del ensayo de asociación.

## **VI. RESULTADOS**

Para evaluar cada uno de los parámetros involucrados en la estandarización, cada ensayo se realizó por triplicado.

### **1. Marcaje con Digoxigenina.**

La primera fase del estudio consistió de la estandarización del marcaje de la bacteria con Digoxigenina, para lo que se probaron dos concentraciones, la reportada en la literatura y una menor (100 y 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). No se observaron diferencias entre ellas en la intensidad de la fluorescencia y se utilizó la menor concentración posible.

Como ya se había mencionado, era importante eliminar la DIG libre en la suspensión, por lo que se probaron diferentes velocidades de centrifugación (3,000, 7,000 y 12,000 rpm), en 2 tiempos variables (5 y 10 min), eligiendo centrifugar a 7,000 rpm durante 5 min ya que la pastilla bacteriana obtenida fue homogénea, lo que no se logró en las otras velocidades y tiempos analizados. (Tabla 1)

### **2. Monocapas subconfluentes.**

En este punto solo fue necesario el familiarizarse con el manejo del cultivo de células, dado que las condiciones de crecimiento para el mantenimiento de la línea y la formación de monocapas subconfluentes se encontraban perfectamente estandarizadas en el laboratorio.

### **3. Ensayo de asociación.**

El primer paso de esta fase consistió en la estandarización de la concentración bacteriana tomando como base para este trabajo el ensayo de asociación estandarizado previamente en el laboratorio, se utilizó la suspensión bacteriana ajustada al tubo No. 3 de McFarland, una

concentración mayor (tubo No. 4), y dos concentraciones menores (tubos 1 y 2), dado que el uso del sistema DIG-anti DIG hace más sensible el ensayo.

Con una concentración de  $3 \times 10^8$  bacterias/mL en un volumen de 200  $\mu$ L/pozo, se logró diferenciar perfectamente el contorno celular y las bacterias adheridas a cada célula, no se observó adherencia inespecífica, es decir, no se observaron bacterias en las porciones del portaobjetos libres de células. (Tabla 2)

La adición de BSA al medio de suspensión no mejoró la visualización al microscopio, observándose igual, al evaluar microscópicamente, los ensayos realizados con y sin BSA.

Dentro de esta fase, fue muy importante determinar en qué parte del proceso debía de realizarse la fijación con formalina al 10%, observándose que fijando después de revelar, existía desprendimiento de la monocapa celular, lo que no sucedió si se fijaba antes del revelado, por lo que se decidió utilizar esta última alternativa.

#### **4. Revelado.**

En primer lugar, tuvo que establecerse la concentración óptima de anticuerpo, probándose tres diluciones. Con la dilución 1:100, se observó que la intensidad de la fluorescencia era baja, y utilizando las diluciones 1:10 y 1:50, la intensidad de la fluorescencia aumentó, lo que nos permitió observar perfectamente a las bacterias adheridas y valorar su asociación. (Tabla 3)

Finalmente, para la tinción de contraste, se utilizó Azul de Evans, valorando la forma en la que era más conveniente agregarlo, probándose esto se probaron tres opciones: agregarlo junto con la bacteria, agregarlo junto con el anticuerpo y agregarlo después del revelado con el anticuerpo.

Con las dos primeras se observó poca intensidad en el contraste, ya que la coloración de las células era muy tenue, al igual que la intensidad de la fluorescencia. Al agregarlo después del

revelado, se observaron las células de color rojo intenso sin que existiera interferencia en la intensidad en la fluorescencia de la bacteria, por lo que se decidió utilizar esta última opción.

Finalmente, se establecieron las condiciones óptimas de marcaje de la bacteria (Diagrama 1) y para el ensayo de asociación (Diagrama 2).

Bajo estas condiciones, se obtuvieron los siguientes resultados para las cepas INN-287 IP, INN-10 SP e INN-57 SP, observándose que para la última cepa casi no existe bacteria adherida, contrastando con lo observado para las otras dos cepas (INN-287 IP e INN-10 SP, invasiva y adherente respectivamente), en las que se observa una mayor cantidad de bacterias adheridas a la superficie celular (Fotografías 1, 2, 3).

**TABLA 1**

**DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS  
DE LAVADO DE *C. jejuni***

rpm	tiempo (min)	Observaciones
3000	5	No hubo formación de pastilla
3000	10	No hubo formación de pastilla
7000	5	Pastilla compacta, fácil resuspensión
7000	10	Pastilla muy compacta
12000	5	Pastilla muy compacta
12000	10	Pastilla muy compacta

**TABLA 2**

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION Y VOLUMEN OPTIMOS DE  
C. jejuni MARCADA PARA EL ENSAYO DE ADHERENCIA**

VOLUMEN ( $\mu$ l)	CONCENTRACION DE BACTERIA (bacterias/ml)			
	$3 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	$9 \times 10^8$	$12 \times 10^8$
50	-	++++	++++	*
100	++	++++	*	*
200	+++	*	*	*

- Muy pocas bacterias adheridas.

++ Pocas bacterias adheridas pero sin tener un patrón de adherencia definido.

+++ Bacterias adheridas con un patrón de adherencia definido, se pueden visualizar las células.

++++ Bacterias adheridas con patrón definido, pero no se visualizan las células, presencia de algunos agregados.

\* Gran cantidad de bacterias adheridas, presencia de grandes agregados que no permiten observar un patrón definido ni visualizar las células.

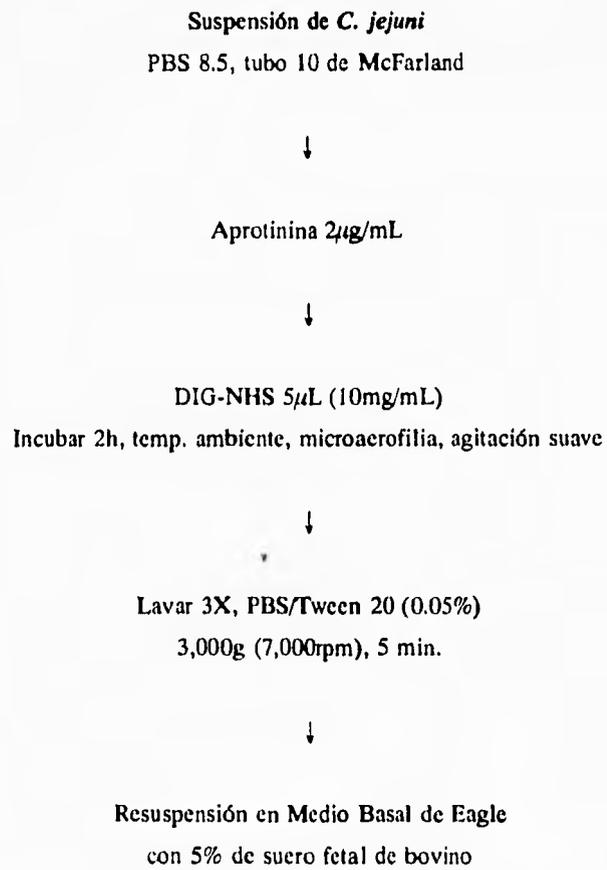
**TABLA 3**

**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA  
DE ANTICUERPO**

<b>Dilución</b>	<b>Observaciones</b>
<b>1:100</b>	<b>Baja intensidad de la fluorescencia. Difícil visualización de la asociación bacteriana</b>
<b>1:50</b>	<b>Buena intensidad de la fluorescencia. Fácil visualización, se observan perfectamente las bacterias adheridas a la célula</b>
<b>1:10</b>	<b>Buena intensidad de la fluorescencia. Fácil visualización, se observan perfectamente las bacterias adheridas a la célula</b>

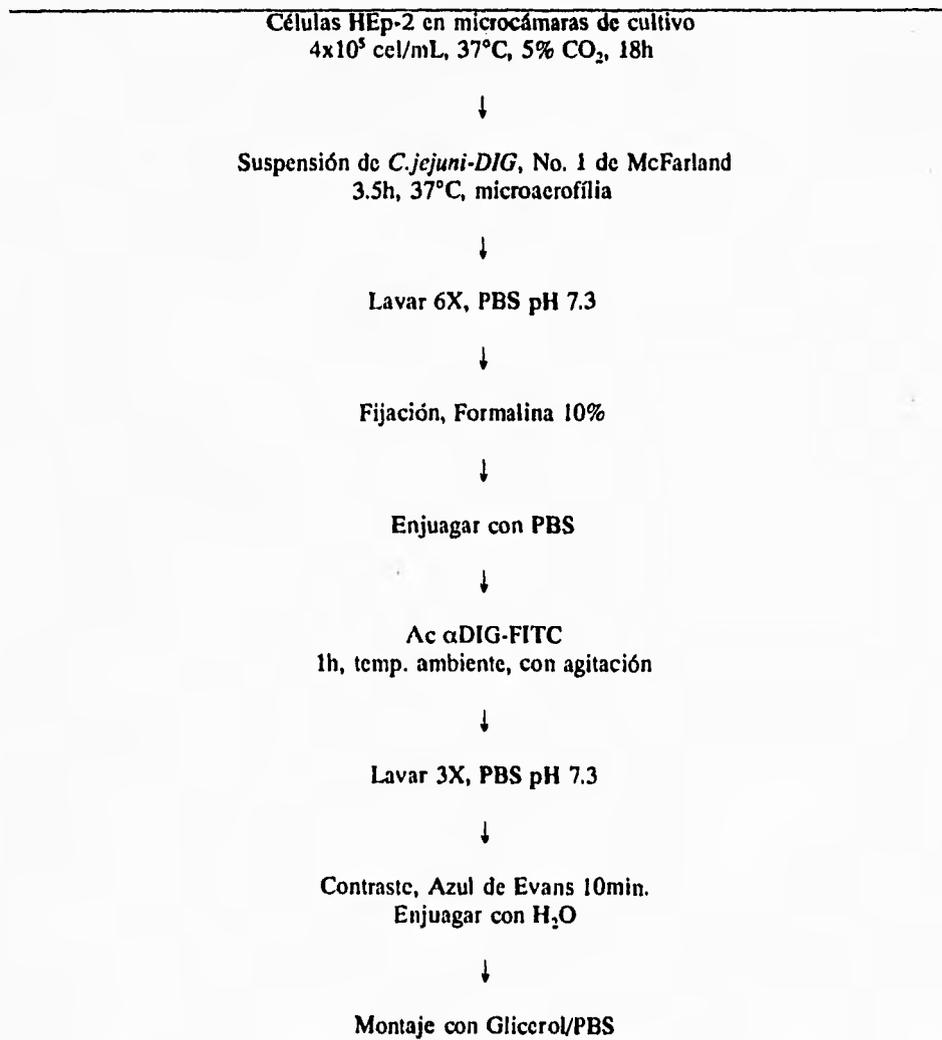
## DIAGRAMA 1

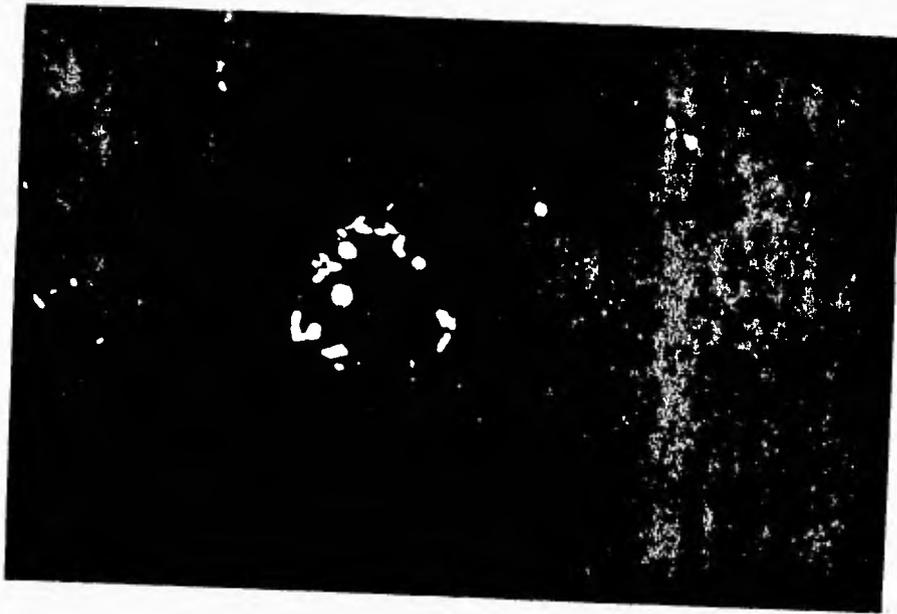
### MARCAJE CON DIG



## DIAGRAMA 2

### ASOCIACION A CELULAS HEp-2





Fotografia 1. Ceba INN-287 IP. Invasiva



**Fotografía 2. Cepa INN-10 SP. Adherente.**



Fotografia 3. Cepa INN-57 SP. No aderente/No invasiva.

## VII. DISCUSION

Actualmente en nuestro país y en general en los países subdesarrollados, la gastroenteritis infecciosa sigue siendo un grave problema de salud que afecta sobre todo, a la población menor de 5 años.

*Campylobacter jejuni* está considerado como el principal agente etiológico de infecciones gastrointestinales, no sólo en nuestro país, sino a nivel mundial (50), por lo que el estudio de los mecanismos por los cuales es capaz de causar daño es muy importante, lo que ha originado el desarrollo de diversas estrategias para realizarlo.

Los sistemas de cultivo celular son los más usados para investigar la interacción entre microorganismos y las células hospederas (28), y a través de éstos se ha demostrado que *C. jejuni* es capaz de adherirse a varias líneas celulares, además de que estudios de microscopía electrónica han confirmado esta cualidad (35,54,58,59).

Gran parte de los estudios que han revelado esta cualidad se llevan a cabo marcando radioactivamente la bacteria y cuantificando la bacteria adherida por centelleo. Este método ha sido muy utilizado pues es específico y sensible (2,14,39,54).

También se han utilizado técnicas de tinción diferencial con colorantes como Giemsa y evaluando la adherencia por observación al microscopio, pero la resolución que se tiene no es muy buena, por lo que su observación puede llegar a ser difícil y cansada, existen otras técnicas que logran un mayor contraste entre las bacterias y las células como la tinción de Warthin-Starry que utiliza plata y facilita la observación; sin embargo, estas técnicas no son tan sensibles como el marcaje radioactivo y pueden presentar algunos problemas como la precipitación del colorante o la plata, lo que dificulta la observación. (61)

Se ha desarrollado una variedad de técnicas de inmunofluorescencia que ofrecen ventajas sobre

los métodos descritos, ya que son más sensibles y específicas que las técnicas de tinción diferencial y menos riesgosos que el marcaje radiactivo. (21,22,28,33)

Por lo anterior, en este trabajo se propuso una técnica de inmunofluorescencia que nos ofrece estas ventajas. En ésta, se marca la bacteria con un compuesto, la Digoxigenina (DIG), que es un esteroide que se encuentra unido a una molécula de ácido aminocaproico y a un éster de succinimida.

Este compuesto se une a las proteínas de la membrana mediante la reacción del grupo amino de las proteínas y la succinimida en condiciones de alcalinidad suave (pH 8.5) de manera covalente, por lo que este tipo de marcaje es muy conveniente ya que nos asegura que la bacteria no perderá la marca durante los ensayos.

La DIG es un compuesto que ultimamente se ha empleado mucho para marcar oligonucleótidos y anticuerpos y puede emplearse para marcar carbohidratos si se acopla a una molécula de hidrociluro de hidrazida.

El hecho de que para revelar la adherencia se utilice un anticuerpo anti DIG, vuelve específica la reacción, además de que se magnifica haciéndola más sensible, y por estar conjugado con fluoresceína, la observación al microscopio se facilita. (7)

Para *C. jejuni* ya se había reportado una técnica de fluorescencia, en la que se marca la bacteria directamente con isotiocianato de fluoresceína; sin embargo, la técnica aquí propuesta es más específica por el uso de anticuerpo y más sensible. (43)

En cuanto a los resultados, se tuvieron que estandarizar varios parámetros.

El primero de ellos fué el marcaje de la bacteria, determinado la concentración de DIG óptima para el marcaje. De los dos volúmenes probados, se decidió utilizar 5  $\mu$ L ya que al observarse

al microscopio no se encontraron diferencias con las bacterias marcadas con 10  $\mu$ L, lo que permitió optimizar la cantidad de DIG utilizada en el ensayo.

En este paso también se estandarizaron las condiciones de centrifugación para lavar la bacteria y eliminar la DIG que no se unió. De las condiciones probadas, se eligió centrifugar a 7,000 rpm durante 5 minutos porque fué en la que se obtuvo una pastilla compacta, eliminándose la DIG libre en el sobrenadante, además de que la resuspensión era rápida y fácil, lo que no sucedió a rpm mayores, en las que la pastilla era demasiado compacta y la resuspensión es muy difícil, ya que se necesita pipetear mucho y en este proceso, se expone durante mucho tiempo a la bacteria con el O<sub>2</sub> atmosférico, lo que puede afectarla además de que puede dañarse por las manipulaciones excesivas. A menores rpm no se lograba la formación de la pastilla, por lo que no se eliminaba la DIG libre.

En la segunda parte del estudio se evaluaron las condiciones óptimas para el ensayo de asociación; éste se llevó a cabo según el método estandarizado previamente en el laboratorio, determinándose únicamente la concentración óptima de bacteria a utilizar, el uso de BSA para evitar uniones inespecíficas y la forma de fijación con formalina al 10%. Originalmente, el método estandarizado utiliza una concentración bacteriana de  $12 \times 10^8$  bacterias/mL (tubo 4 de McFarland) pero como el método propuesto es más sensible, se probaron concentraciones menores.

Con respecto a la determinación de la concentración bacteriana, se decidió utilizar la suspensión ajustada al tubo No. 1 de McFarland, que corresponde a  $3 \times 10^8$  bacterias/mL, ya que permitió observar la morfología celular y a las bacterias adheridas sobre la superficie celular, lo que no sucedió con las otras concentraciones, en las que la cantidad de bacteria era tal, que se formaban agregados bacterianos que impedían la observación de las células y por tanto, la evaluación de la asociación, por lo que el método propuesto es más sensible ya que se redujo la cantidad de bacterias con respecto a la utilizada en la técnica estandarizada previamente.

Cabe hacer notar que, al evaluar si era necesario el uso de BSA para evitar uniones inespecíficas, se encontró que no lo era, ya que sólo se observaron las bacterias adheridas a la superficie celular, lo que indica la especificidad del ensayo.

Es importante remarcar que la fijación del ensayo con formalina, debe realizarse después del ensayo de asociación, ya que en el paso posterior de revelado, existen varios procesos de lavado que provocan que las células se desprendan de la microcámara de cultivo.

El último paso fue el revelado del ensayo de asociación, y fué el más importante ya que, como era un método alternativo a los ya existentes, se tenía que demostrar que era sensible y específico, para lo que se tuvieron que estandarizar las condiciones óptimas para llevarlo a cabo; en este ensayo se utiliza un anticuerpo acoplado a FLUOS, por lo que se estandarizó la concentración de anticuerpo, probándose diluciones de 1:100, 1:50 y 1:10 de la solución patrón; con la primera dilución, la intensidad de la fluorescencia era baja, lo que dificultaba la evaluación de la asociación al microscopio y con las dos últimas, la intensidad de la fluorescencia aumentó. Como no se encontraron diferencias entre estas dos diluciones, se decidió utilizar la dilución mayor, con el fin de utilizar la menor cantidad de anticuerpo posible.

La coloración de contraste permitió tener una muy buena diferenciación entre las células y las bacterias, además de que se pudo apreciar perfectamente la morfología celular y evaluar la asociación de *C. jejuni*.

De las tres diferentes maneras para adicionar el Azul de Evans, se decidió que lo mejor era adicionarlo al final del ensayo, ya que se consigue una buena contrastación, lo que no sucede si se adiciona en cualquier otra fase puesto que se observa una disminución en la cantidad de bacterias adheridas y poca coloración en las células. Esto puede deberse a que el Azul de Evans interfiere de alguna manera con la adherencia de la bacteria.

Al evaluar cada uno de estos parámetros, por observación al microscopio de fluorescencia, se

determinaron las condiciones óptimas de marcaje y se demostró que el método aquí propuesto, es útil en la evaluación de la asociación de *C. jejuni* a la línea celular HEp-2, presentando varias ventajas sobre los métodos de tinción diferencial, ya que es específico porque utiliza un Ac dirigido contra un compuesto, en este caso la DIG, que se ha unido a la superficie bacteriana, y sensible, porque es capaz de detectar menor cantidad de bacteria con respecto a otros métodos como los de tinción diferencial, además de que se facilita su observación al microscopio, pues como el anticuerpo está acoplado a un compuesto fluorescente (FLUOS), se observa a la bacteria en color verde y por el Azul de Evans, las células se observan de color rojo, permitiendo un excelente contraste entre ambas. Otra ventaja muy importante, es que no se emplean compuestos radiactivos, reduciéndose así los riesgos para los usuarios.

En las fotografías de los ensayos de cepas de diferente capacidad de asociación a células HEp-2, puede observarse que para la cepa INN-57 SP, caracterizada como no adherente/no invasiva, la cantidad de bacterias adheridas, con respecto a la observada para las cepas INN-10 SP, adherente, e INN-287 SP, invasiva, es notablemente menor, lo que es lógico, considerando las características de la cepa.

Estos resultados nos indican que el método aquí propuesto, sí es útil para evaluar la capacidad de asociación de diferentes cepas de *C. jejuni*.

Además, esta técnica de marcaje tiene una infinidad de aplicaciones ya que podría utilizarse para marcar cepas de *C. jejuni* con diferentes características y estudiar diferentes aspectos de los mecanismos de patogenicidad de este microorganismo.

## VIII. CONCLUSIONES

-Se estandarizó el marcaje de *Campylobacter jejuni* con Digoxigenina, sin que se afecte la capacidad de adherencia de la bacteria.

-Se estandarizó el proceso de revelado utilizando un anticuerpo anti DIG conjugado con fluoresceína, que torna específico el ensayo, lo que es una ventaja con respecto a los métodos de tinción diferencial.

-El método propuesto es sensible ya que se redujo la concentración de bacterias utilizadas, con respecto a la utilizada en otros ensayos.

-Una ventaja muy importante es que, mediante este método se puede observar la asociación de *C. jejuni* a la línea celular HEP-2 sin el empleo de compuestos radioactivos, lo que reduce el riesgo para el usuario.

## **IX. APENDICE**

### **PREPARACION DE REACTIVOS**

#### **SOLUCION DE EDTA (0.03%)**

EDTA ..... 0.03 g

PBS celular pH 7.2 ..... 100 mL

Esterilizar en autoclave

#### **SOLUCION DE PBS CELULAR (10 mM, pH 7.2)**

NaCl ..... 8.5 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ..... 1.3799 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 1.4196 g

Ajustar pH a 7.2 con NaOH 3M y aforar a 1 L con agua desionizada.

Esterilizar en autoclave y mantener en refrigeración

#### **SOLUCION DE TRIPSINA (1%)**

Tripsina ..... 1 g

PBS celular pH 7.2 ..... 100 mL

Esterilizar con filtro Millipore y mantener en refrigeración

#### **SOLUCION DE EDTA-TRIPSINA (1:40)**

EDTA 0.03% ..... 97.5 mL

Tripsina 1% ..... 2.5 mL

Mantener en refrigeracion

**SOLUCION DE AZUL DE EVANS 1%**

Azul de Evans ..... 1 mg  
H<sub>2</sub>O desionizada ..... 100 mL  
Mantener en refrigeración protegido de la luz

**SOLUCION DE AZUL TRIPANO (0.05%)**

Azul tripano ..... 0.05 g  
PBS celular pH 7.2 ..... 100 mL  
Mantener en refrigeración

**SOLUCION DE BICARBONATO DE SODIO (7.5%)**

NaHCO<sub>3</sub> ..... 7.5 g  
Agua bidestilada ..... 100 mL  
Esterilizar en autoclave

**SOLUCION DE GLICEROL-PBS (1:1)**

Glicerol ..... 10 mL  
PBS celular pH 7.2 ..... 10 mL

**SOLUCION DE HIDROXIDO DE SODIO (3 M)**

NaOH ..... 12 g  
H<sub>2</sub>O cbp ..... 100 mL

**SOLUCION DE PBS-Tween (0.05% Tween, pH 7.2)**

Tween 20 ..... 0.05 mL  
PBS celular pH 7.2 ..... 100 mL  
Mantener en refrigeración

**SOLUCION DE PBS-Tween-BSA (0.05% Tween, 0.2% BSA, pH 7.2)**

BSA ..... 0.2 g  
Tween 20 ..... 0.05 mL  
PBS celular pH 7.2 ..... 100 mL  
Mantener en refrigeración

**DIG/DMSO**

DIG-NHS ..... 1 mg  
DMSO ..... 0.1 mL  
Congelar a -20°C

**APROTIMINA**

Aprotinina ..... 1 mg  
HEPES 0.01M pH 8 ..... 1 mL  
Congelar a -20°C

**FORMALINA**

Formalina ..... 10 mL  
PBS celular pH 7.2 ..... 90 mL

**SOLUCION PATRON DE ANTICUERPO ANTI DIG CONJUGADO CON FITC**

Anticuerpo ..... 200 µg  
Agua redestilada esteril ..... 1 mL  
Alicuotar y guardar a -20°C

**MEDIO BASAL DE EAGLE (BME)**

Disolver un frasco de BME en 950 mL de agua desionizada.  
Ajustar pH de 7.2 con NaHCO<sub>3</sub> al 7.5%  
Agregar 100 unidades de gentamicina

Anadir 50 mL de NCS descomplementado  
Filtrar con filtro Millipore

**GLICEROL/PBS**

Glicerol ..... 5 mL

PBS celular pH 7.2 ..... 5 mL

Guardar a temperatura ambiente.

## X. BIBLIOGRAFIA

1. **Aspinall, G., Fujimoto, S., McDonald, A., Kurjanczyk L., and Penner, J.**  
Lipopolisaccharides from *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barré syndrome. Patients mimic human ganglioside in structure. *Infect Immun.* 62(5):2122-2125 (1994).
2. **Belbouri, A., Megraud, F.**  
Endothelial cells are a target for *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter V.*  
PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON  
Campylobacter INFECTIONS.  
Ruiz-Palacios, G., Calva, E. and Ruiz-Palacios, B.  
Instituto Nacional de la Nutrición. México 1991.  
pp 202.
3. **Black, R.E., Lopez, G., Brown, K.H., Bravo, N., Grados, O., and Creed, H.**  
Incidence and etiology of infantile diarrhea and major routes of transmission in  
Huascar, Peru. *Am J Epidemiol.* 129(4):785-799 (1989).
4. **Blaser, M.**  
*Campylobacter* and related species. MENDELL, DOUGLAS and BENNETT'S:  
PRINCIPLES AND PRACTICE OF INFECTIOUS DISEASES.  
4a. ed.  
Mendell, G., Bennett, J. and Dolin, R.  
Churchill Livingstone 1995.  
pp 1948-56.

5. **Bliska, J., Galán, J., and Falkow, S.** Signal transduction in the mammalian cell during bacterial attachment and entry. *Cell*. 73:903-920 (1993).
6. **Bolton, F.J., Hutchinson, D.N. and Coates D.** Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces. *J Clin Microbiol*. 19: 169-171 (1984).
7. **Boocock, Ch.**  
Double indirect-immunofluorescent labelling of cultured cells. **METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY**. Volume V.  
Pollard, J., Walker J.  
1990. pp 473-85.
8. **Borén, T., Falk, P., Roth, K., Larson, G., and Normark, S.** Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*. 262:1892-1895 (1993).
9. **Boucher, S., Slater, E., Chamberlain, H. and Adams, M.** Production and viability of coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. *J Applied Bacteriol*. 77:303-307 (1994).
10. **Calva, E., Torres, J., Vázquez, M., Angeles, V., de la Vega, H. and Ruiz-Palacios, G.** *Campylobacter jejuni* chromosomal sequences that hybridize to *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* LT enterotoxin genes. *Gene*. 75:243-251 (1989).
11. **Calva, J.** *Campylobacter jejuni*: reflexiones sobre la infección entérica en los niños mexicanos. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 48(7):455-457 (1991).

12. **Calva, J., Ruiz-Palacios, G., Lopez-Vidal, A., Ramos, A. and Bojalil, R.** Cohort study of intestinal infection with campylobacter in mexican children. *Lancet*. March:503-506 (1988).
13. **Cervantes, L.E.** Receptores análogos para *Campylobacter jejuni* en leche materna. Tesis UNAM. 52 p (1993).
14. **Cervantes, L.E., Calva, J. and Ruiz-Palacios, G.**  
Assessment of virulence factors for the definition of pathogenic strains in *Campylobacter* diarrhea. *Campylobacter V. PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON Campylobacter INFECTIONS.*  
Ruiz-Palacios, G., Calva, E. and Ruiz-Palacios, B.  
Instituto Nacional de la Nutrición. México 1991.  
pp 196-8
15. **Cover, T. and Blaser., M.** The pathobiology of *Campylobacter* infections in humans. *Ann Rev Med.* 40:269-85 (1989).
16. **Cover, T., Perez-Perez, G. and Blaser, M.**  
Cytotoxicity of fecal filtrates from *Campylobacter jejuni* infected humans. *Campylobacter V. PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON Campylobacter INFECTIONS.*  
Ruiz-Palacios, G., Calva, E. and Ruiz-Palacios, B.  
Instituto Nacional de la Nutrición. México 1991.  
pp 209.
17. **Cravioto, A., Reyes, R., Trujillo, F., Uribe, F., Navarro, A., de la Roca, J.M., Hernández, J.M., Perez, G. and Vázquez, V.** Risk of diarrhea during the first

year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am J Epidemiol.* 131(5):886-904 (1990).

18. **Daikoku, T., Kawaguchi, M., Takama, K. and Suzuki, S.** Partial purification and characterization of the enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* 58(8):2414-2419 (1990).
19. **De Melo, M. and Pechere, J.C.** Identification of *Campylobacter jejuni* surface proteins that bind to eucaryotic cells in vitro. *Infect Immun.* 58(6):1749-1756 (1990).
20. **Etoh, Y., Dewhirst, F., Paster, B., Yamamoto, A. and Goto, N.** *Campylobacter showae* sp. novo, isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Bacteriol.* 43(4):631-639 (1993).
21. **Falk, P., Borén, T. and Normark S.** Characterization of microbial host receptors. *Met Enzymol.* 236:353-374 (1994).
22. **Falk, P., Roth, K., Borén, T., Westblom, T. and Gordon J.** An in vitro adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90:2035-2039 (1993).
23. **Falkow, S.** Bacterial entry into eucaryotic cells. *Cell* 65:1099-1102 (1991).
24. **Falkow, S., Isberg, R. and Portnoy D.** The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu Rev Cell Biol.* 8:333-63 (1992).
25. **Finlay, B. and Falkow, S.** Common themes in microbial pathogenicity. *Micobiol Rev.* 53(2):210-230 (1989).

26. **Giesendorf, B., van Belkum, A., Koeken, A., Stegeman, H., Henkens, M., van der Plas, J., Goosens, H., Niesters, H. and Quint, W.** Development of species-specific DNA probes for *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari* by polymerasa chain reaction fingerprinting. *J Clin Microbiol.* 31:1531-1536 (1993).
27. **Halet, T. and Formal, S.**  
Virulence mechanisms of enteroinvasive pathogens. VIRULENCE MECHANISMS OF BACTERIAL PATHOGENS.  
Roth J.  
American Society of Microbiology. 1988.  
pp 61-69.
28. **Heesemann, J. and Lauts, R.** Double immunofluorescence microscopic technique for accurate diferentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. *J Clin Microbiol.* 22(2):168-175 (1985).
29. **Herbrink, P., van den Munckhof, H., Bumkens, M., Lindeman, J. and van Dijk, W.** Human serum antibody response in *Campylobacter jejuni* enteritis as measured by enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 7(3):38-393 (1988).
30. **Hoepelman, A. and Tuomanen, E.** Consequences of microbial attachment: Directing host cell functions with adhesins. *Infect Immun.* 60(5): 1729-1733 (1992).
31. **Isberg, R.** Discrimination between intracellular uptake and surface adhesion of bacterial pathogens. *Science.* 252:934-938 (1991).

32. **Karlsson, K.** Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Ann Rev Biochem.* 58:309-350 (1989).
33. **Kepner, R. and Pratt, J.** Use of fluorochromes direct enumeration of total bacteria in environmental samples: Past and Present. *Microbiol Rev.* 58(4):603-615 (1994).
34. **Konkel, M., Babakhani, F. and Joens, L.A.** Invasion-related antigens of *Campylobacter jejuni*. *J Infect Dis.* 162:888-895 (1990).
35. **Konkel, M., Corwin, M., Joens, L.A. and Cieplak, W.** Factors that influence the interaction of *Campylobacter jejuni* with cultured mammalian cells. *Med Microbiol.* 37:30-37 (1992).
36. **Konkel, M. and Joens L.A.** Adhesion to and invasion of HEp-2 cells by *Campylobacter spp.* *Infect Immun.* 57(10):2984-2990 (1989).
37. **Konkel, M., Mead, D., Hayes, S. and Cieplak W.** Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures. *J Infect Dis.* 166:308-315 (1992).
38. **Lee, A., D'Rourke, J., Barrington, P. and Trust, T.** Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infect Immun.* 51(2):536-546 (1986).
39. **Lindblom, G.B., Cervantes, L.E., Sjogren, E., Kaljser, B. and Ruiz-Palacios GM.** Adherence, enterotoxigenicity, invasiveness and serogroups in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from adult humans with acute enterocolitis. *APMIS.* 98:179-184 (1990).

40. **Lior, H., Woodward, D.L., Edgar, J.A., LaRoche, L.J. and Gill, P.** Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J. Clin. Microbiol.* 15:761-768 (1982).
41. **Mahajan, S. and Rodgers, F.G.** Isolation, characterization, and host-cell-binding properties of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol.* 28(6):1314-1320 (1990).
42. **Melamed, A., Zakuth, V., Schwartz, D. and Spirer, Z.** The immune system response to *Campylobacter* infection. *Microbiol Immun.* 32(1):75-82 (1988).
43. **Moran, A., Kosunen, T., Vartio, T. and Kuusela, P.**  
Adherence of *Campylobacter jejuni* to extracellular matrix proteins. *Campylobacter*  
V. PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON  
*Campylobacter* INFECTIONS.  
Ruiz-Palacios, G., Calva, E. and Ruiz-Palacios, B.  
Instituto Nacional de la Nutrición. México 1991.  
pp 190-191.
44. **Morrison, V.A., Lloyd, B.K., Chia, J.K.S. and Tuazon, C.U.** Cardiovascular and bacteremic manifestations of *Campylobacter fetus* infection: Case report and review. *Rev Infect Dis.* 12(3):387-392 (1990).
45. **Pertman, D.M., Ampel, N.M. and Schiffman, R.B.** Persistent *Campylobacter jejuni* infections in patients infected with human immunodeficiency virus. *Ann Intern Med.* 108: 540-545 (1988).
46. **Pei, Z. and Blaser, M.** PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter*

*jejuni*, is a homolog of binding component in Gram-negative nutrient transport systems. J Biol Chem. 268(25):18717-18725 (1993).

47. **Penner, J.L.**  
*Campylobacter, Helicobacter, and related spiral bacteria. MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY.*  
5th ed.  
Balws, Hausler, Herrmann, Isenberg, Shadomy.  
ASM 1991.  
pp 402-409.
48. **Penner, J.L.** The genus *Campylobacter*: a decade of progress. Clin Microbiol Rev. 1(2):157-172 (1988).
49. **Penner, J.L., Hennessy, J.N. and Congl, R.V.** Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. Eur J Clin Microbiol. 2(4):378-383 (1983).
50. **Perez-Perez, G.I.**  
*Campylobacter. DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE INFECCIONES GASTROINTESTINALES.*  
Giono, S., Escobar, A. y Valdespino J.L.  
Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. Secretaria de Salud. 1994.  
pp 281-294.
51. **Perez-Perez, G.I., Hinojosa, A.M. and Bessudo, D.** Isolation of *Campylobacter jejuni* from intestinal contents of chickens in Mexico City. Rev Lat Amer Microbiol. 28:37-38 (1986).

52. **Rasrinaul, L. Suthienkul, O. and Echeverria, P.D.** Foods as a source of enteropathogens causing childhood diarrhea in Thailand. *Am J Trop Med Hyg.* 39:97-102 (1988).
53. **Ruiz-Palacios, G.M.**  
Pathogenesis of *Campylobacter* infection: in vitro models. *Campylobacter INFECTIONS*.  
Nachamkin IM. Tomkins LJ. Blaser M.  
American Society for Microbiology.  
Washington D.C. 1992.  
pp 160-161.
54. **Ruiz-Palacios, G.M., Cervantes, L.E., Newburg D.S., Lopez-Vidal, Y. and Calva, J.J.**  
In vitro models for studying *Campylobacter* infections. *Campylobacter INFECTIONS*.  
Nachamkin IM. Tomkins LJ. Blaser M.  
American Society for Microbiology.  
Washington D.C. 1992.  
pp 176-183.
55. **Ruiz-Palacios, G.M., Frenck R.W. and Pickering, L.K.**  
*Campylobacter* and *Helicobacter*. PRINCIPLES AND PRACTICE OF PEDIATRICS.  
Second Edition.  
Oski, F.  
Lippincott Company. 1994.  
pp 1173-1177.

56. **Ruiz-Palacios, G.M. and Pickering, L.K.**  
*Campylobacter* and *Helicobacter* infections. TEXTBOOK OF PEDIATRIC INFECTIONS.  
 Feigin, R.D. and Cherry, J.C.  
 W.B. Saunders 1992.  
 pp 1072-82.
57. **Ruiz-Palacios, G.M., Torres, J., Torres, N.I., Escamilla, E., Ruiz-Palacios, B.R. and Tamayo, J.** Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Lancet. ii:250-252 (1983).
58. **Russell, R.G., Blake, D.C.** Cell association and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. Infect Immun. 62(9):3773-3779 (1994).
59. **Russell, R.G., O'Donnoghue, M., Blake, D.C., Zulty, J. and DeTolla, L.J.** Early colonic damage and invasion of *Campylobacter jejuni* in experimentally challenged infant *Macaca mulatta*. J Infect Dis. 168:210-215 (1993).
60. **Schoeni, J.L. and Wong, A.C.L.** Inhibition of *Campylobacter jejuni* colonization in chicks by defined competitive exclusion bacteria. Appl Env Microbiol. 60(4):1191-1197 (1994).
61. **Soto-Ramírez, L.E., Cervantes, L.E., López-Vidal, Y. and Ruiz-Palacios, G.M.** Role of outer membrane proteins and lipopolysaccharides on adherence and invasion by *Campylobacter jejuni*. Campylobacter V. PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON Campylobacter INFECTIONS.  
 Ruiz-Palacios, G., Calva, E. and Ruiz-Palacios, B.  
 Instituto Nacional de la Nutrición. México 1991.  
 pp 192-195.

62. Suzuki, S., Kawoguchi, M., Mizuno, K., Takama, K. and Yuki, N. Immunological properties and ganglioside recognition by *Campylobacter jejuni*-enterotoxin and cholera toxin. *FEMS Immun Med Microbiol.* 8:207-212 (1994).
63. Walker, R.I., Caldwell, M.B., Lee, E.C., Guerry, P., Trust, T.J. and Ruiz-Palacios, G.M. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiol Rev.* 50(1):81-94 (1986).
64. Wassenaar, T.M., Bleumink-Pluym, N.M.C., Newell, D.G., Nuijten, P.J. and van der Zeijst, B.A.M. Differential flagellin expression in a *fla A fla B*<sup>+</sup> mutant of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* 62(9):3901-3906 (1994).
65. Wassenaar, T.M., van der Zeijst, Ayling, R. and Newell, D.G. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. *J Gen Microbiol.* 139:1171-1175 (1993).
66. Wegmuller, B., Luthy, J. and Candrian, U. Direct polymerase chain reaction detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and dairy products. *Appl Env Microbiol.* 59:2161-2165 (1993).
67. Wu, S.J., Pacheco, N.D., Oprandy, J.J. and Rollwagen, F.M. Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* antigens with mucosal and systemic antibodies. *Infect Immun.* 59(8):2555-2559 (1991).
68. Yuki, N.Y., Taki, T., Takahashi, M., Saito, K., Tai, T., Miyatake, T. and Handa, S. Penner's serotype 4 of *Campylobacter jejuni* has a lipopolisaccharide that bears a GM1 ganglioside epitope as well as one that bears a GD1a epitope. *Infect Immun.* 62(5):2101-2103 (1994).