

03072

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
FACULTAD DE QUÍMICA



CARACTERIZACION INICIAL DE LA
ENTEROTOXINA DE CAMPYLOBACTER

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. AMELIA DIAZ BARROSO

TUTORES: DRA. YOLANDA LOPEZ-VIDAL
DR. GUILLERMO M. RUIZ-PALACIOS Y SANTOS
DR. EDMUNDO CALVA MERCADO

MEXICO, D. F.
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1997



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.

**ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO
DE INFECTOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

INDICE

| | pág |
|--|-----|
| INDICE DE TABLAS Y FIGURAS | i |
| ABREVIATURAS | iii |
| RESUMEN | iv |
| INTRODUCCIÓN | |
| IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE <i>Campylobacter</i> | 1 |
| MECANISMOS DE PATOGENICIDAD | 2 |
| Adherencia | 2 |
| Invasividad | 4 |
| Regulación de los mecanismos asociados a la expresión de la virulencia .. | 5 |
| Toxinas | 6 |
| <i>Lipopolisacárido</i> | |
| <i>CLDT</i> | |
| <i>Citotoxina</i> | |
| <i>Enterotoxina</i> | |
| Estudios preliminares | 8 |
| HIPÓTESIS | 10 |
| OBJETIVOS | 10 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 11 |
| RESULTADOS | 17 |
| DISCUSIÓN | 26 |
| CONCLUSIONES | 30 |
| BIBLIOGRAFÍA | 31 |

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

| | pág |
|---------|---|
| Fig 1 | Diagrama de flujo que muestra la producción de las proteínas periplasmáticas de la cepa <i>C. jejuni</i> -180-IP 12 |
| Fig 2 | Diagrama de flujo del trabajo realizado en esta tesis 13 |
| Fig 3 | Cromatograma que muestra la filtración de los marcadores de peso molecular a través de una columna de filtración de Biogel A 5M empleada en el presente trabajo 18 |
| Fig 4 | Cromatogramas obtenidos de la filtración en Biogel-A-5M de las proteínas periplasmáticas de <i>C. jejuni</i> 19 |
| Fig 5 | Gel de poliacrilamida-SDS al 15 %, teñido con plata, que muestra las proteínas presentes en algunos picos (B, E y F) obtenidos en el proceso de purificación de la toxina de <i>Campylobacter</i> a partir de las proteínas periplasmáticas (PP) 20 |
| Fig 6 | Gel de poliacrilamida-SDS al 15 %, que muestra las proteínas presentes en las PP concentradas [PP] y las de los picos A, B, C, D, E y F provenientes del proceso de purificación 20 |
| Fig 7 | Fotografías que muestran un cultivo confluyente de células CHO (A), células CHO expuestas a la toxina de cólera (B), a las proteínas periplasmáticas de <i>C. jejuni</i> -180-IP (C) y al pico E obtenido de la filtración en gel de las PP (D) 22 |
| Fig 8A | Titulación de sueros: basal e hiperinmune antitoxina de cólera, contra la toxina de cólera mediante ELISA-G _{M1} 24 |
| Fig 8B | Titulación de sueros: basal e hiperinmune antitoxina de cólera, contra las proteínas periplasmáticas de <i>C. jejuni</i> -180-IP mediante ELISA-G _{M1} 24 |
| Fig 9 | Reactividad de un suero hiperinmune antitoxina de cólera hacia la toxina de cólera (TC), las proteínas periplasmáticas de <i>C. jejuni</i> -180-IP (PP) y contra los picos B, E, y F mediante inmunotransferencia 25 |
| Tabla 1 | Concentración proteica y actividad específica de las fracciones iniciales y finales de la purificación de la enterotoxina de <i>Campylobacter</i> descrita por Calva y colaboradores ¹¹ 8 |

| | pág |
|---------|--|
| Tabla 2 | Concentración proteica y actividad específica de las proteínas periplasmáticas y la fracción biológica de diferentes cepas de <i>Campylobacter</i> por filtración en gel 9 |
| Tabla 3 | Caracterización de los picos obtenidos de la filtración de las proteínas periplasmáticas de <i>C. jejuni</i> INN-180-IP a través de una columna cromatográfica de Biogel-A-5 M (1.5X18 cm) 17 |
| Tabla 4 | Proporción volumen/longitud (mL/cm) del ensayo de asa ligada de rata de las proteínas periplasmáticas de <i>C. jejuni</i> y de los picos E y F 21 |
| Tabla 5 | Evaluación del porcentaje de recuperación de la toxina de <i>Campylobacter</i> purificada por un método cromatográfico 23 |
| Tabla 6 | Cuantificación del efecto neutralizante del suero anti-TC en el alargamiento que tanto la toxina colérica como las proteínas periplasmáticas de <i>C. jejuni</i> INN-180-IP causan en células CHO 25 |

ABREVIATURAS

| | | |
|-----------------------|---|--|
| ADN | = | ácido desoxirribonucleótido |
| AMPc | = | monofosfato de adenosín cíclico |
| CLDT | = | factor de distensión letal |
| CHO | = | células de ovario de hámster chino |
| <i>C. jejuni/coli</i> | = | <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>Campylobacter coli</i> |
| Da | = | daltongs |
| <i>E. coli</i> | = | <i>Escherichia coli</i> |
| ELISA | = | Ensayo inmunoenzimático (del inglés: Enzyme linked immunosorbent assay) |
| GC | = | caldo gonococo |
| G _{MI} | = | galactosil-N-acetilgalactosaminil (sialosil) lactosil cerámico |
| HeLa | = | células de carcinoma de cérvix humano |
| HEp-2 | = | células de carcinoma de laringe humano |
| HPLC | = | Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés: High-Performance Liquid Chromatography") |
| kDa | = | kilodaltongs |
| LPS | = | lipopolisacárido |
| PP | = | proteínas periplasmáticas |
| SDS | = | dodecil sulfato de sodio |
| SSAF | = | solución salina amortiguadora de fosfatos |
| SSI | = | solución salina isotónica |
| SST | = | solución salina de Tris |
| TC | = | toxina de cólera |
| Tris | = | tris (hidroximetil) aminometano |
| U | = | unidades |
| Vero | = | células de riñón de mono verde africano |
| <i>V. cholerae</i> | = | <i>Vibrio cholerae</i> |
| Y-1 | = | células de tumor adrenocortical |

RESUMEN

Campylobacter jejuni/coli (*C. jejuni/coli*) es uno de los principales patógenos entéricos en niños menores de cinco años, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo.

Estudios epidemiológicos aunados a ensayos en líneas celulares han analizado que cepas provenientes de cuadros clínicos, se asocian con la capacidad de *C. jejuni* para provocar una diarrea disenteriforme o una secretora. Es decir, las cepas provenientes de cuadros disenteriformes poseen como mecanismos de patogenicidad la invasión y la producción de una citotoxina; en cambio, las aisladas de diarreas secretoras son adherentes y producen una enterotoxina.

El papel de la enterotoxina en la patogénesis de *Campylobacter* no es claro aún, así que la toxina purificada mediante procesos bioquímicos dará información valiosa acerca de sus características bioquímicas, de su acción a nivel intracelular, y del papel que realmente desempeña en la virulencia de este patógeno. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron: (1) la purificación de la enterotoxina de *C. jejuni* mediante cromatografía de filtración en gel, empleando las proteínas periplasmáticas de la cepa 180-IP, y (2) la caracterización inmunológica de la enterotoxina de *Campylobacter* empleando un suero hiperinmune antitoxina de cólera (anti-TC)

Se obtuvieron las proteínas periplasmáticas (PP) de una cepa hiperproductora de toxina, *C. jejuni*-180-IP, proveniente de un cuadro de diarrea secretora, y se concentraron por ultrafiltración. Las PP se separaron a través de una columna de Biogel-A-5M y se formaron, generalmente, seis picos, denominados de la A a la F. A estos picos se les determinó la cantidad de proteína y carbohidrato; con lo que se observó que sólo el último pico (F) contenía carbohidratos, correspondientes, quizá al lipopolisacárido.

Para observar la pureza de los picos se realizaron gels de poliacrilamida, además estos resultados fueron relacionados con la actividad biológica, la cual se identificó tanto en células CHO como en asa ligada de rata. De esta forma, se reveló que el pico E fue capaz de provocar cambios fisiopatológicos en el asa ligada de rata, de forma comparable a los de la toxina de cólera; que tuvo la mayor actividad biológica en células CHO y que poseía, predominantemente, una banda con peso aproximado de 66 kDa, probablemente involucrada con la enterotoxina de *Campylobacter*.

El rendimiento de la proteína purificada se evaluó mediante la actividad específica definida como la unidad de actividad biológica en mg de proteína que provoca el 50 % del efecto analizado en las células CHO. Esto permitió determinar que el 70% de la toxina proveniente de las PP se recuperó en el pico E.

Se ha reportado la similitud en actividad biológica y antigénica de las toxinas de cólera (TC) y de *Campylobacter*, por lo que se produjo un suero hiperinmune anti-TC en conejos blancos Nueva Zelanda, se realizaron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA- G_{M1} e inmunotransferencia) y ensayos de inhibición de la actividad biológica en células CHO. Los resultados revelaron que el antisuero reconoce específicamente, en todos los experimentos, al antígeno para el cual fue producido (toxina de cólera); en contraste, dicho anticuerpo, no reconoció a la enterotoxina de *Campylobacter* (ELISA- G_{M1}), ni mostró neutralización de la actividad biológica; aunque, en la inmunotransferencia, hubo una leve reactividad. Esto parece indicar que ambas toxinas son estructuralmente diferentes o que, probablemente, su similitud está confinada a ciertas regiones.

El trabajo presentó un avance importante en la purificación de la enterotoxina de *Campylobacter*, y por lo tanto, proporcionará valiosas bases que serán útiles en la investigación en torno a ella.

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE *Campylobacter*

El género *Campylobacter* comprende a un grupo de bacterias pequeñas gram-negativas, microaerofílicas, de forma curva o espiral, que poseen un flagelo polar que les confiere un movimiento característico de sacacorchos. Este género incluye a una gran variedad de especies, las comúnmente patógenas en humanos son: *C. jejuni*, *C. coli* y *C. lari*, también existen patógenas en animales y saprófitas.^{27, 28}

C. jejuni/coli ha sido reconocido como uno de los principales patógenos entéricos en niños menores de cinco años, tanto en países desarrollados^{6, 28, 29} como en países en vías de desarrollo.^{12, 23, 25, 24, 26} En estos últimos, *C. jejuni/coli* ha sido aislado de casos de diarrea secretora, disenteriforme e incluso asintomáticos. En una comunidad suburbana de la Cd. de México se ha observado que en los niños menores a un año las infecciones por este microorganismo, generalmente ocasionan diarrea, aunque la proporción enfermedad/infección decae considerablemente con la edad, de tal forma que a los cinco años la mayoría de los episodios infecciosos son asintomáticos, probablemente debido a una inmunidad natural efectiva después de exposiciones tempranas al microorganismo. La tasa anual de incidencia es de 2.1 por niño/año. La duración media de la diarrea por *Campylobacter* es de 3 días (intervalo de 1 a 29), mientras que su excreción en heces es de 7 días (intervalo de 7 a 26).¹²

Campylobacter también está asociado a enfermedades, como: meningitis,³⁰ sepsis neonatal, artritis séptica y daño hepatocelular;³⁴ así como, a enfermedades autoinmunes, como: síndrome de Guillain-Barré^{27, 43} y artritis.

Entre los factores de riesgo para la campilobacteriosis se encuentran el consumo de aves de corral, carne de puerco y embutidos no bien cocidos y el contacto diario con animales domésticos,^{29, 43} entre otros. Estudios recientes demuestran que las moscas y el agua son reservorios importantes de patógenos como *Campylobacter*, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Shigella* y *Salmonella*, siendo los dos primeros los más frecuentemente aislados.⁴¹

El diagnóstico presuntivo de enteritis por *Campylobacter* puede realizarse por el examen microscópico de las heces, que revelan la presencia de polimorfos nucleares en 80% de los pacientes y una leucocitosis moderada en la mayoría de ellos; la observación por medio del microscopio de contraste de fases demuestra la movilidad y la presencia de organismos en forma de coma, características típicas de *Campylobacter*.²⁰ El diagnóstico definitivo depende del aislamiento del microorganismo, empleando medios selectivos como el de Skirrow, el de Butzler, Campy-Bap, de Preston, virión Butzler,²² de carbono,⁸ entre otros; los que en general requieren

una temperatura a 42°C, antibióticos y una atmósfera microaerofílica proporcionada por una mezcla de gases (O₂ 6%, CO₂ 10%). Como pruebas bioquímicas rápidas se realiza la de catalasa, oxidasa (ambas positivas) e hidrólisis del hipurato (positiva para *C. jejuni* y negativa para *C. coli*), principalmente. También, se han utilizado, métodos indirectos como es la medición de la respuesta inmune a *Campylobacter*, mediante un ensayo inmunoenzimático para cuantificar anticuerpos IgA, IgG e IgM en sueros humanos. En un estudio en el que se analizaron controles sanos, personas enfermas por *Campylobacter spp* y personas expuestas que permanecieron sanas, se midieron los niveles de anticuerpos contra el antígeno de extracción ácida (30 - 63 kDa). El análisis indicó que en las personas con enteritis por *Campylobacter* se elevaron los niveles de IgA, IgG e IgM durante la segunda semana después de la infección y los niveles de IgG e IgM persistieron; mientras que las personas expuestas, pero que no se enfermaron, presentaron títulos más bajos.⁴

La enteritis por *Campylobacter* generalmente es autolimitada, por lo que no es necesaria una terapia antimicrobiana específica; aunque la eritromicina oral, 50 mg/kg/día, dividida en cuatro dosis por siete días erradica al microorganismo del tracto intestinal. No se ha observado que algún tipo de terapia sea efectiva para acortar el período sintomatológico.^{15, 102}

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Se han desarrollado infecciones experimentales en humanos,⁵ y en animales empleando cepas de *Campylobacter* provenientes de cuadros clínicos.^{79, 82} Ruiz-Patacios y cols.⁸² desarrollaron un modelo animal empleando pollos de tres días de edad, a quienes se les indujo diarrea inoculándoles *Campylobacter*; se evaluó por microscopía electrónica y por inmunofluorescencia que este microorganismo se localiza dentro de las células epiteliales y que es fagocitado por células mononucleares de la lámina propia.

Los estudios de cepas provenientes de los cuadros clínicos han indicado que la virulencia de *C. jejuni* se asocia con la capacidad para provocar una diarrea disenteriforme o secretora. Las cepas provenientes de cuadros disenteriformes poseen como mecanismos de patogenicidad la invasión a células epiteliales y la producción de una citotoxina; en cambio, las aisladas de pacientes con diarrea secretora son adherentes y producen una enterotoxina.^{13, 45}

Adherencia

La adhesión de la bacteria a la superficie de la mucosa intestinal es necesaria para la colonización y subsecuente daño celular. Este proceso está mediado por factores quimiotácticos y estructuras bacterianas (adhesinas) como pilis, flagelos, cápsulas, glicocálix, lipopolisacáridos (LPS) y a estructuras de la membrana celular del huésped, como las glicoproteínas. Con respecto

a estas últimas, se ha visto que la fucosa y la manosa inhiben mejor que otros carbohidratos la adherencia de *Campylobacter*.^{19,42} aunque la inhibición completa requirió un pretratamiento, tanto de la bacteria como de las células epiteliales.⁴²

Con la finalidad de identificar estructuras superficiales bacterianas involucradas en los mecanismos de patogenicidad, se han descrito esquemas de serotipificación bacteriana, como el descrito por Mandatori y Penner²⁷ para caracterizar el antígeno termoestable O del lipopolisacárido de *C. jejuni*. Más tarde, Lior y cols.¹ desarrollaron un esquema de serotipificación para identificar factores HL ("heat-labile"; lábiles al calor) de *Campylobacter*, las cuales probablemente sean proteínas del flagelo, aunque también involucra a las proteínas de membrana externa^{7,32} y proteínas de superficie,³³ que sirven de interfase entre el patógeno y la célula huésped.

Logan y Trust³² analizaron electroforéticamente estas proteínas de cepas de *C. jejuni/coli*; los perfiles fueron estables y muy similares entre sí, excepto los de fragmentos de membrana externa que eran liberados durante el crecimiento bacteriano y que contribuyen a la patogénesis, en virtud de que pueden participar en la liberación de toxinas.

La observación de que las proteínas de superficie de diferentes cepas de *C. jejuni* son conservadas, sugiere que pueden ser marcadores útiles para la caracterización inmunológica de los organismos, lo que facilitaría el desarrollo de ensayos serológicos para detectar las infecciones por *C. jejuni* y quizá útiles también para el desarrollo de vacunas.³³

Otros investigadores han mostrado la importancia de las proteínas de membrana externa y del lipopolisacárido (LPS) en la adherencia y la invasividad de cepas de *C. jejuni*, en estudios *in vitro* empleando células HEP-2.³⁴ Mediante técnicas electroforéticas y de inmunotransferencia, en otro estudio, se analizó la estructura del LPS de *Campylobacter*.^{34, 74} Los LPS de todas las cepas examinadas mostraron ser de bajo peso molecular y tener cierta seroespecificidad debidas al polisacárido O. Fue común una alta cantidad de lípido A y una baja cantidad de azúcares neutros.³⁴

Se ha demostrado que el lipopolisacárido participa en la adherencia^{42, 43} por medio de su porción carbohidrato,⁴² ya que la oxidación de estos grupos inhibe significativamente ese evento.⁴⁴

Los factores que afectan la asociación entre la superficie del huésped y del parásito son: a) la tensión de oxígeno y b) la adaptación a la mucosa conferida, por ejemplo, por la movilidad.⁴⁵ En este caso, la movilidad de *Campylobacter* es debida a uno o más flagelos que por su naturaleza proteica y su localización son un importante antígeno de superficie.³² El flagelo participa en la patogénesis de *Campylobacter*, mediando la colonización y la respuesta inmune

protectora.^{87, 88, 101} Además, siendo la flagelina una de las proteínas inmunodominantes expresadas durante la infección intestinal, ha sido importante revelar la estructura de la proteína empleando anticuerpos monoclonales, que han reconocido epítopes de flagelina comunes a la mayoría de las especies de *Campylobacter* y un epítope restringido a *C. jejuni* y *C. coli*.⁸⁸ En cambio, el empleo de anticuerpos policlonales contra el flagelo de la cepa VC74, mediante inmunotransferencia, demostró que algunos determinantes antigénicos son compartidos por otros grupos de bacterias espirales que colonizan la mucosa intestinal.⁸⁹

Por otro lado, un análisis genético indicó que los filamentos flagelares del serogrupo L108 están compuestos por dos proteínas muy relacionadas entre sí, que son codificadas por los genes *flaA* y *flaB*, y que tienen 92% de identidad.⁷

Invasividad

Una vez pasada la barrera gástrica, el patógeno puede alcanzar y colonizar la superficie de la mucosa intestinal; la movilidad dirigida por el estímulo quimiotáctico puede incrementar la efectividad en la colonización de la mucosa.⁹⁰ Más aún, las características clinicopatológicas de la diarrea causada por *Campylobacter* sugieren que este microorganismo puede invadir la mucosa, siendo este mecanismo un importante componente de patogenicidad.^{22, 46} La expresión de la invasividad en cultivos celulares, coinfectados con otras bacterias, mostró una interacción sinérgica entre *C. jejuni* y otros enteropatógenos que facilita la invasión.¹⁰

C. jejuni puede mostrar una translocación a nódulos linfáticos mesentéricos, dando por resultado una bacteremia pasajera en el huésped.⁹⁰ Este fenómeno se ha asociado con la invasividad de las cepas, por lo que, puede ser útil como un marcador de patogenicidad.

El tránsito de *Campylobacter* a través de una monocapa de células polarizadas Caco-2, es decir, células que crecidas *in vitro* poseen una diferenciación de su parte basal y apical; la presentaron el 78% cepas provenientes de colitis y el 47% de las aisladas de cuadros de diarrea no inflamatoria.²² Además, el papel del flagelo en la translocación de *C. jejuni* a través de células epiteliales no polarizadas y polarizadas fue examinado con mutantes flagelares. Las mutantes de *C. jejuni* flageladas no móviles (*flaA flaB* + Mot⁻) y no flageladas no móviles (*flaA flaB* Mot⁻) fueron construidas por recombinación homóloga *in vivo* y por técnica de reemplazo génico. Ambas clases de mutantes se adhirieron a las células epiteliales de origen humano INT 407, aunque sobre la base del porcentaje del inóculo internalizado, la internalización de las mutantes *flaA flaB* Mot⁻ disminuyó comparado con el de las paternas, e incluso con la mutante *flaA flaB* + Mot⁻. Ninguno de los dos tipos de mutantes fue capaz de translocar a través de monocapas de células polarizadas Caco-2. Lo que indica que los flagelos no están involucrados en la adherencia

de *Campylobacter* pero que intervienen en su translocación.³¹

También se ha observado, por microscopía electrónica, que al inocular cepas de *C. jejuni* en asas ligadas de rata, éstas son absorbidas selectivamente y son transportadas a través de las células M de la placa de Peyer,⁹⁹ desde donde la infección puede volverse sistémica. Esto probablemente se debe a que el moco actúa de manera quimioatrayente, por medio de ciertas glicoproteínas que contienen serina y fucosa.¹⁰⁰

Regulación de los mecanismos asociados a la expresión de la virulencia

La presencia de hierro y la adquisición de este elemento por parte del parásito, desempeñan un papel importante en la regulación de los genes de virulencia en los microorganismos.⁷¹ Se ha observado que algunas bacterias patógenas son capaces de expresar proteínas de membrana externa reguladas por hierro, cuando son crecidas *in vivo* o en medios con deficiencia de hierro. En este tipo de medios, *C. jejuni* sintetiza proteínas, principalmente tres, con pesos moleculares aproximados de 74, 76 y 82 kDa. Otra forma de adquirir hierro es usando sideróforos producidos por otros microorganismos.²⁴

Para caracterizar a las proteínas de *C. jejuni* enlazantes de sideróforos se construyó una biblioteca genómica de la cepa NCTC 11351 que permitiera identificar los genes que confieren un fenotipo hemolítico a *Escherichia coli* (*E. coli*). La proteína que lleva a cabo esta actividad en *C. jejuni* tiene un peso molecular de 36,244 Da, con una secuencia líder tipo II de endopeptidasa que se modifica con ácido palmítico, indicando que es una lipoproteína. Su secuencia de aminoácidos es similar a la de las proteínas enlazantes de sideróforos, lo que sugiere que es un componente del sistema de adquisición de hierro de *C. jejuni*.⁷²

Las cepas de *C. jejuni* no han sido consideradas como hemolíticas; sin embargo, recientemente, se encontró que la expresión de α -hemólisis fue dependiente de altas concentraciones de CO₂, en un intervalo de pH de 6.0 a 6.5, a una temperatura de 42°C;⁶⁶ incluso algunas cepas se han reportado como productoras de hemolisinas.⁷⁷

También hay genes responsables del metabolismo de hierro que están coordinados y negativamente regulados para responder a los niveles de hierro en la célula bacteriana. Aunque existen genes de virulencia que no están involucrados en dicho metabolismo y que pueden ser regulados por hierro, por ejemplo puede haber genes reprimidos por la proteína Fur ("ferric uptake regulator") la cual utiliza el ion ferroso como un correpresor que se une a operadores específicos; en general, estos genes *fur* son altamente conservados. En *C. jejuni* ya se ha demostrado una actividad parecida a Fur y además se ha clonado y caracterizado un gen *fur* homólogo al de *E. coli*.¹⁰³

Toxinas

Un importante mecanismo por el cual las bacterias enteropatógenas inducen diarrea es a través de la producción de toxinas, que pueden dañar las membranas o actuar intracelularmente, provocando alteraciones funcionales. En *Campylobacter* se han reconocido principalmente las siguientes toxinas: el lipopolisacárido, un factor de distensión letal (CLDT), una citotoxina y una enterotoxina.

Lipopolisacárido

Por tratarse de un microorganismo gram negativo posee una endotoxina, es decir, un EPS de bajo peso molecular (24 - 48 kDa), que contiene al antígeno O.^{34, 35} El lípido A es la porción tóxica de la molécula, que posee la capacidad de activar el complemento y estimular la liberación de proteínas bioactivas del huésped como citocinas, llegando a provocar el consecuente "shock" y muerte en el individuo.^{36, 38}

CLDT

Un efecto de distensión citoletal probado en diferentes líneas celulares como Vero, HeLa y HEP-2, fue descubierto por Johnson y Lior³⁷ y fue denominado CLDT ("cytolethal distending toxin"). Esta toxina parece ser distinta a la citotoxina y a la enterotoxina porque produce un efecto de distensión celular progresiva y eventualmente citotoxicidad.³⁷ Recientemente fueron clonados los genes *cdtA*, *cdtB* y *cdtC* que codifican proteínas de 30,116, 28,989 y 21,157 Da asociadas con esta toxina;³⁹ sin embargo, no se ha definido su papel en la patogénesis.

Citotoxina

Mediante estudios epidemiológicos se ha demostrado la presencia de una citotoxina, predominantemente en cepas de *C. jejuni/coli* provenientes de cuadros clínicos de diarrea disenteriforme.^{40, 72} Esta toxina fue descrita por primera vez por Johnson y Lior,³⁶ es termolábil, sensible a tripsina, se inactiva a pH 3 o a pH 9, se libera cuando la cepa es sonicada o tratada con polimixina, es letal en huevos fértiles de gallina y provoca efectos tóxicos en células Vero,³⁶ CHO^{30, 33, 36} y HeLa³³ causando redondez. Además, su efecto no se neutraliza con antisueros contra la toxina Shiga^{30, 33} o contra la de *Clostridium difficile*.^{33, 39} Su peso molecular no se ha definido con precisión, algunos autores mencionan que es de 12 a 14 kDa,³³ mientras que otros muestran que es de 70 kDa.⁴¹ Sin embargo, McCardell y cols.⁴¹ afirman que hay dos citotoxinas, una termolábil que se inactiva por antisueros normales de conejo y no causa hemólisis; y otra que también es termolábil, no se inactiva por sueros normales de conejo y provoca hemólisis en

eritrocitos de conejo, aunque la hemolisina puede ser un factor de virulencia inducido. La capacidad de producir la(s) citotoxina(s) se puede perder subcultivando la cepa,⁷² probablemente porque está codificada por plásmidos.

Enterotoxina

Desde 1983 se ha reportado una proteína con un peso molecular que oscila entre 30 a 100 kDa⁸³, termolábil y sensible a pH ácido o básico^{25,83} con actividad de enterotoxina. Ésta ha sido denominada como parecida a la de cólera ("cholera-like") porque al ser probada en líneas celulares posee una actividad biológica similar a la toxina colérica. Es decir, causa alargamiento en células CHO^{24,29,38,83} e incremento moderado del AMPc intracelular,^{17,26,83} y produce redondez en las células adrenales Y-1.^{26,38} *In vivo* provoca una respuesta intraluminal secretora en asa ligada de rata.^{22,43,83,86} Asimismo, se ha identificado una reactividad inmunológica cruzada entre las enterotoxinas de *Vibrio cholerae*,^{14,17,42,29,83} la toxina termolábil de *E. coli*^{26,29,43,44} y la enterotoxina de *Campylobacter*, aunque en algunos casos se ha reportado que el efecto de la enterotoxina de *Campylobacter* en células CHO se neutraliza parcialmente empleando anticuerpos antitoxina de cólera.²⁶ La similitud ha sido encontrada también hibridizando el oligonucleótido CT-LT/B/trp88, que es una región complementaria del gen *toxB* que codifica para la parte de reconocimiento al gangliósido G_{M1}, con cepas provenientes de aislados clínicos de una cohorte de niños mexicanos; encontrándose que este segmento se localiza en el ADN cromosomal de todas las cepas probadas, indicando que todas las cepas poseen el gen para la enterotoxina, pero que en algunas de ellas probablemente está inactivo.¹¹ El hecho de que se haya encontrado que el gen *eltB* no hibridiza con cepas de *Campylobacter*⁸⁰ sino sólo el oligo CT-LT/Btrp88¹ sugiere que las similitudes entre la enterotoxina de *Campylobacter*, la de cólera y la termolábil de *E. coli*, está confinada a regiones específicas, como podría ser al sitio de reconocimiento del receptor.

Existen reportes de laboratorios que no han reproducido estos hallazgos, por lo que dichos investigadores opinan que el papel de la toxina en la patogénesis de *Campylobacter* es cuestionable;^{69,76,87} aunque hay otros que muestran que las cepas provenientes de casos clínicos de diarrea secretora se han asociado más a la producción de la enterotoxina y, además, las cepas toxigénicas de *Campylobacter* no tienen la misma distribución en todos los países.^{26,40,50}

El papel de la enterotoxina en la patogénesis de *Campylobacter* no es claro aún, por lo que la toxina purificada mediante procesos fisicoquímicos nos daría información valiosa acerca de sus características bioquímicas, de su acción a nivel intracelular, y del papel que realmente desempeña en la virulencia de este patógeno. Algunos investigadores han tratado de purificarla probando diferentes medios de cultivo empleando cepas tipo y cepas silvestres, provenientes de cuadros

clínicos diversos, de alimentos y de animales.^{17, 36, 43} Se ha observado que la mayor cantidad de producción de la enterotoxina es a las 24 hs de cultivo^{17, 43} justamente cuando el microorganismo alcanza su fase estacionaria de crecimiento. Por otro lado, McCardell y cols.⁴⁰ describieron el efecto de la concentración de fierro sobre la producción de la toxina en cepas de *C. jejuni/coli*, y de un total de 118 cepas probadas observaron que el 95% produjeron la toxina en medios suplementados con hierro, sugiriendo que la mayoría de las cepas tienen la capacidad de producirla si se utilizan medios adecuados. Además mostraron que para el escrutinio de cepas productoras fue útil emplear caldo Müeller-Hinton o GC, aunque el medio de casaminoácidos complementado con FeCl₂ dio los mejores resultados; en cambio, con el agar brucella y el de casaminoácidos sin complementar se obtuvieron producciones bajas. Por otro lado, cuando al agar brucella se le adicionó sulfato ferroso, éste pareció inhibir la producción de la toxina en muchas cepas. Johnson y Lior,³⁸ sin embargo, opinan que el medio de GC suplementado con isovitalex proporciona resultados inconsistentes.

Estudios preliminares

En nuestros esfuerzos por tratar de purificar la enterotoxina de *Campylobacter* y conociendo que se encuentra predominantemente en el espacio periplásmico, se propuso un método de purificación de la misma que involucraba la producción de las proteínas periplásmáticas, su precipitación selectiva con sulfato de amonio al 70% y la recuperación de proteínas agregadas después de dializar con una solución de fosfatos 1.0 mM.^{3, 11} Este proceso fue evaluado, cuantificando la actividad específica en cada paso de purificación, con tres cepas de *Campylobacter*: *C.jejuni*-180-IP (hipertoxigénica), *C.jejuni*-57-SP (no toxigénica) y *C. coli*-383-IP (toxigénica).

TABLA I Concentración proteica y actividad específica de las fracciones iniciales y finales de la purificación de la enterotoxina de *Campylobacter* descrita anteriormente por Calva y cols.¹¹

| Fracción | <i>C. jejuni</i> -57-SP | | <i>C. jejuni</i> -180-IP | | <i>C. coli</i> -383-IP | |
|----------------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|
| | Conc. µg/mL | * Actividad específica | Conc. µg/mL | Actividad específica | Conc. µg/mL | Actividad específica |
| Proteínas periplásmáticas | 212.0 | ND | 288.5 | 347 | 407.3 | 980 |
| Proteínas agregadas y dializadas | 202.0 | ND | 538.0 | 1488 | 590.5 | 680 |

ND = no detectado

* La actividad específica se expresa en U/mg de proteína, en donde una unidad es la cantidad de proteína que provoca el 50% de efecto en las células CHO

Como se muestra en la Tabla 1, la cantidad de toxina recuperada fue muy baja (en comparación, ver Tabla 2) tanto en la cepa hipertoxigénica como en la toxigénica, por lo que se optó por evaluar otros métodos: el de cromatografía de intercambio iónico empleando un equipo de alta resolución (HPLC), la cromatografía de afinidad con anticuerpos antitoxina de cólera (anti-TC) y la cromatografía de filtración en gel.

El primer método cromatográfico, HPLC, presentó inconvenientes de manipulación y recuperación escasa, lo que hizo difícil monitorear en las fracciones, la actividad biológica. En la cromatografía de afinidad se aprovechó la inmunoreactividad cruzada de la toxina de cólera y la de *Campylobacter*,^{14,17, 42, 59, 83} y se realizó una columna de inmovilización con la que se obtuvieron muestras no evaluables, debido a la poca cantidad de proteína que se logró recuperar. Sin embargo, la filtración en gel de las proteínas periplasmáticas de las tres cepas de *Campylobacter* mostró que todas las cepas poseían la toxina, pero en diferente proporción¹⁹ (Tabla 2).

TABLA 2 Concentración proteica y actividad específica de las proteínas periplasmáticas y la fracción con actividad biológica de diferentes cepas de *Campylobacter* obtenidas por filtración en gel

| Fracción | <i>C. jejuni</i> -37-SP | | <i>C. jejuni</i> -180-IP | | <i>C. coli</i> -383-IP | |
|----------------------------------|-------------------------|--|--------------------------|--|------------------------|--|
| | Conc. µg/mL | Actividad específica U/mg de prot. | Conc. µg/mL | Actividad específica U/mg de prot. | Conc. µg/mL | Actividad específica U/mg de prot. |
| Proteínas periplasmáticas | 150.3 | 667 | 152.8 | 7,640 | 128.0 | 1,562 |
| Fracción con actividad biológica | 18.0 | 5,356 | 1.0 | 100,000 | 5.0 | 20,000 |

HIPÓTESIS

Al analizar los métodos planteados anteriormente para la purificación de la enterotoxina de *Campylobacter* se observa la necesidad de proponer un método alternativo que permita obtenerla pura, o bien, que mejore considerablemente el grado de pureza de la misma. En este sentido, la cromatografía de filtración en gel será útil.

Por otra parte, la presentación clínica de algunos casos de enteritis causados por *C. jejuni/coli* sugiere la importancia de la enterotoxina en su patogénesis, ya que este microorganismo provoca un síndrome diarreico similar al causado por *E. coli* enterotoxigénica y *V. cholerae*, por eso algunos ensayos de actividad biológica, como el empleo de líneas celulares (células CHO) y el de asa ligada de rata utilizados para detectar a la toxina de cólera (TC) y a la termolábil de *E. coli*; serán eficaces para evaluar el proceso seleccionado para la purificación de la toxina en estudio. En cambio, los anticuerpos policlonales anti-TC podrán evidenciar el grado de semejanza estructural entre ambas toxinas.

OBJETIVOS

- Purificación de la enterotoxina de *C. jejuni* mediante cromatografía de filtración en gel, empleando las proteínas periplasmáticas de la cepa INN-180-IP.
- Caracterización inmunológica de la enterotoxina de *Campylobacter*, empleando un suero hiperinmune antitoxina de cólera

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo consistió en realizar la purificación de la enterotoxina de *Campylobacter*, considerando las experiencias previas de nuestro laboratorio en esta línea.

Para analizar la reproducibilidad del método de cromatografía de filtración en gel, este proceso se realizó con la cepa hipertoxigénica en tres ocasiones, modificando algunas de sus condiciones; es decir, el tamaño de la columna, la velocidad de flujo, la cantidad de muestra para purificar, entre otros.

En la purificación de la enterotoxina se seleccionó la cepa hiperproductora, *C. jejuni*-180-IP, proveniente de un cuadro de diarrea secretora; las características fenotípicas de esta cepa son: ser capaz de hidrolizar el hipurato, adherirse e invadir células HEp-2, producir una citotoxina y una enterotoxina.

Se obtuvieron las PP de la cepa hiperproductora y se filtraron a través de una columna de Biogel-A-5, se seleccionaron seis picos (A-F), los que se concentraron por medio de centrífugas y se caracterizaron de la siguiente manera: cuantificación de proteínas y de carbohidratos; electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, según técnica descrita por Laemmli; determinación de la actividad biológica mediante dos ensayos, uno empleando células CHO y otro, en asa ligada de rata.

La semejanza estructural entre la toxina de cólera (TC) y la de *Campylobacter* se puso de manifiesto con un anti-TC y diferentes ensayos como: ELISA- C_{MI} , inmunotransferencia y ensayo de inhibición de la actividad biológica.

Las figuras 1 y 2 muestran la forma general de trabajo para el desarrollo de este tema de tesis

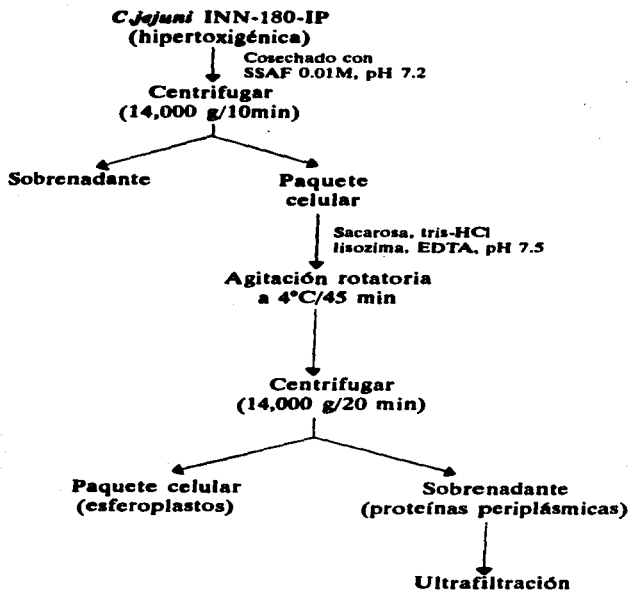


Fig 1 Diagrama de flujo que muestra la producción de las proteínas periplásmicas de la cepa *C. jejuni*-180-IP

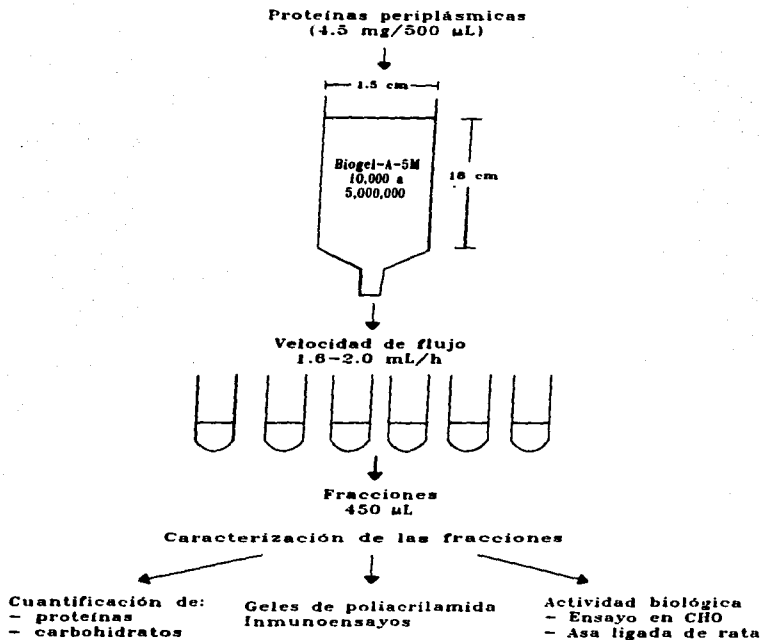


Fig 2 Diagrama de flujo del trabajo realizado en esta tesis

Obtención de las proteínas periplasmáticas (PP) de *Campylobacter jejuni* 100-IP.- La cepa hipertoxigénica de *C. jejuni* se cultivó en 100 placas de gelosa sangre de carnero durante 24 hs en condiciones de microaerofilia. Se cosechó el paquete celular en una solución salina amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.2, centrifugándolo a 15,000 x g durante 10 min. Posteriormente, el paquete celular se resuspendió en 100 mL de una solución amortiguadora de lisis (sacarosa 0.3M, Tris/Cl 0.1M, lisozima 50 µg/mL, EDTA 0.1 mM) y permaneció en ella, con agitación, durante 45 min a 4°C. Se centrifugó a 20,000 x g durante 20 min, obteniéndose en el sedimento los esferoplastos y en el sobrenadante las PP. Las PP se concentraron por ultrafiltración, empleando una membrana con tamaño de poro de 10,000 Da; finalmente se filtraron con membranas de poro de 45 µm para esterilizar y se cuantificaron por el método de Bradford.⁹

Filtración en gel de las proteínas periplasmáticas.- Las PP fueron filtradas a través de una columna cromatográfica de Biogel-A-5m (Bio Rad) de 32 mL (1.5 x 18 cm) con un límite de exclusión de 10,000 a 5,000,000 Da, equilibrada con una solución amortiguadora que contenía Tris/Cl 0.05 M, NaCl 0.2 M, Na₂EDTA 0.001 M, NaN₃ 0.003 M a un pH de 7.5. Las fracciones eluidas con la misma solución amortiguadora fueron colectadas en un volumen aproximado de 450 µL, con una velocidad de flujo de 1.8 mL/h. Esta velocidad de flujo fue establecida empleando estándares de peso molecular (1,350 - 670,000). El cromatograma se obtuvo graficando la absorbancia a 280 nm de cada fracción, contra el volumen de la fracción. Los picos que se presentaron en el cromatograma se concentraron por medio de centricones (Millipore-ultrafree), con un tamaño de poro de 10,000 daltones, y se cuantificaron las proteínas con Micro BCA (Pierce) y los carbohidratos por el método de fenol.¹⁰

Gel de poliacrilamida.- Para caracterizar e identificar el grado de pureza de las fracciones obtenidas, se realizaron gels de poliacrilamida-SDS al 15%, según la técnica descrita por Laemmli,⁴⁷ los cuales fueron teñidos con plata (Pierce).

Actividad biológica.- La actividad biológica fue observada en células CHO y en asa ligada de rata. El ensayo en células CHO, permitió evaluar el proceso de purificación, monitoreando la actividad específica; definida como la cantidad de proteína, en mg, que provocó el 50 % de alargamiento en las células CHO. La técnica utilizada fue la descrita por Guerrant²² y consistió en tratar un cultivo confluyente de células CHO con tripsina al 0.25% (Gibco); las células desprendidas se resuspendieron en 1.5 mL de un medio F-12 con suero fetal bovino al 1%; de esta suspensión se tomaron 0.4 mL y se diluyeron agregando 22 mL del medio anteriormente mencionado, 200 µL de la suspensión celular se colocaron en cada pozo, en una placa de 96 pozos, quedando una concentración final de 500 células/pozo, aproximadamente. Como control

positivo se empleó la toxina de cólera (TC) (List Biological, Inc.) en una concentración de $1\mu\text{g}/\text{mL}$ y se probaron alícuotas de las PP, del preparado periplasmático concentrado y de los diferentes picos obtenidos de la columna de filtración en gel, colocándose $30\mu\text{L}$ de cada muestra por pozo. El efecto provocado por la enterotoxina en las células CHO fue de elongación y se observó de las 24 a las 72 hs.

La actividad biológica también fue evaluada en ensayos de asa ligada de rata, utilizando la metodología previamente descrita por Fedorak²³ con algunas modificaciones, brevemente, se emplearon ratas, hembras o machos, con un peso aproximado de 250 - 300 grs, las cuales estuvieron en ayunas durante 24 hs. antes del proceso. La cirugía se efectuó de la siguiente manera: bajo condiciones generales de asepsia y antisepsia se indujo anestesia empleando pentobarbital sódico (dosis de $1\text{ mL}/2.5\text{ kg}$). A cielo abierto se incidió piel para iniciar laparotomía abdominal media. Se procedió a separar por planos: piel, músculo y peritoneo; se visualizó colon y se identificó y aisló fleon para ligarlo por segmentos de 3 a 8 cm, en total tres segmentos, para lo que se utilizó hilo de seda 3-0. Se inoculó en la primera asa, mediante inyección intraluminal, 1 mL del control positivo (toxina de cólera $5\mu\text{g}/\text{mL}$); en otra asa, el control negativo (1 mL de solución salina isotónica) y en la otra la muestra a probar. Se cerraron los planos en un sólo paso con hilo de seda. Los animales se mantuvieron en ambiente con temperatura controlada. A las 18 hs, los animales fueron sacrificados y se midió el volumen del contenido intestinal de cada asa y su longitud (mL/cm).

Producción de anticuerpos policlonales.- Se produjeron anticuerpos policlonales contra la toxina completa de cólera (List Biological, Inc. Campbell, California, EUA), empleando dos conejos blancos Nueva Zelanda, de tres meses de edad, que fueron retados con la toxina: en el día cero por vía subcutánea 1 mL con una concentración de $100\mu\text{g}/\text{mL}$ y adyuvante completo de Freund, y en los días 11, 21 y 28 por vía intravenosa con $200\mu\text{L}$ de antígeno a una concentración de $50\mu\text{g}/\text{mL}$ y adyuvante incompleto de Freund. Para verificar el avance de la respuesta inmune, antes de cada inmunización se obtuvo el suero de los animales, aproximadamente 0.5 mL . Los anticuerpos policlonales producidos se emplearon en inmunoensayos enzimáticos como ELISA e inmunotransferencia

Inmunoensayos enzimáticos.- El ELISA empleado fue el descrito por Sack y cols²⁹ con algunas modificaciones y consistió en sensibilizar placas de poliestireno con el gangliósido de membrana G_{M1} (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo, EUA) durante toda la noche. Se bloqueó con solución salina amortiguadora de fosfatos ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 0.02M , NaCl 0.13 M , KCl 0.02M) con un pH de 7.2(SSAF) y albúmina al 1%; se lavó una vez con SSAF-Tween al 0.05%. Se agregó la toxina o las PP a una concentración de $5\mu\text{g}/\text{mL}$ y se dejaron incubar durante 1 h. a

37°C. Se lavó 3 veces y se agregó el suero hiperinmune antitoxina de cólera en diferentes diluciones (1:5 hasta 1:15,625) durante 1.5 h a 37°C. Se lavó 3 veces y se dejó incubar con un suero antiimmunoglobulinas de conejo conjugado con peroxidasa (DAKO, Dinamarca), diluido, según especificaciones del fabricante, 1:1000. Se lavó 6 veces y la reacción enzimática se llevó a cabo con una solución amortiguadora de citratos (Ac.cítrico 0.038M, Na₂HPO₄ 0.083M); cada 10 mL contenían 5.4 mg de o-feniléndiamina (Sigma Chemical) y H₂O₂ al 30% (J.T.Baker). La reacción inmunoenzimática se detuvo con H₂SO₄ 4 N.

La inmunotransferencia, según técnica de Towbin,⁹⁵ consistió en transferir un gel de poliacrilamida-SDS al 15% con los diferentes antígenos, a un papel de nitrocelulosa con un sistema de minitransferencia (Bio-Rad) aplicando 100 voltios durante una hora. La solución de transferencia consistió en Tris-base 0.025M, glicina 0.18M, y metanol 200 mL por cada litro de solución. Para bloquear los espacios vacíos se empleó una solución salina de Tris-base (Tris-base 0.02M, NaCl 0.5M) con un pH de 7.5 (SST) y leche descremada al 5% durante 30 min a 37°C con agitación. Se colocó antitoxina de cólera o el suero preinmune, diluidos 1:10 a 1:1,500 y se incubó durante 1.5 h a 37°C. Se realizaron 3 lavados con SST, cada uno de 10 min con agitación y se incubó con el suero antiimmunoglobulinas de conejo (DAKO, Dinamarca) diluido 1:1000 durante toda la noche a 4°C. Se lavó 3 veces con SST-Tween al 0.05% y se reveló con 9 mg de α -naftol (Sigma Chemical) diluido en 3 mL de metanol frío (J.T.Baker), que se mezclaron con 15 mL de SST y 9 μ L de H₂O₂ al 30% (J.T.Baker).

Ensayos de inhibición de la actividad biológica. - Se realizaron ensayos de actividad biológica detectando, primero, la cantidad mínima de toxina (de cólera o de *Campylobacter*) necesaria para provocar el 100 % de efecto en las células CHO. Esta cantidad de toxina se puso en contacto con el suero preinmune o hiperinmune, previamente descomplementarizados, a varias diluciones (1:2 - 1:1,600) durante 2 hs a 37°C. Posteriormente, estas muestras se colocaron en cajas de cultivo de 96 pozos que contenían células CHO, tratadas como se describió anteriormente. Los resultados se evaluaron a las 24, 48 y 72 hs y se consideró el título del suero que fue capaz de reducir el efecto al 50 %.

RESULTADOS

Después de evaluar diferentes procesos de purificación (Tabla 1 y 2), se escogió el de filtración en gel ya que permitió obtener una cantidad adecuada de toxina y su actividad biológica se pudo detectar al final del proceso. Esta actividad fue observada en células CHO y en asa ligada de rata.

Obtención de las proteínas periplasmáticas (PP) de *C. jejuni* 180-IP.- Con el conocimiento previo de que la enterotoxina de *Campylobacter* se encuentra, predominantemente, en el espacio periplasmático,³ se extrajeron las proteínas periplasmáticas de la cepa de *C. jejuni* 180- IP a partir de un cultivo de 100 cajas de sangre de carnero. Se obtuvieron inicialmente 100 mL de PP a una concentración de 1.5 mg/mL, los cuales fueron, posteriormente, concentrados en un volumen de 13 mL a una concentración de 9 mg de proteína por mL.

Filtración en gel de las proteínas periplasmáticas.- Para establecer la velocidad de flujo de la columna cromatográfica, se emplearon estándares de peso molecular (4.5 mg/500 μ L), el cromatograma resultante se observa en la Fig. 3. De manera análoga se filtraron 4.5 mg/500 μ L de las proteínas periplasmáticas de *C. jejuni*; este proceso se realizó tres veces y en los cromatogramas se graficó el volumen de las muestras contra la absorbancia a 280 nm. Algunos de los cromatogramas obtenidos se muestran en la Fig 4.

Se identificaron seis picos en el cromatograma los cuales fueron denominados de la A a la F. Las fracciones correspondientes a estos picos se agruparon, se concentraron y se les determinó la cantidad de proteínas y carbohidratos, éste último con la finalidad de identificar las fracciones que posean el lipopolisacárido (Tabla 3). También se realizaron ensayos de actividad biológica y electroforesis en geles de poliacrilamida para definir los patrones de proteínas de los picos que presentaron efecto biológico.

TABLA 3
Caracterización de los picos obtenidos de la filtración de las proteínas periplasmáticas de *C. jejuni* INN-180-IP a través de una columna cromatográfica de Biogel A 5M (1.5 x 18 cm)

| Muestra | Fracción volumen en mL del medio de elución | concentración proteica (μ g/mL) | concentración de carbohidratos (μ g/mL) |
|---------|---|---|---|
| PP | | 1500 | |
| [PP] | | 9000 | 6700 |
| Picos | | | |
| A | 0.45 - 4.95 | nd | nd |
| B | 13.50 - 15.30 | nd | nd |
| C | 15.75 - 18.00 | 145 | nd |
| D | 18.45 - 20.70 | nd | nd |
| E | 23.40 - 25.10 | 140 | nd |
| F | 26.65 - 40.00 | 1023 | 3370 |

[PP] = Proteínas periplasmáticas concentradas;

nd = no detectado

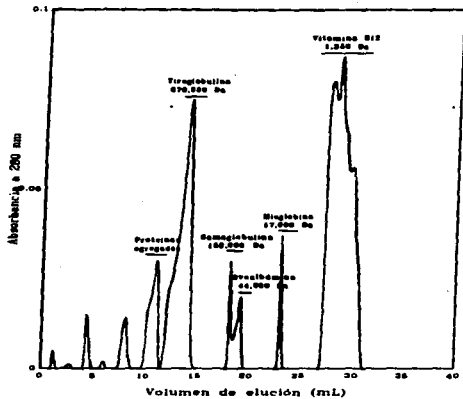


Fig 3. Cromatograma que muestra la filtración de los marcadores de peso molecular a través de la columna de Biogel A 5M empleada en el presente trabajo.

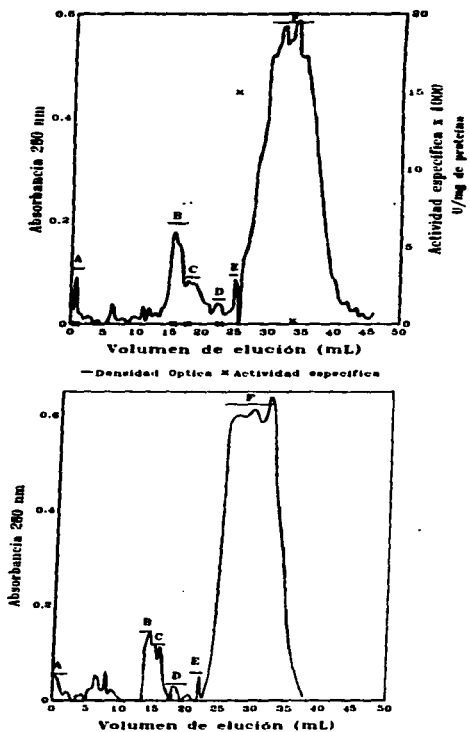


Fig 4 Cromatogramas de la filtración en Biogel-A-5M de las proteínas periplasmáticas de *C. jejuni*

Gel de poliacrilamida.- Los gels de poliacrilamida-SDS al 15 % (Fig 5 y 6), teñidos con plata, mostraron la reproducibilidad del proceso de obtención de las fracciones purificadas así como la presencia de bandas proteicas; el pico B muestra, bandas de pesos moleculares aproximados de 40 a 66 kDa; en el pico E una banda predominante de 66 kDa y en el pico F de 6.5 a 70 kDa, aunque estuvieron en mayor cantidad las de bajo peso molecular. De acuerdo con los ensayos de actividad biológica (Fig. 4, primer cromatograma y Tabla 4), ésta está relacionada, principalmente, con una proteína de peso molecular aproximado de 66 kDa presente en el pico E.

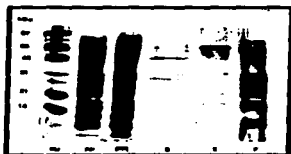


Fig 5 Gel de poliacrilamida-SDS al 15%, teñido con plata, que muestra los marcadores de peso molecular (PM) y las proteínas presentes en algunos picos (B, E y F) obtenidos en el proceso de purificación de la enzima de Comptosia de Comptosia a partir de las proteínas periplasmáticas (PP)

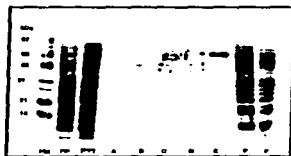


Fig 6 Gel de poliacrilamida-SDS al 15%, que muestra los marcadores de peso molecular (PM) y las proteínas presentes en las PP concentradas (PP) y las de los picos A, B, C, D, E y F provenientes del proceso de purificación (ver figura 4)

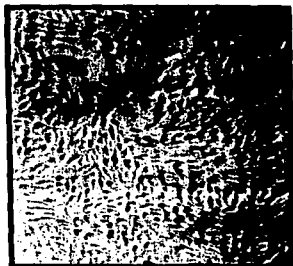
Actividad biológica.- La actividad biológica fue analizada en células CHO y en asa ligada de rata. En los fibroblastos se observó elongación como el efecto resultante de la toxina, aunque éste es un poco diferente al provocado por la toxina de cólera. La toxina de *Campylobacter* generalmente se manifestó a las 72 hs. y se presentó como un alargamiento sólo en los extremos celulares. En cambio, con la toxina de cólera el alargamiento se manifiesta en toda la célula formando verdaderos "hilos" y las células parecen no estar distribuidas al azar, sino como si se alinearan (Fig 7)

En el ensayo de asa ligada de rata, la acumulación de agua y electrolitos en la luz intestinal fue característica de las fracciones que tuvieron una cantidad de toxina detectable en el ensayo con células CHO, aunque las proteínas periplasmáticas también provocaron la presencia de hemoglobina en el fluido. Se cuantificaron resultados tomando en cuenta el volumen por centímetro del asa (Tabla 4)

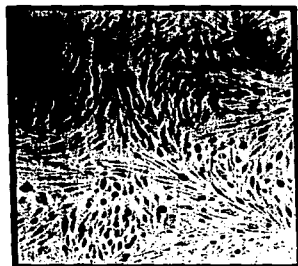
TABLA 4 Proporción volumen/longitud (mL/cm) del ensayo de asa ligada de rata de las proteínas periplasmáticas de *C. jejuni* y de los picos E y F

| Muestra | Proteína (μ g) | mL/cm |
|---------------------------|---------------------|-----------------|
| Toxina de cólera | 5 | 0.29 \pm 0.06 |
| Solución salina | 0 | 0.00 \pm 0.01 |
| Proteínas periplasmáticas | 900 - 1800 | 0.20 \pm 0.05 |
| Pico E | 10 - 28 | 0.21 \pm 0.04 |
| Pico F | 18 - 20 | 0.01 |

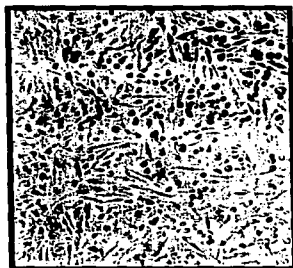
Estos resultados son la media de tres experimentos



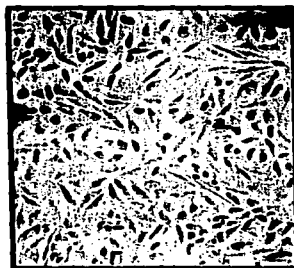
(A)



(B)



(C)



(D)

Fig 7 Fotografías que muestran un cultivo confluyente de células CHO (A), células CHO expuestas a la toxina de cólera (B), a las proteínas periplasmáticas de *C. jejuni*-180-IP (C) y al pico E obtenido de la filtración en gel de las PP (D)

Para cuantificar el rendimiento de purificación de la toxina, se evaluó la actividad específica, definida como la cantidad de proteína, en mg. que provoca alargamiento en el 50 % de las células CHO. Por lo tanto, la actividad específica es la manera de cuantificar las unidades de actividad biológica por miligramo de proteína. De esta manera se determinó la actividad específica de la muestra que entró a la columna y de la toxina recuperada en la (s) fracciones correspondientes. En el pico E se obtuvo el 70% de la toxina total aplicada a la columna cromatográfica. (Tabla 5)

TABLA 5 Evaluación del porcentaje de recuperación de la toxina de *Campylobacter* purificada por un método cromatográfico

| Muestra | Vol. mL | Proteína $\mu\text{g/mL}$ | Proteína total (μg) | Actividad específica (U/mg de prot.) | Total de unidades de actividad | Recuperación % | grado de purificación |
|----------|---------|---------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------|
| PP | 0.5 | 9,000 | 4,500 | 1,000 | 4,500 | 100 | 1 X |
| [Pico E] | 1.5 | 140 | 210 | 15,000 | 3,150 | 70 | 15 X |
| [Pico F] | 4.0 | 1,023 | 4,092 | 190 | 777 | 17 | 0.2 X |

[] = Muestras concentradas

Con el objeto de evaluar la homología, tanto en actividad biológica como antigénica, de las toxinas de cólera y de *Campylobacter*, se produjo un suero hiperinmune contra la toxina de cólera en conejos blancos Nueva Zelanda y se realizaron ensayos inmunoenzimáticos y ensayos de inhibición de actividad biológica en células CHO.

Ensayos inmunoenzimáticos.- Los ensayos inmunoenzimáticos consistieron en inmovilizar las PP en papel de nitrocelulosa (inmunotransferencia), o bien, en inmovilizar el gangliósido de membrana G_{M1} en placas de poliestireno. Mediante la técnica de ELISA- G_{M1} se tituló el antisuero contra la toxina de cólera (antígeno homólogo), siendo éste de 1:10,000 (Fig 8A); mientras que el título del mismo antisuero contra la toxina de *Campylobacter* (antígeno heterólogo) fue de tan solo 1:120, similar éste al del suero preinmune (Fig 8B). Por otra parte, utilizando la técnica de inmunotransferencia se analizó la reactividad del suero de conejo anti-cólera contra las PP y TC, ambas en su forma desnaturalizada. Los anticuerpos, con un título de 1:1000, reconocieron en la toxina de cólera una banda de, aproximadamente, 25 kDa y una de 13 kDa, correspondientes a la subunidad A y al monómero de la subunidad B, respectivamente. En cambio en las PP reconoció muy débilmente bandas de 66, 44, 35 y 24.3 kDa, con un título de 1:10 (Fig 8).

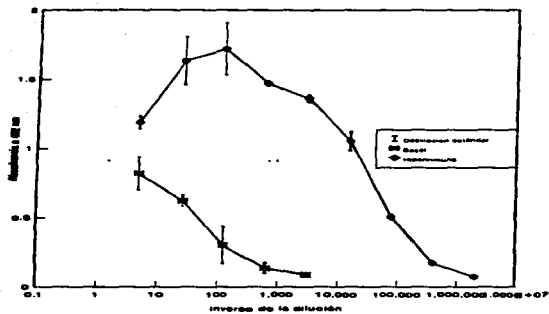


Fig 5A Titulación de los sueros: basal e hiperinmune anti-toxina de cólera, contra la toxina de cólera mediante ELISA-GM.

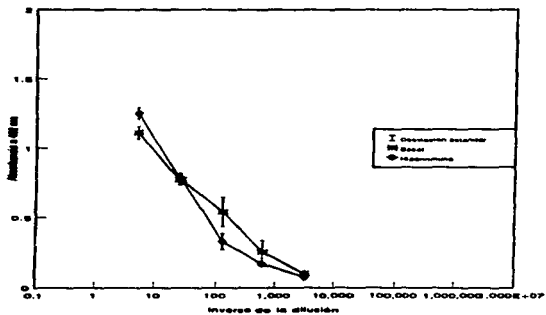


Fig 6B Titulación de los sueros: basal e hiperinmune anti-toxina de cólera, contra las proteínas periplásmicas de *C. jejuni* 180-IP mediante ELISA-GM.

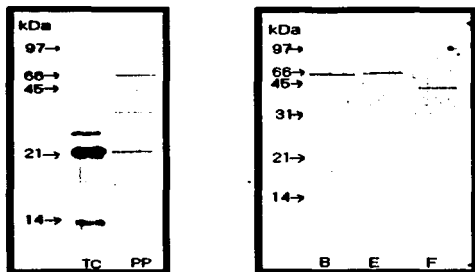


Fig 9 Reactividad de un suero hiperinmune antitoxina de cólera hacia la toxina de cólera (TC), las proteínas periplasmáticas de *C. jejuni*-180-1P (PP) y contra los picos B, E y F mediante inmunotransferencia

Ensayos de inhibición de la actividad biológica.- Se realizaron ensayos celulares para determinar la cantidad de anticuerpo que era capaz de inhibir el efecto citotónico de la toxina. El suero hiperinmune neutralizó el 50 % del efecto de la toxina de cólera, en un título de 1:300; en cambio, el título del suero para neutralizar el efecto del crudo toxigénico de *C. jejuni* fue de 1:4, y de manera análoga resultó el del suero preinmune, siendo la diferencia, entre ambos sueros, sólo cualitativa

Tabla 6 Cuantificación del efecto neutralizante del suero anti-TC en el alargamiento que tanto la toxina colérica como las proteínas periplasmáticas de *C. jejuni* INN-180-1P causan en células CHO

| Toxina | 100 % de efecto cantidad en μ g | Dilución del anti-TC que redujo el efecto al 50% |
|--|--|---|
| Cólera | 0.003 | 1:300 |
| Proteínas periplasmáticas de <i>C. jejuni</i> | 67.500 | 1:4 |

DISCUSIÓN

Campylobacter jejuni/coli es reconocido como uno de los principales agentes causantes de diarrea en la población infantil y uno de sus mecanismos de virulencia es la capacidad de producir una enterotoxina cuya relevancia epidemiológica se ha demostrado en trabajos previos.^{22, 45, 50, 51, 52}

En la presente tesis se trabajó un método de purificación y caracterización de la enterotoxina, la cromatografía de filtración en gel, y se observó que una proteína de, aproximadamente, 66 kDa parece estar involucrada en la actividad biológica. Por otro lado, varios investigadores han analizado diferentes compartimientos de *Campylobacter* para detectar a la (s) proteína (s) con actividad tóxica, así se han empleado: el sobrenadante de las células bacterianas;^{14, 16, 17, 29, 36, 60, 76} las proteínas periplásmicas, es decir, el sobrenadante de las células tratadas con lizosima o polimixina^{43, 45} o aquellas tratadas con sonicación.^{17, 97} Después de obtener un extracto se ha optado por diversos métodos de purificación, como son: precipitación selectiva con sulfato de amonio y diálisis,^{3, 11, 17, 43} filtración, ultrafiltración, cromatografía de filtración en gel,¹⁷ cromatografía de afinidad empleando galactosa y de inmunofinidad con anticuerpos anti-TC⁴² o la combinación de ellos, aunque, Mahajan y cols.²⁶ demostraron el efecto tóxico de una proteína electrocluida de un gel sin SDS. Incluso se han probado diferentes medios complementados, ya sea: con aminoácidos,⁴³ o con FeCl₃,⁶⁰ o con isovitalax,^{43, 83} para sobre producir la toxina.

Como se mencionó existen muchos reportes acerca de la purificación parcial de la toxina de *Campylobacter*, que es similar a cólera; o bien, reportes de su hallazgo y su correlación en la patogénesis. Sin embargo, no en todos ellos se han obtenido las mismas conclusiones, por lo que, en base a la experiencia previa en nuestro laboratorio y a los hallazgos obtenidos por otros investigadores, se propuso purificar la toxina, a partir de una cepa hiperproductora *C. jejuni*-180-IP crecida en agar sangre de carnero, que por contener Fe²⁺ incrementa su producción.⁶⁰ De esta manera, se recuperó la toxina a partir de las proteínas del espacio periplásmico, porque ahí se encontró en mayor cantidad.^{3, 43} Posteriormente fue separada del extracto, de acuerdo a su peso molecular, mediante cromatografía de filtración en gel, en este caso empleamos Biogel-A-5M (Fig. 2) y según se observa en la Tabla 5, en el pico E se recuperó la mayor parte de la toxina (70%). En contraste, Daikoku y cols.¹⁷ emplearon un filtrado libre de células, que concentraron por ultrafiltración y después precipitaron con sulfato de amonio al 80% pasándolo, finalmente, por una columna de Sephadex G-100 (85 X 2.5 cm) con una velocidad de flujo de 30 mL/h y fracciones de 1.5 mL, siendo la recuperación del 51%. Es decir, con la metodología empleada en nuestro trabajo se obtuvo a la toxina con un grado de pureza mayor, y los geles mostrados en las Figs. 5 y 6 apoyan esto. Sin embargo, es importante notar que en ambos estudios existe una

proteína de aprox. 66 kDa involucrada con la enterotoxina.

Además, esos mismos autores, mostraron un cromatograma, tomando en cuenta la absorbancia a 280 nm y a 415 nm, ésta última lectura obtenida al realizar un ensayo de ELISA con el receptor de membrana G_{M1} y un anticuerpo de cabra anti-TC, para detectar a la toxina de *Campylobacter*, además, se evaluó con este mismo criterio la cantidad de toxina recuperada en el proceso. Quizá esta cuantificación no fue la más adecuada porque la inmunorreactividad cruzada entre la toxina de cólera y de *Campylobacter* es nula, según se puede observar, en la curva de titulación del anti-TC producido en el presente trabajo, en un ensayo similar, contra las proteínas periplasmáticas de *C. jejuni* (Fig 8B); sin embargo, en la inmunotransferencia (Fig 9), se observa una reactividad débil, presente, no sólo, en el pico E (con actividad biológica) sino también en el pico B, probablemente porque algo de la toxina comienza a salir en ese pico, pero su actividad no se detectó por la baja concentración en la que está presente. También el ensayo de inhibición de la actividad biológica empleando el suero anti-TC, confirma que ambas toxinas tienen poca similitud estructural. Aunque, habrá que considerar que este análisis depende del anticuerpo policlonal empleado en los ensayos, en nuestro caso, el suero hiperinmune producido reconoció epítopos conformacionales de la toxina de cólera, ya que ésta se presentó intacta en el ELISA y en el ensayo de actividad biológica en células CHO, en donde fue capaz de inhibir su efecto; pero también reconoció epítopos lineales, porque la proteína fue sometida a condiciones desnaturalizantes (calor, β -mercaptoetanol y SDS) en los geles de poliacrilamida que sirvieron de base para los ensayos de inmunotransferencia. Otro tipo de anticuerpos, por ejemplo, un anti-subunidad B de la toxina de cólera que sólo reconoce epítopos conformacionales, cercanos al sitio de reconocimiento de la toxina con el receptor, ha podido mostrar que la reactividad contra la proteína de 66 kDa, recuperada en el pico E, es mejor que la presentada por el anti-TC.²⁰ Todo esto apoya la hipótesis de que la similitud estructural entre ambas toxinas se confina sólo a sitios específicos.¹¹ Además, Klipstein y cols.⁴⁴ han analizado el extracto crudo toxigénico de *Campylobacter* y su relación con la toxina termolábil de *E. coli* (LT) y la de *Vibrio cholerae*, afirmando que la similitud de la toxina de *Campylobacter* y la LT es de un 65 % mientras que con la de cólera es de un 48 %, así que sería importante realizar estos ensayos también con un anti-LT.

La actividad biológica de una toxina puede evaluarse tanto en ensayos *in vitro*, empleando cultivos celulares, como en ensayos *in vivo*. En el primero, se puede analizar en forma adecuada los cambios intracelulares que acarrear modificaciones microscópicas en la célula, por ejemplo: redondez, elongación, lisis, distensión, etc.; o bien, cuantificando concentraciones de metabolitos intracelulares (AMPc, Ca^{+2}) que promuevan las alteraciones microscópicas y que permitan explicar o sugerir el mecanismo bioquímico causado por una toxina. Sin embargo, en ensayos *in vivo*, se

aprecia la fisiopatología provocada por la toxina, porque en ellos se logra la participación de tejidos, células y compuestos químicos; por ejemplo, en ensayos que emplean segmentos intestinales de animales de laboratorio, se pueden observar mediante microscopio, el comportamiento de las células epiteliales, si manifiestan algún daño morfológico, si existe la colaboración de células sanguíneas, de las del sistema inmune, si existe liberación de algunos mediadores bioquímicos, principalmente. De ahí la importancia de realizar el análisis del efecto biológico, de la toxina en cuestión, mediante ensayos con líneas celulares, como las células CHO y en ensayos *in vivo* como el de asa ligada de rata.

En este trabajo de tesis empleamos ensayos de actividad biológica similares a los que se han descrito para otras toxinas con las que se ha asociado la enterotoxina de *Campylobacter*, y que, particularmente, fueron útiles para monitorear el proceso de purificación y evaluar su rendimiento. Por lo que, considero importante mencionar el proceso patofisiológico provocado por la toxina de cólera, el cual ha sido estudiado ampliamente y podría ser útil para realizar algunas analogías con los hallazgos obtenidos durante esta trabajo.

La toxina de cólera está compuesta por una subunidad A (A1 y A2) y una subunidad B, esta última es homopentamérica. La reacción bioquímica causada por esta toxina es la activación de la adenilato ciclasa, mediante la ADP-ribosilación de la subunidad alfa-s, la cual junto con las subunidades beta y gamma forman a la proteína Gs. La reacción de ADP-ribosilaciones catalizada por la región A1 de la toxina usando un dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) como sustrato. En esta condición alterada la subunidad alfa-s estimula la actividad de la adenilato ciclasa y provoca un incremento del AMPc que a su vez estimula la apertura de canales iónicos, como los de cloro. El efecto fisiológico a nivel del intestino causado por la TC y que provoca el incremento de AMPc, se observa diferente en las células de la vellosidad comparándolo con el de las células de la cripta. En las primeras, hay una disminución en la absorción de Na^+ (y de Cl^- acoplado neutralmente), mientras que las células de la cripta experimentan un aumento en la excreción de Cl^- . En el proceso global, el incremento de AMPc activa la secreción de Cl^- y la inhibición de la absorción de sodio, por lo que el agua fluye pasivamente a la luz intestinal y este fluido isotónico, libre de proteínas, es rico en Na^+ , K^+ , Cl^- y CO_2 ⁻². Además existen evidencias de que la TC causa la liberación de 5-hidroxitriptamina (serotonina), la cual estimula, entre otras cosas, la formación de prostaglandina E_2 que contribuye al flujo en el intestino delgado.⁹²

Ahora bien, en este trabajo empleamos células CHO, en las cuales observamos que el efecto de alargamiento que se manifiesta en la célula expuesta a la toxina de *C. jejuni* es parecido al provocado por la toxina colérica (Fig 7B y 7D), debido a los cambios morfológicos que se aprecian en el citoesqueleto, aunque no provoca la formación de "hilos alineados", sino células, en general, de mayor tamaño y alargadas solamente en los extremos. En otros trabajos, incluso

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

se ha reportado que la toxina de *C. jejuni* causa el incremento de AMPc en líneas celulares.^{17, 83} aunque, probablemente este incremento no provoca la misma cascada de eventos con ambas toxinas.

En el ensayo de asa ligada de rata fue curioso notar que el efecto del extracto crudo toxigénico (proteínas periplasmáticas) de *C. jejuni*, provocó la presencia de células sanguíneas en el fluido intraluminal, quizá, debido a la participación de otros componentes como el lipopolisacárido, detectado éste por la presencia de carbohidrato (Tabla 3); o bien, por el efecto sinérgico con otras proteínas que tienen actividad tóxica. En contraste, con el pico E sólo se observó la presencia de fluido no sanguinolento en el lumen intestinal; mientras que con la toxina de cólera el fluido se acompañó de moco, probablemente, porque se administró la toxina en una concentración de 5 µg/mL mientras la reportada en otros artículos²³ es de 4 µg/mL. Otro estudio también ha mencionado las alteraciones en la actividad mioeléctrica así como los cambios morfológicos, en el intestino de conejos, expuestos al sobrenadante filtrado de un cultivo de *C. jejuni*.⁹¹

Finalmente, este trabajo mostró un avance importante en el proceso de purificación de la proteína, y por lo tanto, será de gran utilidad para investigar el papel relevante de la enterotoxina de *Campylobacter* en la virulencia del microorganismo. De esta manera algunas de las perspectivas que se proponen, será el contar con otras herramientas, como: anticuerpos policlonales y monoclonales que nos permitan, p.ej. analizar la estructura conformacional de la proteína, plantear métodos de detección de la toxina en cepas silvestres, provenientes de cuadros clínicos; o bien, que ayuden a estudiar detalladamente el proceso bioquímico en el que participa la toxina.

CONCLUSIONES

- 1.- El método de cromatografía de filtración en gel, es adecuado para la purificación parcial de la enterotoxina de *Campylobacter*.
- 2.- La enterotoxina de *Campylobacter* está presente predominantemente en el pico E, que se caracterizó por poseer la actividad biológica más elevada en células CHO (15.000) y en asa ligada de rata (0.21 ± 0.04)
- 3.- La proteína involucrada con la enterotoxina posee un peso molecular de 66 kDa.
- 4.- La similitud antigénica con la toxina de cólera empleando un suero hiperinmune anti-TC, es baja, según lo observado en los ensayos inmunoenzimáticos: ELISA- G_{M1} e inmunotransferencia, y en la inhibición de la actividad biológica en células CHO.
- 5.- El efecto provocado por la toxina de *Campylobacter* en células CHO, es similar pero no idéntico al causado por la toxina colérica, sin embargo, en el ensayo de asa ligada de rata el efecto de ambas toxinas fue semejante.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Alm, R.A., Guerry, F., Power, M.E., Llor, H., Trust, T.J. 1991. Analysis of the role of flagella in the heat-labile Lior serotyping scheme of thermophilic campylobacters by mutant allele exchange. *J.Clin. Microbiol.* 29:2438-2445.
- 2.- Alm, R.A., Gerry, F., Trust, T.J. 1993. Distribution and polymorphism of the flagellin genes from isolates of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J.Bact.* 175:3051-3057.
- 3.- Angeles, V. 1986. Obtención y caracterización de la enterotoxina de *Campylobacter jejuni*. Tesis de licenciatura realizada en el Instituto Salvador Nacional de la Nutrición Campylobacter Zubirán
- 4.- Bag, P.K., Ramamurthy, T., Nair, U.V. 1993. Evidence for the presence of a receptor for the cytotoxin distending toxin (CLDT) of *Campylobacter jejuni* on CHO and HeLa cell membranes and development of a receptor based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of CLDT. *FEMS Microbiol. Lett.* 114:283-292.
- 5.- Black, R.E., Levine, M.M., Clements, M.L., Hughes, T.P., Blaser, M.J. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.* 157:472-479.
- 6.- Blaser, M.J., Reller, L.A. 1981. *Campylobacter* enteritis. *New Eng. J. Med.* 309:1444-1452
- 7.- Blaser, M.J., Hopkins, J.A., Berka, R.M., Vasil, M.L., Wang, W.L. 1983. Identification and characterization of *Campylobacter jejuni* outer membrane proteins.
- 8.- Blaser, M.J., Duncan, D.J. 1984. Human serum antibody response to *Campylobacter jejuni* infection as measured in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 44:292-298.
- 9.- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- 10.- Bukholm, G., Kapperud, G. 1987. Expression of *Campylobacter jejuni* invasiveness on cell cultures coinfecting with other bacteria. *Infect. Immun.* 55:2816-2821
- 11.- Calva, E., Torres, J., Vázquez, M., Angeles, V., de la Vega, H., Ruiz-Palacios, G.M. 1989. *Campylobacter jejuni* chromosomal sequences that hybridize to *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* LT enterotoxin genes. *Gene* 75:243-251.
- 12.- Calva, J.J., Ruiz-Palacios, G.M., López-Vidal, A.B., Ramos, A., Bojalil, R. 1988. Cohort study of intestinal infection with *Campylobacter* in Mexican children. *Lancet* 1:503-506.
- 13.- Cervantes, L.E., Calva, J.J., Ruiz-Palacios G.M. 1991. Assessment of virulence factors for definition of pathogenic strains in *Campylobacter* diarrhea. 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, pp 196-8
- 14.- Collins, S., O'Loughlin, E., O'Rourke, J., Li, Z., Lee, A., Howden, M. 1992. A cytotoxic, cholera toxin-like protein produced by *Campylobacter jejuni*. *Comp Biochem Physiol* 103B:299-303.
- 15.- Cornick, N.A., Gorbach, S.L. 1988. *Campylobacter*. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2:643

- 16.- Daikoku, T., Suzuki, S., Oka, S., Takama, K. 1989. Profiles of enterotoxin and cytotoxin production in *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. FEMS Microbiol. lett. 58:33-36.
- 17.- Daikoku, T., Kawaguchi, M., Takama, K., Suzuki, S. 1990. Partial purification and characterization of the enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 58:2414-2419.
- 18.- Daniel, T.M., Mianki, A. 1976. Carbohydrate analysis of concanavalin A-reactive and concanavalin A-non reactive mycobacterial polysaccharides. Am. Rev. Respir. Dis. 113:705-6
- 19.- Diaz-Barruso, A., López-Vidal Y., Cervantes, L.E., Ruiz-Palacios, G.M. 1994. Partial purification and immunological characterization of *Campylobacter* toxin. American Society for Microbiology, D.C. May 1995
- 20.- Diaz-Barruso, A., Jasso, S.M., Ruiz-Palacios, G.M. 1995. Immunological relatedness between *Cholera* toxin and *Campylobacter* toxin. Mexican Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Mérida. Yucatan Mexico. Nov.
- 21.- Everest, P.H., Goossens, H., Butzler, J-P., Lloyd, D., Knutton, S., Ketley, J.M., Williams, P.H. 1992. Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. J. Med. Microbiol. 37:319-325.
- 22.- Everest, P.H., Goossens, H., Sibbons, P., Lloyd, D.R., Knutton, S., Lecce, R., Ketley, J.M., Williams, P.H. 1993. Pathological changes in the rabbit ileal loop model caused by *Campylobacter jejuni* from human colitis. J. Med. Microbiol. 38:316-321.
- 23.- Fedoruk, R.N., Kosake, A., Douglas, F., Chang, E.B. 1989. Inhibition of cholera-toxin-stimulated intestinal secretion by CGS 9343B in rats: a specific calmodulin inhibitor. J. Pediatr. Gastroenterol Nutr. 8:252-258.
- 24.- Field, L.H., Headley, V.L., Payne, S.M., Berry, L.J. 1986. Influence of iron on growth, morphology, outer membrane protein composition, and synthesis of siderophores in *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 54:126-132.
- 25.- Figueroa, G., Galeano, H., Tromcoso, M., Toledo, S., Soto, V. 1989. Prospective study of *Campylobacter jejuni* infection in Chilean infants evaluated by culture and serology. J. Clin. Microbiol. 27:1040-1044.
- 26.- Florin, I., Antillon, F. 1992. Production of enterotoxin and cytotoxin in *Campylobacter jejuni* strains isolated in Costa Rica. J. Med. Microbiol. 37:22-29.
- 27.- Fujimoto, S., Yuki, N., Itoh, T., Amako, K. 1992. Specific serotype of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barré Syndrome. J. Infect. Dis. 168:183.
- 28.- Goossens, H., De Boek, M., Butzler, J.P. 1983. A new selective medium for the isolation of *Campylobacter jejuni* from human heces. Eur. J. Clin. Microbiol. 2:389-394
- 29.- Goossens, H., Butzler, J-P., Takeda, Y. 1985. Demonstration of cholera-like enterotoxin production by *Campylobacter jejuni*. FEMS Microbiol. Lett. 29:73-76.
- 30.- Goossens, H., Rummens, E., Cadranel, S. 1985. Cytotoxic activity chinese hamster cells in culture filtrates of *Campylobacter jejuni/coli*. Lancet ii:511
- 31.- Grant, C.C.R., Konkel, M.E., Cieplak, W.Jr., Tompkins, L.S. 1993. Role of flagella in

- adherence, internalization and translocation of *Campylobacter jejuni* in nonpolarized and polarized epithelial cell cultures. *Infect. Immun.* 61:1764-1771.
- 32.- Guerrant, R.L., Brunton, L.L., Schnaitman, T.C., Rebbun, L.I., Gilman, A.G. 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive *in vitro* assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 10:320-327.
 - 33.- Guerrant, R.L., Wanke, C.A., Fennie, R.A., Barrat, L.J., Lima, A.A.M., O'Brien, A.D. 1987. Production of unique cytotoxin by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 55:2526-2530.
 - 34.- Humphrey, K.S. 1993. *Campylobacter* infection and hepatocellular injury. *Lancet* 341:49.
 - 35.- Johnson, W.M., Lior, H. 1984. Toxins produced by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Lancet* 1: 229-230
 - 36.- Johnson, W.M., Lior, H. 1986. Cytotoxic and cytotoxic factors produced by *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lariidis*. *J. Clin. Microbiol.* 24:275-281.
 - 37.- Johnson, W.M., Lior, H. 1988. A new heat-labile cytotoxal distending toxin (CLDT) produce by *Campylobacter* spp. *Microbiol. Pathog.* 4:115-126
 - 38.- Karmali, M.A., Fenner, J.L., Fleming, P.C., Williams, A., Hennessy, J.N. 1983. The serotype and biotype distribution of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* over a three-year period. *J. Infect. Dis.* 147:243-246.
 - 39.- Kapperud, G., Skjerve, E., Bean, N.H., Ostroff, S.M., Lassen, J. 1992. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections: results of a case-control study in southeastern Norway. *J. Clin. Microbiol.* 30:3117-3121.
 - 40.- Khamil, K., Lindblom, G.B., Mazhar, K., Sjrogen, E., Køljaer, B. 1993. Frequency and serogenicity of *Campylobacter jejuni* and *C.coli* in domestic animals in Pakistan as compared to Sweden. *J. Trop. Med. Hyg.* 96:35-40
 - 41.- Khamil, K., Lindblom G.B., Mazhar, K., Køljaer, B. 1994. Feces and water as reservoirs for bacterial enteropathogens in urban and rural areas in and around Lahore, Pakistan. *Epidemiol. Infect.* 113:433-444
 - 42.- Klipstein, F.A., Engert, R.F. 1984. Purification of *Campylobacter jejuni* enterotoxin. *Lancet* 1:1123-1124.
 - 43.- Klipstein, F.A., Engert, R.F. 1984. Properties of crude *Campylobacter jejuni* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* 45:314-319
 - 44.- Klipstein, F.A., Engert, R.F. 1985. Immunologic relationship of the B subunits of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Infect. Immun.* 48:629-633.
 - 45.- Klipstein, F.A., Engert, R.F., Short, H., Schenk, E.A. 1985. Pathogenic properties of *Campylobacter jejuni*: assay and correlation with clinical manifestations. *Infect. Immun.* 50:43-49.
 - 46.- Koskel, M., Joens, L.A. 1989. Adhesion and invasion to HEP-2 cells by *Campylobacter* spp. *Infect. Immun.* 57:2984-2990.
 - 47.- Laemmli, J.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature* 227:680-683.
- 48.- Lee, A., O'Rourke, J., Phillips, M.B., Barrington, P. 1983. *Campylobacter jejuni* as a mucosa associated organism: an ecological study. In: Pearson, A.D., Skirrow, M.B., Rowe, B., et al., eds. *Campylobacter II*. London: Public Health Laboratory Service p. 110
 - 49.- Lee, A., Logan, S.M., Trust, T.J. 1987. Demonstration of a flagellar antigen shared by a diverse group of spiral-shaped bacteria that colonize intestinal mucus. *Infect. Immun.* 55:828-831.
 - 50.- Lindblom, G.-B., Johny, M., Khalil, K., Maszar, K., Ruiz-Palacios, G.M., Kaijser, B. 1990. Enterotoxigenicity and frequency of *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. laridis* in human and animal stool isolates from different countries. *FEMS Microbiol. Lett.* 66:163-168.
 - 51.- Lindblom, G.-B., Cervantes, L.-E., Sjogren, E., Kaijser, B., Ruiz-Palacios, G.M. 1990. Adherence, enterotoxigenicity, invasiveness and serogroups in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from adult humans with acute enterocolitis. *APMIS* 98:179-184.
 - 52.- Logan, S.M., Trust, T.J. 1982. Outer membrane characteristics of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 38:898-906.
 - 53.- Logan, S.M., Trust, T.J. 1983. Molecular identification of surface protein antigens of *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 42:675-682.
 - 54.- Logan, S.M., Trust, T.J. 1984. Structural and antigenic heterogeneity of lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infect. Immun.* 43:210-216.
 - 55.- Mahajan, S., Rodgers, F.G. 1989. Virulence of *Campylobacter jejuni* for chicken embryos. *J. Clin. Microbiol.* 27:1377-1379.
 - 56.- Mahajan, S., Rodgers, F. 1990. Isolation, characterization, and host-cell binding properties of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 28:1314-1320.
 - 57.- Mandatori, R., Funes, J.L. 1989. Structural and antigenic properties of *Campylobacter coli* lipopolysaccharides. *Infect. Immun.* 57:3506-11
 - 58.- Nass-Fach, D., Calva, J.J., Ruiz-Palacios G.M., Lopez-Vidal Y. 1991. Serum immune response to *Campylobacter jejuni* infection in young children. *Microbiol Ecol. Health Dis.* 4:511
 - 59.- McCordell, B.A., Madden, J.M. 1984. Production of cholera-like toxin by *Campylobacter jejuni/coli*. *Lancet* i:448-449
 - 60.- McCordell, B.A., Madden, J.M., Stanfield, J.T. 1986. Effect of iron concentration on toxin production in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Can. J. Microbiol.* 32:395-401.
 - 61.- McCordell, B.A., Madden, J.M., Stanfield, J.T. 1986. Production of cytotoxins by *Campylobacter*. *Lancet* i:1031
 - 62.- McSwiggan, E., Walker, R.I. 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infect. Immun.* 53:141-148
 - 63.- Medina, S., Guerrero, M.L., Calva, J.J., Ortega, H., Pickering, L.K., Ruiz-Palacios, G.M. 1995. Risk factors associated with *Campylobacter* repeated infections. Mexican Society for Infectious Diseases and Clinical Microbiology. Merida, Yucatán Mexico. Nov

- 64.- Misawa, N., Hirayama, K., Itoh, K., Takahashi, E. 1995. Detection of alpha- and beta-hemolytic-like activity from *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 33:729-731.
- 65.- Mishu, B., Hysan, A.A., Koski, C.L., Vriesendorp, F., Cook, S.D., Mithen, F.A., Blaser, M.J. 1993. Serologic evidence of previous *Campylobacter jejuni* infection in patients with the Guillain-Barré syndrome. Annals of Internal Medicine 118:947-953.
- 66.- Nachamkin, I., Hart, A.M. 1986. Common and specific epitopes of *Campylobacter* flagellin recognized by monoclonal antibodies. Infect. Immun. 53:438-440.
- 67.- Nachamkin, I., Yang, X-H. 1992. Local immune responses to the *Campylobacter* flagellin in acute *Campylobacter* gastrointestinal infection. J. Clin. Microbiol. 30:509-511.
- 68.- Newell, D.G., McBride, H., Dolby, J.M. 1985. Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines. J. Hyg. Camb. 95:217-227.
- 69.- Olsvik, O., Wachsmuth, K., Morris, G., Feeley, J.C. 1984. Genetic probing of *Campylobacter jejuni* for cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Lancet i:449.
- 70.- O'Sullivan, A.M., Doré, C.J., Boyle, S., Cold, C.R., Johnson, A.P. 1988. The effect of *Campylobacter* lipopolysaccharide on fetal development in the mouse. J. Med. Microbiol. 26:101-105.
- 71.- Otto, B.R., Verweij-van Vught, A.M., MacLaren, D.M. 1992. Transferrins and hemo-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. Critical Reviews in Microbiology 18:217-233.
- 72.- Fung, T., Wong, P.Y., Pathacharny, S.D., Sibatang, K., Chang, K. 1987. *In vitro* and *in vivo* studies of a cytotoxin from *Campylobacter jejuni*. J. Med. Microbiol. 23:193-198.
- 73.- Park, S.F., Richardson, P.T. 1995. Molecular characterization of a *Campylobacter jejuni* lipoprotein with homology to periplasmic siderophore-binding proteins. J. Bacteriol. 177:2259-2264.
- 74.- Perez-Perez, G.I., Hopkins, J.A., Blaser, M.J. 1985. Antigenic heterogeneity of lipopolysaccharides from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter fetus*. Infect. Immun. 48:528-533.
- 75.- Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J. 1985. Lipopolysaccharide characteristics of pathogenic *Campylobacters*. Infect. Immun. 47:353-359.
- 76.- Perez-Perez, G.I., Cohn, D.L., Guerrant, R.L., Patton, C.M., Reller, L.B., Blaser, M.J. 1989. Clinical and immunological significance of cholera-like toxin and cytotoxin production by *Campylobacter* species in patients with acute inflammatory diarrhea in the USA. J. Infect. Dis. 160:460-468.
- 77.- Pickett, C.L., Auffenberg, T., Pesci, E.C., Sheen, V.L., Jusuf, S.S.D. 1992. Iron acquisition and hemolysin production by *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. 60:3872-3877.
- 78.- Pickett, C.L., Pesci, E.C., Cottle, D.L., Russell, G., Erdem, A.N., Zeytin, H. 1996. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. Infect. Immun. 64:2070-2078

- 79.- Prescott, J.F., Barker, I.K., Mannion, I.K., Minietta, O.P. 1981. *Campylobacter jejuni* colitis in gnotobiotic dogs. *Can. J. Comp. Med.* 49:377-383.
- 80.- Rietschel, E.T., Brade, H. 1992. Bacterial endotoxins. *Scientific American* Aug pp. 26-33.
- 81.- Rollwagen, F.M., Pacheco, N.D., Clements, J.D., Pavlovskis, O., Rollins, D.M., Walker, R.I. 1993. Killed *Campylobacter* elicits immune response and protection when administered with an oral adjuvant. *Vaccine* 11:1316-1320.
- 82.- Ruiz-Palacios, G.M., Escamilla, E., Torres, N. 1981. Experimental *Campylobacter* diarrhea in chickens. *Infect. Immun.* 34:250-255.
- 83.- Ruiz-Palacios, G.M., Torres, J., Torres, N.I., Escamilla, E., Ruiz-Palacios, B., Tamayo, J. 1983. Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. *Lancet* ii:250-253.
- 84.- Ruiz-Palacios, G.M., Lopez-Vidal, Y., Lopez-Vidal, A.B., Torres, J., Rubio, S. 1983. Systemic and local immune response in experimental campylobacter infection. Rollwagen, F.M., Caldwell, M.B., Stewart, S.D. T-cell responses to *Campylobacter jejuni* in rabbits. In ed by Pearson AD, Skirrow MB, Rowe B, Davis JR, Jones DM. (Eds) *Campylobacter II*. Public Health Laboratory Service London.
- 85.- Ruiz-Palacios, G.M., Lopez-Vidal, Y., Torres, J., Torres, N. 1985. Serum antibodies to heat-labile enterotoxin of *Campylobacter jejuni*. *J. Infect. Dis.* 152:413-416.
- 86.- Saha, S.K., Singh, N.P., Senyal, S.C. 1988. Enterotoxigenicity of chicken isolates of *Campylobacter jejuni* in ligated ileal loops of rats. *J. Med. Microbiol.* 26:87-91.
- 87.- Seshbert, R.M. 1978. The genus *Campylobacter*. *Ann Rev Microbiol.* 32:673-709.
- 88.- Soto-Ramirez, L.E., Cervantes, L.E., Lopez-Vidal, Y., Ruiz-Palacios, G.M. 1991. Role of outer membrane proteins and lipopolysaccharides 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, pp 192-5.
- 89.- Sack, D.A., Huda, S., Neogi, P.K.B., Daniel R.R., Spiro, W.M. 1980. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxin. *J. Clin. Microbiol.* 11:35-40.
- 90.- Szale, E.S.M., Titus, A.E. 1982. Rapid diagnosis of *Campylobacter* enteritis. *Ann. Intern. Med.* 96:62.
- 91.- Selmsky, C.A., Rumphal, R., Gaskins, D.J., Goldberg, D.A., Mathias, J.R. 1985. Alterations of myoelectric activity associated with *Campylobacter jejuni* and its cell-free filtrate in the small intestine of rabbits. *Gastroenterol.* 89:337-344.
- 92.- Spangler, B.D. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* 56:622-647.
- 93.- Suarez-Holl, G.J., Flores-Abuxapqui, J.J., Heredia-Navatrette, M., Puc-Franco, M.A., Franco-Monsreal, J. 1993. Prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños con diarrea aguda con sangre. *Bol. Med. Hosp. Infan. Mex.* 50:151-156.
- 94.- Taylor, D.N., Echeverria, P., Pitarangsi, C., Seriwatana, J., Bothidatta, L., Blaser, M.J.

1988. Influence of strain characteristics and immunity on the epidemiology of *Campylobacter* infections in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 26:863-868.
- 95.- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4353.
- 96.- Varavakha, W., Vathasopha, K., Boonkitdetta, L., Panyaratshandha, P., Sangchai, R., Athipanyakom, S., Wasi, C., Echeverria, P. 1990. Importance of Salmotellae and *Campylobacter jejuni* in the etiology of diarrheal disease among children less than 5 years of age in a community in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 28:2507-2510.
- 97.- Wedstrom, T., Baloda, S.B., Krovacek, K., Faria, A., Bengtson, S., Walden, M. 1983. Swedish isolates of *Campylobacter jejuni/coli* do not produce cytotoxic or cytotoxic enterotoxins. *Lancet* ii:911
- 98.- Walker, R.I., Caldwell, M.B., Lee, E.C., Guerry, F., Trust, T.J., Ruiz-Palacios, G.M. 1986. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiol. Rev.* 50:81-94.
- 99.- Walker, R.I., Schmauder-Chok, E.A., Parker, J.L., Burr, D. 1988. Selective association and transport of *Campylobacter jejuni* through M-cells of rabbit peyer's patches. *Can. J. Microbiol.* 34:1142-7
- 100.- Wallis, M.R. 1994. The pathogenesis of *Campylobacter jejuni*. *British Journal of Biomedical Science* 51:57-64
- 101.- Weanans, W.M., Choi, J., Louis, T.J., Goudreau, C., Lior, H., Newell, D.G., Pearson, A.D., Taylor, D.E. 1985. Antigenic analysis of *Campylobacter* flagellar protein and other proteins. *J. Clin. Microbiol.* 21:108-112.
- 102.- Williams, M.D., Schlorring, J., Barret, L.J. et al. 1989. Early treatments of *Campylobacter jejuni* enteritis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:248
- 103.- Woodbridge, K.G., Williams, P.H., Ketley, J.M. 1994. Iron-responsive genetic regulation in *Campylobacter jejuni*: cloning and characterization of *fur* homolog. *J. Bacter.* 176:5852-5856.