

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

**"PURIFICACION DE TRES ANTIGENOS DE ALTO
PESO MOLECULAR DE CAMPYLOBACTER
JEJUNI, CON POTENCIAL DE SER UTILIZADOS
COMO VACUNA"**

INFORME DE TESIS

PRESENTADA POR

MAGDA TERESA CATALINA FLORES LOPEZ

PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, octubre de 1997.



06
T(1811)
C.4

JUNTA DIRECTIVA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANO	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
SECRETARIO	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
VOCAL I	Lic. Miguel Angel Herrera Galvez
VOCAL II	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
VOCAL III	Lic. Rodrigo Herrera San José
VOCAL IV	Br. Herbet Raúl Arévalo Alvarado
VOCAL V:	Br. Manola Anleu Fortuny

DEDICO ESTA TESIS A

A mi Patria Guatemala
A mis centros de estudio:
Asilo Santa María
Escuela Virgen Poderosa
Instituto Normal, Casa Central
Universidad de San Carlos de Guatemala

Agradecimiento.

Gracias Señor-Dios Todopoderoso por brindarme el don de la vida y permitirme la oportunidad de recibir este título.

Gracias Madre Virgen María por tu divina protección en todo momento.

Gracias a mis padres Rafael Flores y Magda de Flores y a mis hermanos Rafael Emilio, José Francisco y César Alfredo por su amor, múltiples esfuerzos, apoyo y orientación en todo momento.

Gracias a todas aquellas personas que le han dado albergue a mis ideas y a mi trabajo, especialmente a mis maestros quienes me han enseñado, corregido y orientado. A los amigos que me han dado un buen consejo, y me han alentado en los momentos difíciles.

Al Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP) por permitirme trabajar en sus instalaciones y darme las facilidades para realizar el presente trabajo. Especialmente y con mucho cariño agradezco la valiosa y constante asesoría y apoyo de la Licenciada Olga Rebeca Torres de Matute, del Doctor Omar Dary y del Licenciado Jorge Matute; al personal de los Laboratorios de Microbiología Leonardo Mata y de Bioquímica.

A mis compañeros del Hospital Nacional de Sololá y de la sala Anexa del IGSS, y a todos mis amigos de la Ciudad del Paisaje, con cariño.

INDICE

	No. página
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
3.1. Género <u>Campylobacter</u>	5
3.2. <u>Campylobacter jejuni</u>	5
3.2.1. Características microbiológicas	5
3.2.1.- Muestra	6
3.2.1.- Observación directa	6
3.2.1.- Cultivo y aislamiento	6
3.2.1.- Filtración	8
3.2.1.- Identificación	8
3.2.1.- Características Bioquímicas	8
3.2.1.- Tipificación	9
3.2.2. Patología	10
3.2.2.- Mecanismos de Invasión	10
3.2.3 Antígenos de superficie de <u>Campylobacter jejuni</u>	11
3.2.3.- Flagelina	12
3.2.3.- Lipopolisacárido	12
3.2.3.- Antígenos de peso molecular 95, 110 y 185 kDa	12
3.2.4. Enfermedad Clínica	12
3.2.5. Tratamiento	13
3.2.6. Respuesta inmune a la infección por <u>Campylobacter jejuni</u>	13
3.2.7. Importancia de <u>Campylobacter spp</u> en la industria alimenticia	14
3.2.8. Epidemiología	15
3.3. Identificación y purificación de proteínas	15
3.3.1. Electroforesis con gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	16
3.3.2. Inmunoblot	16
3.3.3. Preparación de antisueros policlonales	18

3.3.3.- Inmunización de animales	18
3.3.3.- Antígeno utilizado	18
3.3.3.- Vía de administración	19
3.3.3.- Refuerzos	19
3.3.3.- Exanguinación	20
3.3.4 Purificación de Anticuerpos	20
3.3.4.- Precipitación con sulfato de amonio	20
3.3.4.- Purificación por Inmunofinidad	20
3.3.4.- Columna de Inmunofinidad para purificar antígenos	20
4. Justificaciones	22
5. Objetivos	23
6. Hipótesis	23
7. Materiales y Métodos	24
8. Resultados	37
9. Discusión de resultados	39
10. Conclusiones	42
11. Recomendaciones	43
12. Referencias	44
13. Anexos	51

[Faint stamp]

[Faint stamp]

1. RESUMEN

Tres proteínas de superficie de alto peso molecular de *Campylobacter jejuni* (95, 110 y 185 kDa) fueron reconocidas inmunológicamente (por *immunoblot*) por un pool de leches maternas con las que se alimentaba a niños quienes en ese momento estaban infectados por dicha bacteria pero no presentaban ningún sintoma de enfermedad(1). Este hallazgo sugirió la posible relación entre estas proteínas con protección contra la infección causada por esta bacteria, los cuales al obtenerlos en forma pura, podrían contagiarse fácilmente con esta bacteria, como por ejemplo niños pequeños o personas adultas (viajeros, por ejemplo) que nunca han estado en contacto con infecciones de este tipo y que viajan a regiones de riesgo.

Se produjeron antisueros policlonales contra estas tres proteínas de alto peso molecular, a partir de la separación por electroforesis con gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La purificación de los antisueros obtenidos se llevó a cabo en dos etapas:

- Precipitación con solución saturada de sulfato de amonio.
- Por medio de cromatografía líquida de alta presión utilizando proteína A de *Staphylococcus aureus*.

Luego, estos antisueros fueron utilizados para preparar tres distintas columnas de inmunoafinidad (uniendolos covalentemente a agarosa-hidrazida) para purificar a pequeña escala las proteínas de superficie de *C.jejuni*.

Los antisueros policlonales producidos fueron evaluados por medio de *immunoblot*, en el cual se observó que éstos reconocen la mayoría de bandas que pertenecen a *C.jejuni* y a algunas bandas de otras enterobacterias, lo cual puede ocurrir por:

¹Torres O, Cruz Jr. Protection against *Campylobacter* diarrhea: role of milk IgA antibodies against bacterial surface antigens. *Acta Paediatrica* 1993;82: 835-8.

- La desnaturalización en presencia de dodecil sulfato de sodio de las proteínas multiméricas en sus respectivos monómeros, por lo que se piensa que en este caso se puede tratar de proteínas multiméricas que se disocian en cadenas de polipéptidos semejantes, aunque de pesos moleculares distintos.

- La presencia de la banda de lipopolisacárido que es una proteína común en las bacterias Gram negativo.

Al realizar las columnas de afinidad, la cantidad de anticuerpo unido a cada una de las columnas fabricadas fue de 0.36, 0.50, 0.57 mg de IgC/ml de matriz, respectivamente, que es mucho menor a la que se recomienda para que la columna reconozca con mayor facilidad más antígenos.

La cantidad de proteína eluida fue de 9.81, 5.84 y 6.25 ml/dl, respectivamente de proteína de cada columna de afinidad (diluída en un total de 20 ml de solución eluyente), lo cual es muy escaso para realizar ensayos posteriores.

Se recomienda producir antisueros monoclonales para cada una de las proteínas de 95, 110 y 185 kDa de C. jejuni para mejorar la especificidad del anticuerpo obtenido; utilizar otro tipo de columna de afinidad para cromatografía por gravedad.

2. INTRODUCCION

Campylobacter jejuni es reconocido actualmente como uno de los agentes causales de diarrea infecciosa más importantes tanto en países desarrollados como en países en desarrollo, su incidencia se observa principalmente en niños menores de dos años y en personas adultas quienes han ingerido carne de pollo mal cocida o leche cruda(1,2).

En Guatemala, se reportó a C. jejuni como responsable en un alto porcentaje (55%) de enfermedad diarreica en niños menores de dos años habitantes de Santa María de Jesús, Sacatepequez. En este estudio se pudo también comprobar que los niños alimentados con leche materna presentaban menos probabilidad de adquirir infección por C. jejuni, debido a que este líquido contiene múltiples factores de defensa entre ellos la inmunoglobulina A secretoria (IgAs). Por medio de inmunoblot se pudo determinar que existen anticuerpos en leche materna contra tres antígenos de superficie celular de Campylobacter jejuni de peso molecular 95, 110 y 185 kDa y que se asocian con proteger al infante contra diarrea provocada por C.jejuni.

La purificación de estos antígenos de superficie de C. jejuni es un paso importante para evaluarlos posteriormente como posibles candidatos para elaborar una vacuna contra esta bacteria, la cual es una buena solución preventiva para proporcionar protección a la población de un área endémica contra diarreas de este tipo, o a personas adultas residentes de países desarrollados y que viajan a regiones menos desarrolladas quienes son susceptibles a contaminarse, ya que nunca han creado inmunidad contra éste tipo de infecciones. En países industrializados en donde la adquisición de estas infecciones se debe principalmente al consumo de pollo, ya que éste es un reservorio del patógeno, existe interés en el desarrollo de esta vacuna para prevenir infección por Campylobacter jejuni en estas aves.

En el presente trabajo de tesis se produjeron antisueros policlonales contra los antígenos de alto peso molecular (95, 110 y 185 kDa) de *Campylobacter jejuni* los cuales fueron purificados y utilizados para hacer columnas de inmunoafinidad al unirlos a un soporte de agarosa-hidrazida por medio del cual fueron purificados los antígenos ya mencionados a pequeña escala.

3. ANTECEDENTES

3.1. Género Campylobacter

Anteriormente se les conocía como *Vibrios microaerofilicos* y se consideraban patógenos únicamente en animales^(1,2), en la actualidad figuran entre los agentes causales de diarreas infecciosas más importante^(2,3) que afectan especialmente a niños pequeños y adultos, quienes han ingerido alimentos contaminados, especialmente leche y pollo mal cocido⁽¹⁻⁴⁾. En la tabla No. 1 (ver Anexos) se muestran las características de las especies de este género.

3.2. Campylobacter jejuni

Debido a las altas incidencias de diarreas ocasionadas por este microorganismo⁽²⁻⁵⁾, se le ha considerado como uno de los principales agentes de diarreas infecciosas junto con *Shigella* spp, *Salmonela*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, virus y parásitos⁽⁶⁾.

En países subdesarrollados, este tipo de infección afecta especialmente a niños menores de un año y, debido a la producción de anticuerpos, la frecuencia de episodios de diarrea es menor con relación con la edad. En países desarrollados, la gastroenteritis provocada por *Campylobacter jejuni* tiene una alta incidencia en niños pequeños y en adultos jóvenes entre 20 y 40 años, quienes han ingerido pollo o leche⁽⁶⁾.

En el estudio realizado por INCAP en Santa María de Jesús, Sacatepequez, se reportó a *C. jejuni* como responsable en un alto porcentaje (55%, n= 426) de enfermedad diarreica. La incidencia de infección se reportó predominantemente en niños menores de dos años⁽⁴⁾.

3.2.1. Características microbiológicas

C. jejuni es un bacilo Gram negativo, espirilado, pleomórfico, caracterizado por su rápido movimiento de dardo; oxidasa positivo, no fermentador, crece óptimamente a 37°C y a

42°C. en condiciones microaerofílicas, (5-10% de oxígeno, 3-10% dióxido de carbono), aislándose con facilidad en medios de cultivo enriquecidos con sangre de carnero desfibrinada, sulfato de hierro, metasulfito y piruvato de sodio como suplemento (7,8,9).

El esquema No. 1 (ver anexos) muestra la forma de identificar Campylobacter jejuni.

3.2.1.- Muestra:

Pueden ser heces frescas o transportadas en *Cary Blair*, el cual puede mantenerse a 4°C por un tiempo de hasta una semana, si no se va a procesar inmediatamente. Las muestras múltiples incrementan la posibilidad de aislamiento del microorganismo (7,9,10,11,12).

3.2.1.- Observación directa:

En un frote de heces frescas coloreado con Gram usando como colorante de contraste carbol-fuscina, se observa Campylobacter como un bacilo gram negativo, delgado, en forma de espiral o de "S" o de "coma", con extremos curvos. Los frotos realizados de cultivos viejos degeneran a formas ovoides después de unos pocos días en medio sólido. (9-13).

3.2.1.- Cultivo y Aislamiento:

a) Atmósfera y temperatura de incubación:

Se requiere de una atmósfera con aproximadamente 5% de O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂ la que se puede obtener por medio de varios métodos:

- Poly-Bag (bolsa de polietileno y un tanque de gas conteniendo 5% de O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂ (14,15).

- Uso de jarra Gas-Pak sin catalítico más un sobre generador de gas (Campy-Pak) o sistema de una mezcla de gases de un 5% de O₂, 10% CO₂ y 85% de N₂ (14,15).

- Campy Pak (BBL): jarra Gas-Pak más sobre generador de gas.

Jarra anaeróbica sin catalítico. (12)

- Jarra con candela reduce el oxígeno a un 17-19% y provee CO₂ tiene la desventaja de que necesita un tiempo de incubación de 72 horas y existen cepas que no crecen a este ambiente (12).

C. jejuni crece óptimamente a 37°C pero para aislarlo se recomienda incubar a 42°C para mayor selectividad. Se incuba de 24-48 horas (12).

b) Medios de cultivo

Los agares selectivos utilizados para aislar Campylobacter jejuni pueden ser los siguientes:

Agar Butzler-Virion: (12)

Base de Agar Columbia

Sangre de Carnero al 7%

Bacitracina 25 UI/ml

Novobiocina 5µg/ml

Cicloheximida 50µg/ml

Sulfato de Colistina 10 U/ml

Cefazolina 15 µg/ml

Este medio es el más utilizado ya que con él se obtiene una inhibición óptima de la microbiota entérica, haciendo más fácil su reconocimiento (14).

Agar Skirrow (14,15)

Base de Agar brucela

Sangre lisada de caballo al 7%

Vancomicina 10 µg/ml

Sulfato de Polimixina B 2.5 UI/ml

Lactato de Trimethopim 5 µg/ml

Es la experiencia del INCAP que este medio es muy inhibitorio e impide el aislamiento de un alto porcentaje de cepas, por lo que preferimos utilizar el medio de Butzler Virion (12,14).

Medio Campy-BAP (10)

Base de Agar brucela

Sangre de carnero al 10 %

Vancomicina 10 µg/ml
Sulfato de Polimixina B 2.5 UI/ml
Lactato de trimethopim 5 µg/ml
Cefalotina 15 µg/ml
Anfotericina B 2 µg/ml

3.2.1.- Filtración (16,17,18)

Este método es utilizado como un complemento del cultivo directo y se basa en el principio que los campylobacters debido a su movilidad, pueden pasar a través de un filtro de membrana con más facilidad en relación a otras enterobacterias.

Se utilizan filtros de membrana de acetato de celulosa, (con tamaño de poro de 0.45-0.65 µm) el cual se coloca sobre una placa conteniendo medio adecuado, sobre éste se vierten cinco gotas de suspensión fecal y luego son incubadas a 37°C por 1 hora. El filtro se remueve y la caja es incubada a 37°C en las condiciones anteriormente recomendadas.

3.2.1.- Identificación

La morfología de las colonias de Campylobacter jejuni varía dependiendo de los medios de cultivo utilizados, pero, generalmente éstas son no hemolíticas, blanco grisáceo, casi transparentes, irregulares, extendidas, que dan la impresión de seguir el rayado de la caja, sus bordes no son bien definidos y su apariencia es líquida. Pueden tornarse en colonias redondas, convexas y lisas cuando los medios no son frescos o a medida que el cultivo envejece (13,14).

3.2.1.- Características Bioquímicas:

Oxidasa:

Una porción de colonia se toma con un palillo estéril y se frota sobre un pedazo de papel filtro impregnado con una gota del reactivo de oxidasa (dicloruro de tetrametil p-fenilendiamina al 1%). La reacción debe de ser positiva al término de dos minutos

con el apareamiento de color azul oscuro (9,11).

Hidrólisis del Hipurato:

La hidrólisis del hipurato de sodio es la mejor prueba para distinguir *C. jejuni* de otras especies de campylobacters, y se acepta, para propósitos clínicos, reportar como *C. jejuni* a aquél microorganismo que tiene características microscópicas típicas al observar frotos de heces frescas teñidos con Gram con carbol fuschina, aislada en medio selectivo, oxidasa positivo y que demuestran reacción positiva para la hidrólisis del hipurato(9,11).

3.2.1.- Tipificación:

El avance de la tecnología ha permitido utilizar y aplicar diversidad de pruebas para distinguir entre las cepas de *Campylobacter spp.* entre las cuales se pueden mencionar:

- la serotipificación con antígenos termolábiles y termoestables: es quizás, aunque muy difícil de estandarizar, el más utilizado en laboratorios de referencia (19).

- biotipificación (20)

- sensibilidad a la bacteriocina, al ácido nalidíxico-cefalotina (20),

- hidrólisis del acetato de indoxilo (9),

- auxotipificación (20)

- endonucleasas de restricción (22)

- ribotipia (23)

- reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction) PCR (24,25) .

- Tipificación de *C. jejuni* por ribotipia (Estudio realizado en INCAP) (23):

En el estudio realizado en Santa María de Jesús, con el objetivo de determinar si las infecciones repetidas por *C. jejuni* en un mismo niño reflejan la persistencia del mismo microorganismo en los diferentes aislados o si el niño se

reinfecta con frecuencia por distintas cepas, se compararon 75 cepas de *C. jejuni* provenientes de diferentes aislamientos realizados en episodios diarréicos y no diarréicos de 20 niños de diferente familia. La tipificación genética de los *C. jejuni* aislados de un mismo niño se llevó a cabo por digestión de ADN con enzimas de restricción seguidas de electroforesis, transferencia de Southern e hibridación con sondas de cADN sintetizado por transcriptasa reversa a partir de rARN 23S y 16S. Los resultados se evaluaron determinando diferencias entre las cepas aisladas por medio de huella digital, de donde se pudo categorizar ocho diferentes ribotipos, de patrones R1, R3, R4, de donde se concluyó que esto refleja reinfecciones por diferentes cepas de esta bacteria.

3.2.2. Patología

3.2.2.- Mecanismos de invasión:

Campylobacter jejuni puede provocar enfermedad valiéndose de los siguientes mecanismos^(8,9,10):

- a) Producción de toxina
- b) Penetración y proliferación en el epitelio intestinal.

a) Producción de toxinas

- Enterotoxina:

Es una proteína de peso molecular entre 60 kDa a 70 kDa de peso, termolábil, puede ser completamente inactivada a 56°C por 1 hora o a 96°C por 10 minutos ⁽¹⁰⁾. Posee características similares, aunque no es idéntica, a la enterotoxina producida por *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* respectivamente.

En experimentos *in vitro*, se ha observado que esta toxina tiene actividad citotóxica y citolítica en diversas líneas de tejido y celulares ⁽¹⁰⁾. El mecanismo de acción de esta toxina es mediado por un incremento de concentraciones intracelulares de adenil-ciclase, provocando acumulación de electrolitos y líquidos en el tejido intestinal ⁽¹⁰⁾

- Citotoxina:

Es una toxina extracelular, termolábil, cuya actividad citotóxica se expresa, al igual que la anterior, en cultivos de células de riñón de bovino, CHO, HeLa y Vero(26,27). La diarrea sanguinolenta está relacionada con cepas productoras de citotoxina, mientras que la diarrea acuosa sin leucocitos fecales con cepas productoras de enterotoxina (27,28).

b) Penetración y proliferación en el epitelio intestinal

- Motilidad, Quimiotaxis y Adherencia:

Con ayuda de su flagelo, que debido a su estructura protéica, el mayor antígeno de superficie celular de *C. jejuni* (29-31), la bacteria atraviesa la barrera gástrica ya que es atraído por un estímulo quimiotáctico frente a carbohidratos de la mucosa intestinal tales como piruvato, succinato, fumarato, citrato, malato, y α -ceto-glutarato(32), sustancias que también favorecen su colonización en la mucosa gástrica, ocurriendo entonces el fenómeno de adherencia de estructuras celulares del microorganismo a las células epiteliales (32).

3.2.3. Antígenos de superficie de *Campylobacter jejuni* (32-35):

Por medio de métodos como tratamientos ácidos y térmicos, extracción con glicina, electroforesis de proteínas, Western Blot (immunoblot) y columnas de inmunoafinidad se han aislado, purificado y caracterizado proteínas y estructuras celulares de *Campylobacter jejuni* tales como flagelina, lipopolisacárido, membrana exterior. Otras proteínas de alto peso molecular, están siendo estudiadas y pueden purificarse con el propósito ya sea de desarrollar pruebas de diagnóstico rápidas y específicas para *C. jejuni*. Estos estudios han tenido diversos fines: ya sea para considerarlos como posibles candidatos para desarrollar una vacuna contra este microorganismo, o como pruebas diagnósticas rápidas.

3.2.3.- Flagelina (36):

Con un peso molecular de 66 kilo Daltons (kDa), constituye, por su naturaleza protéica, su localización expuesta y su papel en la invasión y colonización de la mucosa, uno de los más importantes antígenos de superficie celular de *C. jejuni*.

3.2.3.- Lipopolisacárido (10):

Es un importante factor de virulencia de este microorganismo, y lo constituyen tres regiones (32-35):

- Lipopolisacárido A,
- oligosacárido core,
- cadena de polisacárido

confiriéndole diversidad antigénica, por lo que se encuentra un gran número de serotipos.

3.2.3.- Antígenos de Superficie de peso molecular 95, 110 y 185 kDa(36):

Con el propósito de demostrar que existe respuesta inmunológica en leche materna contra antígenos de superficie de *C. jejuni* y no solamente contra proteína flagelar, éstos fueron separados de cepas aisladas de niños originarios de Santa María de Jesús, menores de un año, (infectados por *C. jejuni* presentando o no diarrea) por medio de electroforesis con gel de poliacrilamida al 7.5% en presencia de sulfato dodecilo de sodio [(SDS)-PAGE]. Las proteínas obtenidas (en forma desnaturalizada) se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para luego determinar su reacción con leche materna (recolectada en el mismo tiempo que las muestras fecales) por medio de *immunoblots*. Estos estudios demostraron que la leche materna ingerida por niños infectados pero no enfermos, es rica en anticuerpos contra antígenos de superficie de *Campylobacter jejuni* de peso molecular de 95, 110 y 185 kDa, asociando la presencia de éstos anticuerpos con ausencia de diarrea en los niños, explicando en parte su efecto protector.

3.2.4. Enfermedad clínica:

La dosis infectiva de *Campylobacter jejuni* puede ir de 500 a 1.000.000 células bacterianas, el período de incubación varía de uno a siete días (5,6-10).

Los pacientes afectados, pueden ser asintomáticos o presentar una severa enfermedad: los síntomas y signos incluyen fiebre, dolor abdominal, y diarrea con evacuaciones que pueden ser líquidas o disintéricas. Clínicamente no se pueden diferenciar de enfermedades causadas por otros patógenos(10).

Las infecciones extraintestinales que se pueden presentar, aunque en escasas ocasiones incluyen bacteremia, artritis reactiva, bursitis, infección del tracto urinario, meningitis, endocarditis, peritonitis, eritema nodosum, pancreatitis, aborto y sepsis neonatal (10).

El síndrome de Guillian-Barré (SGB) es considerado como una secuela de la infección (37), asociándosele solamente a ciertos serotipos de *Campylobacter spp.*

3.2.5. Tratamiento:

En casos de campylobacteriosis, el antibiótico de elección es la eritromicina, utilizándose la ciprofloxacina como droga alternativa(38). *C. jejuni* presenta diversos grados de susceptibilidad frente a una variedad de agentes antimicrobianos que incluyen macrólidos, fluoroquinolones, aminoglicósidos, cloranfenicol, tetraciclina (38).

3.2.6. Respuesta inmune a la infección por *Campylobacter jejuni*:

Se ha demostrado, como en otros tipos de diarreas infecciosas, que la infección o exposición previa a *C. jejuni* resulta en inmunidad específica que protege contra nuevas infecciones encontrándose también que los niveles de títulos de anticuerpos contra este patógeno en pacientes habitantes de un área endémica son altos, mientras que en pacientes que viven en

áreas donde la infección por *C. jejuni* es menos probable, los niveles son bajos o nulos (38,40).

La protección que brinda la leche materna a niños contra enfermedades infecciosas de esta índole (41), se debe a que este líquido es rico, entre otras sustancias, en inmunoglobulina A secretoria (IgAS) (42,43) y también en anticuerpos contra fracciones moleculares de peso molecular alto de *Campylobacter jejuni*. (39) las cuales podrían conferir protección contra diarrea a lactantes pequeños (38).

Sin embargo, la leche materna no confiere una protección a largo plazo y, cuando se descontinúa, el riesgo de adquirir diarrea por *C. jejuni* no se modifica (38). Esto sugiere que una vacuna contra *C. jejuni* proveería una protección mucho más duradera a niños y a sus madres habitantes de un área endémica, la cual también podría asegurar protección a personas viajeras de países desarrollados quienes son susceptibles a contaminarse ya que nunca han creado inmunidad contra este tipo de infecciones (38). En países industrializados, la diarrea por *Campylobacter* se debe principalmente al consumo de pollo, existe interés en el desarrollo de esta vacuna para prevenir infección por *Campylobacter jejuni* en estas aves (44,45); al mismo tiempo que ésta sería de gran utilidad en nuestros países al proveer de protección a los niños que están expuestos a la infección provocada por *Campylobacter jejuni* (38).

3.2.7. Importancia de *Campylobacter* spp. en la Industria Alimenticia:

Campylobacter spp tiene su principal reservorio en las aves de corral, quienes presentan un nivel normal entérico de esta bacteria sin presentar enfermedad; debido a ello el Programa de Vigilancia de control de infecciones transmitidas por alimentos de la OMS e intoxicaciones en Europa considera a *Campylobacter jejuni* y a *Campylobacter coli* como uno de los principales contaminantes de estos productos alimenticios (46,47).

En Estados Unidos, el Servicio de Seguridad e Inspección de Alimentos (FSIS) es responsable de asegurar que la carne y el pollo se encuentren en condiciones higiénicas, saludables y convenientes para el consumo humano. Los resultados de análisis de carne de pollo efectuados por esta institución, indican que la cantidad de *C. jejuni* es mayor en carne cruda que en cocida y que esta bacteria es susceptible al tratamiento con cloro en concentraciones de 0.5 a 1 ppm (47,48).

La contaminación por *Campylobacter spp.* en alimentos crudos, aunque indeseable, es difícil de controlar. En comidas rápidas la presencia de *Campylobacter spp.* podría indicar inadecuado proceso de cocción, recontaminación o ambos (49,50).

3.2.8. Epidemiología:

Se considera que *Campylobacter jejuni* un importante patógeno en niños y adultos en muchas partes del mundo, en donde las infecciones producidas por este microorganismo no siempre conducen a disentería ya que, una proporción de los individuos infectados son asintomáticos y otros desarrollan diarrea no disintérica (51). El principal reservorio de este microorganismo son las aves de corral, asociando el consumo de estas aves con infección por este microorganismo, por lo que su aislamiento es importante indicador en el control de calidad de la carne de las aves de corral (46,47).

En lugares donde la infección es endémica, las infecciones asintomáticas se deben al desarrollo de una IgA sérica específica, cuyos niveles aumentan con la edad. Además en esas áreas la seroconversión hacia antígenos de superficie celular se ha reportado tanto en brotes y estudios en voluntarios como en pacientes infectados con *C. jejuni*.

A pesar que existe poca información acerca de las infecciones causadas por *C. jejuni* en nuestro medio, este microorganismo causa diarrea severa en niños menores de un año de

edad, especialmente en aquéllos que no son amamantados o que no tienen anticuerpos específicos anti-*Campylobacter* al momento del nacimiento⁽³⁶⁾.

-3.3. Identificación y Purificación de Proteínas:

Actualmente, muchas técnicas se han estandarizado para identificar, separar y purificar proteínas, debido a la importancia de estas moléculas que juegan un papel importante en procesos inmunológicos, fisiológicos y bioquímicos, ya que forman parte importante de la estructura celular de muchos microorganismos. Estas pruebas evalúan las características físicas, bioquímicas e inmunológicas de las proteínas. Las pruebas más utilizadas se enumeran a continuación^(52,53):

- electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
- *immunoblot*
- purificación por precipitación
- purificación por inmovinoafinidad

3.3.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) ^(52,53):

Esta técnica es utilizada ampliamente para la identificación y caracterización de proteínas, por medio de la cual, las proteínas forman complejos con el detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS), al unirse proporcionalmente a éste, formando un complejo que puede separarse fácilmente al someter el gel de poliacrilamida a una diferencia de carga eléctrica la cual hará que dicho complejo "migre" formando bandas distintas según el peso molecular de las proteínas. Para visualizar las bandas formadas, es necesario colorear el gel luego de realizada la electroforesis, empleándose los siguientes colorantes:

- Azul de Coomassie,
- Plata,
- Cobre.

3.3.2. *Inmunoblot*(52,53,54)

Esta técnica complementa la técnica anterior ya que combina la resolución de la electroforesis en gel con la especificidad de la detección inmuoquímica, puede ser utilizada para los siguientes fines :

- determinación de la presencia, cantidad y especificidad de un antígeno
- determinación del relativo peso molecular de proteínas
- confirmación de la eficiencia de extracción de antígeno
- purificación de anticuerpos

Los pasos para la realización del inmunoblot son los siguientes⁽⁵⁴⁾:

- a) electroforesis en gel
- b) transferencia de las proteínas separadas en el gel de SDS-PAGE a un soporte adecuado, tal como membrana de nitrocelulosa.
- c) bloqueo de sitios de unión no específicos sobre el soporte.
- d) adición del anticuerpo
- f) detección del complejo antígeno-anticuerpo formado.

Luego de realizada la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, sometiéndolos ambos (el gel y la membrana) a un campo eléctrico que conducirá las proteínas desde uno hacia otro, respectivamente.

Ya transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa, antes que el blot sea procesado para detección antigénica, es esencial bloquear la membrana para prevenir adsorción no específica de reactivos inmunológicos, el bloqueo se lleva a cabo con soluciones tampón adecuadas.

La detección de antígenos en el inmunoblot se lleva a cabo por la unión del anticuerpo a las proteínas inmovilizadas sobre la membrana. Los anticuerpos pueden ser unidos directamente a las

proteínas o indirectamente utilizando reactivos entrecruzantes secundarios. Los anticuerpos específicos que pueden ser de la siguiente naturaleza:

- anticuerpos policlonales,
- anticuerpos monoclonales
- pool de anticuerpos monoclonales

La detección del complejo antígeno-anticuerpo formado se lleva a cabo por medio de los siguientes reactivos:

- reactivos radioactivos p.e. ^{125}I , ^{14}C .
- Peroxidasa
- Diaminobencidina
- fosfatasa alcalina, utilizando como sustrato bromocloroindol fosfato-BCIP- y azul de nitrotetrazolio -NBT- genera un precipitado de color negro-púrpura intenso en el sitio de reacción.

3.3.3. Preparación de antisueros policlonales (55,56)

La preparación de antisueros se realiza induciendo la respuesta humoral *in vivo* de animales por medio de la inoculación de éstos con inmunógenos (proteínas, péptidos, carbohidratos, ácidos-nucléicos, lípidos, células enteras) durante un período determinado de tiempo; el antisuero obtenido de estos animales es purificado.

3.3.3.- Inmunización de animales (54):

Para llevar a cabo este procedimiento, es importante tomar en cuenta los siguientes factores, ya que de ellos depende el éxito que se tenga en el mismo:

- elección del animal,
- la dosis óptima y forma del antígeno,
- administración,
- la vía y número de inyecciones y período entre las mismas.

Los animales que se utilizan con mayor frecuencia son conejos, ratones, ratas, hámsters y cobayos, siendo los conejos

3.3.4. Purificación de los anticuerpos (54)

Los métodos de purificación de anticuerpos más utilizados son los siguientes:

3.3.4.- Precipitación con sulfato de amonio(55):

Es uno de los métodos usados con más frecuencia para remover proteínas de solución, ya que éstas forman puentes de hidrógeno con agua a través de sus grupos polares expuestos. Cuando altas concentraciones de moléculas de sulfato de amonio, altamente cargados, se agregan esos grupos compiten con las proteínas para unirse al agua. Esto remueve las moléculas de agua de la proteína y disminuye su solubilidad, lo que hace que éstas precipiten.

Los factores que afectan la precipitación con sulfato de amonio son:

- número y posición del grupo polar,
- peso molecular de la proteína,
- pH de la solución y la temperatura.

3.3.4.- Purificación de Anticuerpos por Inmunoadfinidad (54)

Esta técnica es una de las más poderosas para el aislamiento de proteínas, las cuales pueden purificarse de 1000 a 10000 veces rápida y fácilmente. Se basa en la captura del antígeno deseado mediante la formación de complejos inmunológicos sobre una matriz adecuada. Este método involucra los siguientes pasos:

- 1) preparación de una matriz sólida unida a un Anticuerpo (matriz-Ac)
- 2) unión del Antígeno que se quiere purificar a la matriz-Ac
- 3) elución del antígeno purificado

Los factores que afectan la purificación por inmunoadfinidad son:

- pureza inicial del antígeno,
- la afinidad del anticuerpo por el antígeno
- facilidad con la cual el complejo antígeno-anticuerpo

formado se destruya.

La proteína A de Staphylococcus aureus tiene la propiedad de unirse con alta especificidad a la región Fc de las inmunoglobulinas de muchas especies mamíferas por lo que, unida a un soporte hidrofílico apropiado, se ha utilizado ampliamente en procesos de purificación de inmunoglobulinas por cromatografía de afinidad, especialmente de fluidos ascíticos o cultivos.

3.3.4.- Columna de inmuoafinidad para purificar antígenos:

Las inmunoglobulinas purificadas pueden adherirse o inmovilizarse a soportes apropiados tales como sefarosa, agarosa, hidraliza, entre otros, para formar una columna por la cual se haga pasar una mezcla de varios antígenos. Estos formarán complejos antígeno-anticuerpo, y luego eluyen específicamente los antígenos de interés.

La utilización de hidrazida Affi-Gel Hz (Bio-Rad 500-0001) involucra una oxidación previa de la molécula de inmunoglobulina para unirla a las aminas primarias de la hidraliza, la cual está unida a un soporte de agarosa. Se forman complejos hidrazona con el soporte activado dando como resultado que el anticuerpo se encuentre lo suficientemente bien orientado para reconocer inmunológicamente al antígeno que atravesará la columna.

4. JUSTIFICACIONES

Muchas acciones se han emprendido para controlar el problema de la diarrea, siendo algunas de ellas el fomento de la lactancia materna, el control microbiológico de aguas y alimentos, el control del sistema de letrización, capacitación en el aislamiento e identificación de agentes etiológicos y la provisión de infraestructura sanitaria.

El desarrollo de pruebas diagnósticas rápidas para la detección de estos microorganismos provee al Laboratorio las herramientas necesarias para poder ofrecer al médico resultados oportunos para apoyar el diagnóstico y orientar en la toma de decisiones con respecto a los pacientes afectados.

Es deseable el desarrollo de vacunas contra estos microorganismos para prevenir el contagio en niños habitantes de un área endémica, personas que trabajan directamente con pollos o turistas que nunca han tenido contacto con esta bacteria y viajen a regiones a riesgo. Se han identificado varias proteínas de superficie de este microorganismo asociadas con protección en infantes, especialmente flagelina y proteínas de alto peso molecular (95, 110 y 185 kDa).

Estas últimas presentaron respuestas inmunológicas en la leche materna de madres cuyos hijos no presentaban diarrea lo que indica que estas proteínas podrían ser utilizadas posteriormente como inmunógenos, por lo que existe interés en purificarlas para evaluarlas bioquímica e inmunológicamente.

La estandarización de un método de purificación lo suficientemente eficaz para purificar estas proteínas es sumamente importante, ya que, es necesaria la obtención de una cantidad suficiente de antígenos para pruebas inmunológicas y bioquímicas posteriores para evaluar si realmente estas proteínas de alto peso molecular proveen de algún tipo de defensa contra infecciones de esta clase.

Con el desarrollo de tecnología de este tipo se contribuye en gran manera en el avance de las investigaciones realizadas en nuestro país.

5. OBJETIVOS

GENERAL:

Purificar tres antígenos de peso molecular alto (93, 110 y 185 kDa) de *Campylobacter jejuni*

ESPECIFICO:

- Utilizar técnicas como Electroforesis de Proteínas e Inmunoblot para separar proteínas de superficie de *C. jejuni* de alto peso molecular 95, 110 185 kDa.

- Preparar y purificar antisueros polivalentes contra proteínas de alto peso molecular de *C. jejuni*

- Preparar columna de inmunoafinidad con los anticuerpos obtenidos para purificar los antígenos de superficie de *C. jejuni* y así obtener una cantidad grande de éstos.

- Evaluar preliminarmente las propiedades antigénicas de los antígenos purificados.

6. HIPOTESIS

El presente trabajo de tesis es un estudio descriptivo. Se considera no incluye hipótesis.

- papel parafinado
- papel celofán
- placas de vidrio
- pipetas pasteur punta larga y punta corta
- pipetas serológicas graduadas
- varillas de vidrio
- beakers
- erlenmeyers
- probetas
- kitazatos
- embudos
- viales
- tubos de ensayo 13x100 con tapón de rosca

7.2.3.b Bioterio:

- jaulas para conejos

7.2.3.c Equipo:

- Incubadora de 35-37°C (Thelco 32 M)
- Autoclave (Castle Steam Sterilizer)
- Centrífuga (International Clinical Centrifuge)
- Centrífuga refrigerada (Sorvall Super Speed RC-2)
- Balanza analítica (Mettler H10T)
- Centrífuga refrigerada (international Equipment Company, Refrigerated model PRJ)
- Filtro millipore 0.22 um, y 0.45 um (Millex GS y SIGMA)
- Vortex (Super-Mixer Cat. No. 1997310)
- Estufa - Agitador (Fischer Scientific Thermix stirring Hot Plate R10 dt)
- Bomba de vacío (Fischer Scientific)
- Pipetor de seguridad para pipetas graduadas (Clay Adams)
- Campana
- Baño de María 48-50°C (Presicion Scientific Co.)
- Mechero
- Estufa

- Cámara para electroforesis vertical (Hoefer Scientific)
- Fuente de poder para la electroforesis (Hoefer Scientific)
- pipetores (Hot Line #24587 Drumont pipet-aid)
- sellador de bolsas plásticas (Dazey micro-seal)

7.2.3.c Medios de Cultivo

- Agar columbia base (sangre de carnero al 7%)

7.2.3.d Reactivos:

- Electroforesis de Proteínas:

Stock de Acrilamida (Bis-acrilamida)

Buffer de Resolución 7.5% polimerización

Buffer de empaque 4.5% polimerización

Buffer tanque 10x (Tris-Glicina); Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%

Buffer de carga : Tris- HCl (0.0625 M), SDS 1.1%, azul de bromofenol al 0.25%, Glicerol 10 %, pH 6.8.

Buffer- Muestra: 2- mercaptoetanol al 20% en buffer carga.

- Coloración con azul de coomassie

Colorante azul de Coomassie al 0.25%

Solución decolorante I: metanol 50%, ácido acético glacial 10%

Solución decolorante II: Acido acético glacial 25%, metanol 25%

- Western Blott (Inmunoblots)

- Buffer 1 (reactivo de bloqueo): leche descremada Carnation al 5%, Tris-HCl 50mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.3%, pH 7.5

- Buffer 2 (reactivo de lavado): Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5

- Buffer 3 (reactivo de equilibrio y desarrollo): Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, HgCl₂·6H₂O 50mM pH 9.5

- Reactivo de color: 3.3u/ ml de BCIP y 6.6 u/ ml de NBT en buffer 3, preparar 95u/cm² por blot.

- Purificación con Sulfato de Amonio:

- Sulfato de amonio concentrado: 769 g p/v por litro

- Reactivo de Neesler: cloruro de mercurio al 0.1 %

- Purificación por Inmunoadinidad:

Proteína A (kit comercial BIORAD 153-6164) que incluye los siguientes reactivos:

Columna de Proteína A

Porta-cartucho para ensamblar en HPLC

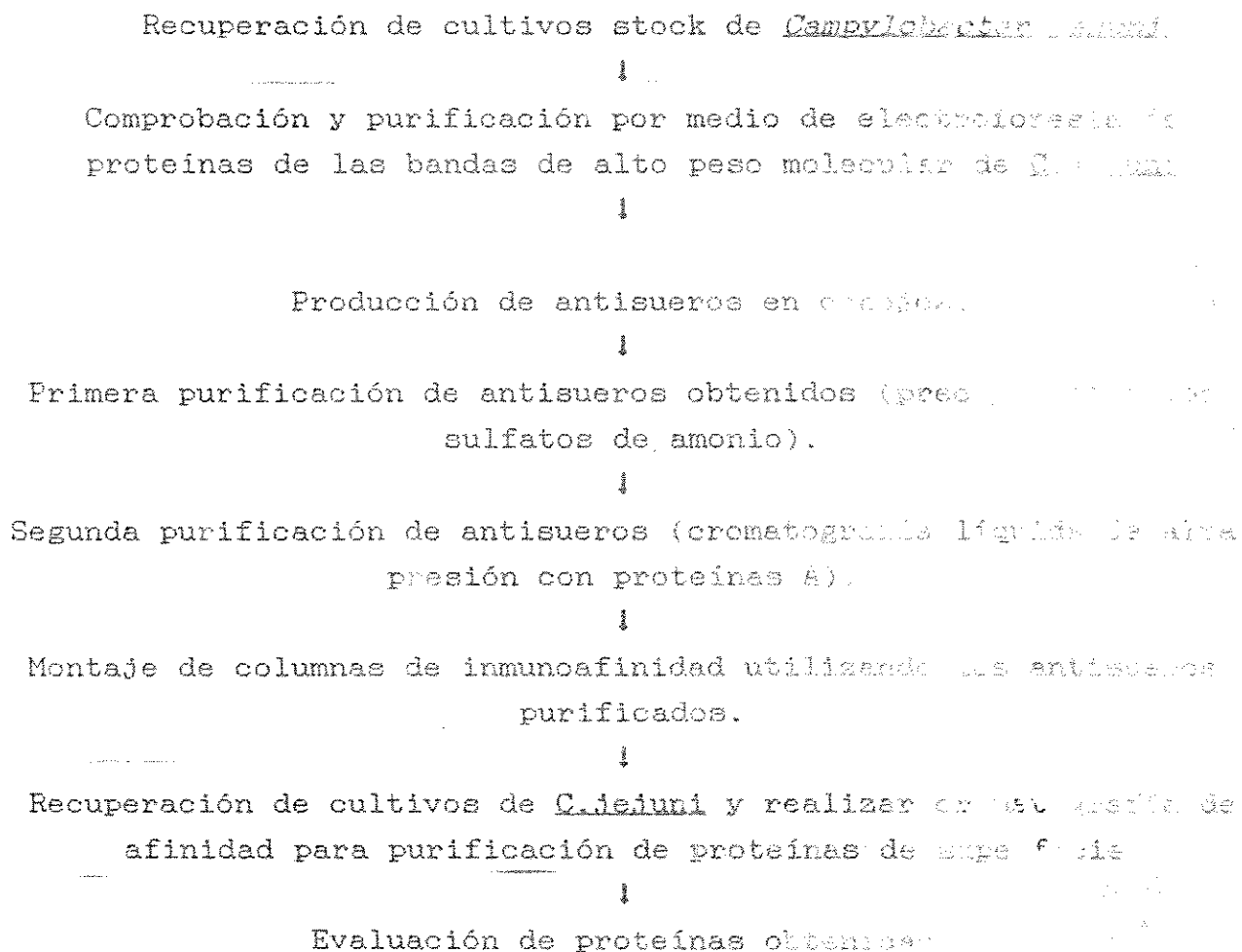
Buffer de Unión

Buffer de Elución

7.3. Procedimientos

El diagrama que se presenta a continuación muestra los pasos a seguir para la purificación de proteínas de C. jejuni, el cual se ilustra mejor en el anexo tres.

DIAGRAMA DE FLUJO DE TRABAJO



7.3.1. Recuperación de cultivos stock de *Campylobacter jejuni*:
Luego del aislamiento e identificación de cepas de *Campylobacter jejuni* se preservaron por inoculación del cultivo puro en stocks conteniendo leche descremada y posterior congelación a -70°C .

Para recuperar estas cepas:

- se sacan los viales de congelación y se trabaja rápidamente, ya que los cambios bruscos de temperatura pueden matar a la bacteria.
- se toma una asada (con el asa hirviendo) de estos viales
- se subcultiva en el medio seleccionado a 37°C por 48 horas.

7.3.2. Electroforesis de Proteínas:

Armar el equipo de electroforesis, cuidando de no tocar el vidrio con las manos. **USAR GUANTES SIEMPRE** ya que la acrilamida es cancerígena, evite el contacto con ella.

El gel de Bis-acrilamida consiste en dos geles:

- gel de resolución y
- gel de empaque

Gel de resolución:

En un kitazato limpio y estéril mezclar:

stock de acrilamida/Bis	7.5 ml
agua desmineralizada estéril	14.0 ml
Tris pH 8.8, 1.5 M	8.0 ml

Desgasificar y agregar justo antes de servir:

Persulfato de Amonio	200 μl
SDS al 10 %	300 μl

N,N,N,N'-tetrametiletilediamina (TEMED)	20 μl
--	------------------

Mezclar suavemente y usar inmediatamente (ya que la polimerización principia cuando se agrega TEMED)

Pipetear cuidadosamente dentro de la cámara de electroforesis, llenándola hasta antes de 1 cm del tope. Cuidadosamente, cubrir la solución de acrilamida con n-butanol sin mezclar (para eliminar oxígeno). Mantener en reposo.

Gel de Empaque:

En un kitazato limpio y estéril mezclar:

Stock de Acrilamida/Bis	4.5 ml
Agua desmineralizada estéril	8.70ml
Tris 0.5 M pH 6.8	3.75ml

Desgasificar y agregar justo antes de servir:

Persulfato de amonio al 10%	150 μ l
SDS al 10 %	150 μ l
(TEMED)	15 μ l

Descartar el n-butanol del gel ya polimerizado. Agregar el gel de empaque e insertar los peines. Dejar en reposo hasta que esté completamente polimerizado.

Remover los peines una vez el gel de empaque haya polimerizado, llenar la cámara con buffer tanque (Tris-base; Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) e inocular la muestra en cada pozo.

Una vez listo el gel con las muestras y buffer tanque, principiar la electroforesis conectando la cámara a la fuente de poder a 60 mA por 6 horas.

7.3.2. Preparación de muestras de C. jejuni

- En un tubo Eppendorf mezclar células con agua desmineralizada a una turbidez comparada con el estándar 10 del Nefelómetro de McFarland.
- Agregar un volumen igual al que se formó al hacer la mezcla del paso No. 2 de buffer muestra, conteniendo 10% de 2-mercaptoetanol.
- En un Baño de María hirviendo, colocar los tubos. Dejar hervir de 2 a 5 minutos.
- Sacar los tubos del baño de María, dejar enfriar y agregar 15% de glicerol estéril.
- Inocular 15 μ l de muestra en cada uno de los carriles del gel de electroforesis.
- Inocular también estándares de peso molecular de proteínas pre-teñidos ERL.

Cuando las bandas de electroforesis hayan llegado a el final del gel, parar la electroforesis y remover el gel obtenido.

7.3.3. Coloración azul de coomassie:

Luego de haber realizado la electroforesis:

- Sacar el gel del aparato y colocarlo en bandejas de vidrio.
- Agregar 125 ml de colorante azul de Coomassie, dejarlo tapado en el agitador con baja velocidad durante una hora.
- Al terminar el tiempo retirar el colorante y agregar \pm 125 de decolorante I, volver a tapar y colocar de nuevo el agitador por una hora.
- Cambiar el decolorante y agregar \pm 125 ml de decolorante II; de nuevo prosiga como en el paso anterior y agitar también durante 1 hora.

7.3.4 *Inmunoblot (Western Blott)*

Transferencia de electroforesis de proteínas en geles de acrilamida a membrana de nitrocelulosa

- Después de sacar el gel del equipo de electroforesis, lavar $2 \times 10'$ en buffer Towbin con rotación.
- Preparar la unidad transpor. (Hoefer), colocándola cerca de un lavadero para conectar el agua de enfriamiento.
- Coloque en la unidad el cassette de transferencia preparado en el siguiente orden:

- + rejilla
- + esponja
- + membrana de nitrocelulosa
- + gel de poliacrilamida
- + papel filtro
- + esponja
- + rejilla

- Llenar la unidad con 4≈5 litros de buffer Towbin, tapanla y dejarla funcionando por 2 horas a un amperaje de 0.8 A.
- Al terminar la transferencia, desconectar el sistema y sacar del cassette la membrana y el gel, este último debere ser coloreado con azul de Coomasie para control de calidad de la transferencia.
- Hidratar la membrana
- Introducir en una bolsa de hibridación y agregue 225µl/cm² de buffer 1. Incubar a temperatura ambiente con rotación durante 1.5 horas.
- Lavar 2x10' con buffer de lavado 2
- Introducir el blot en otra bolsa y agregar 95µl/cm² de anticuerpo diluido en buffer 1 (hacer una dilución 1:10 de antisuero) Incubar por un mínimo de 20 horas con ratación y a temperatura ambiente.
- Lavar 2x10' con buffer 2
- Introducir el blot en otra bolsa de hibridación y agregar el conjugado anti IgA diluido 1:1000 en buffer 1 (66µl/cm²). Incubar durante 4 horas a temperatura ambiente con rotación.
- Lavar 2x10' con buffer 2
- Lavar brevemente con buffer 3
- En otra bolsa de hibridación agregar 95µl/cm² de reactivo desarrollador. Incubar a temperatura ambiente sin rotación y en la oscuridad.

7.3.5. Producción de antisueros con conejas:

- Cortar las bandas de proteínas de peso molecular alto del gel, utilizando como patrón, geles coloreados.
- Mezclar con 1 ml de buffer TE
- Inocular en conejas de 6-8 meses de edad dosis de 200 µl cada 3 días.
- Extraer sangre por medio de exanguinación, separar el suero.

7.3.6. Purificación de antisueros con sulfato de amonio:

- Medir el volumen del suero obtenido y colocarlo en un beaker con una barra magnética.
- Medir un volumen igual de sulfato de amonio saturado y agregarlo gota a gota con ayuda de una bureta, manteniendo una constante agitación. Mantener a temperatura ambiente por 2 - 3 horas.
- Refrigerar toda la noche y centrifugar a 4000 g para sedimentar el precipitado. Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado con un volumen igual al original con agua.
- Repetir los pasos 1 y 2. Mantener 2-3 horas y centrifugue.
- Resuspender en agua con alrededor 1/3 del volumen original y dializar inmediatamente contra distintos cambios de PBS alrededor de 2 a 3 días.
- Agregue 2 a tres gotas de reactivo de Nessler para verificar la presencia de amonio.
- Concentrar la globulina obtenida con carbowax 20M
- Dializar la fracción concentrada contra PBS para remover el carbowax.
- Determinar la concentración de proteína con el método de Biuret. Ajustar a 20 mg/ml con PBS.
- Filtrar esterilmente y mantener a -20°C hasta que se utilice.

7.3.7. Purificación con columna de afinidad de proteína A Affi-prep (kit comercial EICRAD 153-6164):

I Preparación del Buffer

Buñer de unión:

- Disolver 31.4 g en 100 ml de agua HPLC destilada y desmineralizada estéril.
- agitar 10 minutos o hasta que se disuelva.
- pH final: 9 ± 0.2
- Mantener a 4°C.

Bufer de elución:

- disolver 2.2 g en 100 ml de agua HPLC destilada y desmineralizada estéril
- ajustar a pH 3.0 ± 0.2
- filtrar

Preparación de la muestra:

- ajustar a pH 9.0
- Diluir la muestra 1:2 con buffer binding.
- Filtrar (filtro de 0.43 o 0.8 μm) antes de cargar en el cartucho.

Procedimiento:

- Colocar el cartucho analítico que contiene proteína A, dentro del porta-cartucho, asegurándose de que ambos estén alineados en la misma dirección. Apretar las tuercas de los extremos.
- Colocar este ensamblado en el HPLC.
- Equilibrar el cartucho con el buffer de unión por 15 minutos a 0.5 ml/min.
- Inyectar la muestra previamente preparada.
- Observar la lectura de la absorbancia, una vez que ésta (la absorbancia) retorne a su línea base proseguir con el siguiente paso.
- Cambiar a el buffer de elución. La IgG eluirá ligeramene detrás de la interfase del buffer de elución.
- Mantener el cartucho en un buffer suave, neutral.
- Llenar la bomba con buffer de almacenamiento o agua, previo a cerrar el sistema.

La matriz Affi-Prep protein A no necesita ser regenerada. Si se desea, regenerar el cartucho de Affi-Prep protein A con metanol al 50% después de cada uso. El cartucho puede ser lavado con NaOH 0.1 N cada 5-10 corridas para un lavado más riguroso. El lavado con NaOH podría solamente ser utilizado después del paso de regeneración con metanol. Los antígenos así purificados deberán evaluarse por medio de inmunoblot.

7.3.8. Purificación por Inmunofinidad con Agarosa-Hidrazida Affi-Gel (Bio-Rad 153-6047):

Buffer de Dilución (A) Na Acetato 100 mM

Buffer (B) NaCl 150 mM pH 5.5

Diálisis de anticuerpo purificado:

- Dializar el anticuerpo purificado en un volumen 1,000 veces mayor buffer(A), pH 5.5. toda la noche a 4°C.

Preparación del anticuerpo:

El anticuerpo (IgG) previamente purificado por columna de afinidad, debe de oxidarse con periodato de sodio, el cual es un poderoso oxidante por lo que debe manipularse con CUIDADO evitando contacto e inhalación:

- Hacer una solución stock de periodato de sodio 25mg/1.2 ml de agua destilada y desionizada. Mezclar bien. Guardar este stock en la obscuridad.
- Agregar 0.1 volumen de solución stock al anticuerpo purificado (p.e. 2 ml solución stock a 20 ml de anticuerpo).
- Realizar la oxidación de la IgG en un recipiente de propileno cubierto con papel aluminio. Mezcle a temperatura ambiente por 1 hora.
- Inmediatamente agregar glicerol a una concentración final de 20 mM y seguidamente mezcle por 10 minutos.
- Dializar la IgG oxidada como se indicó arriba. El periodato de sodio remanente podría afectar en la eficiencia de unión.

Lavado del gel Affi-Gel HZ:

El gel de agarosa-hidrazida está suspendido en isopropanol, el cual debe de removerse:

- Dejar reposar el gel de hidrazida en un beaker. Remover el isopropanol sobrenadante.
- Agregar un volumen igual de buffer (A) y dejar reposar. Remueva el buffer sobrenadante. Repita los lavados sucesivamente.

Unión de la IgG oxidada con el gel de hidrazida

- Agregar la IgG oxidada y dializada al gel lavado.

- Dejar en reposo 10 - 24 hrs a temperatura ambiente con rotación. No usar magneto.

- Luego que la reacción se complete, colocar el gel/IgG dentro de la columna, coleccionar el eluido y medir el volumen.

- Lavar el gel con un volumen de buffer adecuado conteniendo NaCl 0.5 M (ejemplo: 20 mM fosfato, 0.5 M NaCl).

Colectar el eluido de columna y guardar para determinación de eficiencia.

- Lavar la columna con una aplicación de buffer conteniendo azida de sodio 0.02%. Si se utilizan buffer 20mM fosfato, 0.5M NaCl, pH7, equilibrar la columna en 10 volúmenes con este buffer. Guardar la columna a 4°C.

7.3.9. Purificación de Antígenos de *Campylobacter jejuni* por medio de columna de inmunoafinidad.

Preparación de la muestra (antígenos):

- Preparar una suspensión de células lavadas de *C.jejuni* en 15 ml de buffer 1 de unión a una turbidez comparable al 10 de McFarland.

- Agregar 0.5 mls de SDS.

Preparación de la Columna:

- Utilizar una columna pequeña, puede ser una jeringa de 5 ml provista de perlas siliconizadas, mesh de 140-270 (Sigma G-9139) en el extremo inferior. Colocar la columna en un soporte de tal manera que quede en posición perfectamente vertical.

- Vertir 2 ml de gel de hidrazida a temperatura ambiente dentro de la columna y eluir lentamente (20 ml/hora) hasta que sedimente.

En ningún momento deje de secar la matriz. Agregar más PBS pH 8 si es necesario hasta completar el empaque o sedimentación de la matriz.

- Lavar la columna con 3 volúmenes de PSB pH 8.

- La columna ahora estará lista para usarse. De no ser así almacenar a 4°C en PSB pH8 conteniendo 0.05% de azida de

sodio.

Cromatografía de afinidad:

a) Saturación de la columna:

- Cargar la muestra preparada anteriormente en la columna agregando cantidades de 1 ml de la misma, eluyéndola a un flujo de 20 ml/hr. Guardar estos eluidos para la determinación de proteínas.

b) Elución de los antígenos:

- Vertir en la columna el buffer pH 3.5 de elución. Colectar este eluido en fracciones de 1 ml en tubos que contengan 400 µl de Tris-HCL 50 mM pH 9 para evitar el posterior deterioro de las proteínas colectadas.

- Determinar la cantidad de proteínas presentes en cada uno.
7.3.10. Evaluación de actividad antigenica de las proteínas obtenidas, por medio de Western Blot (Inmunoblot)

- Realizar la electroforesis de proteínas tal como se indicó en el inciso 7.3.1 haciendo gel sandwich para colorear y transferir posteriormente. Coloque en los pozos de muestra 10 µl de las distintas colecciones de eluido tanto en unión como elución. No olvidar de correr los estándares de peso molecular y una muestra de Campylobacter jejuni.

- *El inmunoblot se realiza como indica el numeral 8.3.2., utilizando como anticuerpo un pool de leches maternas y como respectivo conjugado antiIgA.*

7.4. Diseño de la investigación:

Tipo de estudio:

Los datos obtenidos a partir de los tres antígenos se analizaron mediante estadística descriptiva con porcentajes, tablas y gráficas.

8. RESULTADOS

Se produjeron antisueros policlonales contra cada una de las bandas de antígenos de alto peso molecular (95, 110 y 185 kDa) de Campylobacter jejuni^(**2). Las etapas de purificación de estos antisueros fueron las siguientes:

- Precipitación con solución saturada de sulfato de amonio (769 g/litro).

- Purificación a través de la columna de proteína A en condiciones de cromatografía líquida de alta presión (HPLC)^{(***)3}. El cuadro uno y dos (anexo cuatro) se refiere a los resultados de esta purificación.

Luego de cada paso de purificación, se evaluó la actividad antigénica de estos antisueros por medio de *immunoblot*, ensayándose contra antígenos de C.jejuni así como también contra antígenos de Escherichia coli, Shigela spp, Salmonella spp y Vibrio cholerae. Se observa reacción positiva para distintas bandas de C.jejuni y estas enterobacterias (Ver anexo No. 5).

Con cada uno de los antisueros específicos para cada antígeno de interés purificado de C.jejuni, se hicieron columnas de afinidad, por medio del proceso de oxidación y posteriormente uniéndolos a un soporte de sefarosa unida a hidrazida. Las matrices fueron evaluadas en cuanto a su capacidad de fijación de anticuerpo. La tabla No. 1 muestra la cantidad de proteína e inmunoglobulinas unidas a las columnas.

* El anexo tres ilustra los pasos que se llevaron a cabo en este trabajo.

** Bio Rad 153-6164, Afi-Prep Protein A MAPS II Kit

Tabla 1. Porcentaje de proteína unida y cantidad de IgG por ml de columna.

Columna	%proteína	mg IgG/ml de columna
I (anti-proteína 95 kDa)	72.22	0.36
II (anti-proteína 110 kDa)	66.66	0.50
III (anti-proteína 185 kDa)	50.00	0.57

Se prepararon tres columnas de 1 ml en jeringas con capacidad de 5 ml, con un flujo de elución de 4 ml/min. Cada columna fue saturada a un pH 9.0 con un volumen promedio de 12 ml de solución de C.jejuni (20 ml/dl de proteína) (anexo No. 6). En la tabla No. 2 se muestra la cantidad de proteína obtenida por elución de la columna de las proteínas de alto peso molecular de C.jejuni en condiciones ácidas (pH de 3.0).

Tabla 2. Proteína obtenida por elución

Columna	Proteína de <u>C.jejuni</u> (mg/dl) elución de antígenos (pK 3.0)
I (95 kDa)	9.81
II (110 kDa)	5.84
III (185 kDa)	6.25

Por medio de un inmunoblot utilizando como anticuerpo un pool de leches maternas (ver 8.3.2.) del estudio inicial⁽³⁸⁾ en el que se identificaron las fracciones asociadas con protección (95, 110 y 185 kDa). En este blot se observa la presencia de bandas que muestran similitudes entre cada uno de los antígenos obtenidos.

9. DISCUSION DE RESULTADOS.

Las bandas observadas en el inmunoblot que evaluó los antisueros policlonales producidos (Anexo No. 5) demuestran que éstos reconocen la mayoría de bandas que pertenecen a C.jejuni y a algunas bandas de otras enterobacterias. Esto puede ocurrir por lo siguiente:

9.1 Las proteínas en presencia de dodecil sulfato de sodio son desnaturalizadas. En este caso, puede tratarse de proteínas multiméricas que se disocian en cadenas de polipéptidos de pesos moleculares distintos.

9.2 Los antisueros obtenidos reconocen también bandas de proteínas de otras enterobacterias, lo que puede ocurrir puesto que reconocen la banda de lipopolisacárido, una proteína común en las bacterias Gram negativo.

9.3 La producción de antisueros policlonales pueden tener como consecuencia el reconocimiento de las bandas de éstos para antígenos de toda la célula de C.jejuni, ya que este fenómeno se observó tanto antes como después de los distintos tratamientos de purificación.

Para la purificación de los antisueros por medio de la utilización de la columna de cromatografía líquida de alta presión se presentó el inconveniente de ser un método muy lento para purificar los antisueros (flujo de 0.5 ml/minuto), aunque se obtuvo una buena cantidad de proteína purificada por este método (anexo cuatro). Otro problema presentado fue la utilización de buffers de fosfatos (que son especiales para la utilización del cartucho empacado con proteína A) los cuales se precipitaban fácilmente a lo largo de la tubería del cromatógrafo por lo que se debía de estar lavando constantemente, retrasando la continuidad del trabajo. Este método resulta ser sumamente costoso, pues es necesario contar con un cromatógrafo HPLC y el costo de la columna empacada con proteína A es alto. Otro método de elección utilizando columna de proteína A para la cromatografía por flujo de gravedad, para una purificación más

fácil y barata, el cual se puede llevar a cabo en cualquier laboratorio de investigación.

Para la elaboración de las columnas de afinidad, se siguieron las instrucciones del productor, obteniendo un porcentaje de proteína unida al soporte de agarosa unida a hidrazida ($x = 62.96\%$), es aceptable, pero la cantidad de IgG unida a la columna de afinidad ($x = 0.46 \text{ mg/ml}$; $IC_{50} = 0.22-0.74$) es bastante bajo comparado con el que se requiere para obtener resultados óptimos que debe ser entre 1-10 mg de anticuerpo/ml de columna⁽⁵⁸⁾.

El primer paso de la purificación por inmovilización fue el de saturar cada columna con solución de C. jejuni (20 mg/dl de proteína) con 5% de SDS (para separar previamente las proteínas de superficie de la pared celular de la bacteria), logrando con esto, la elución de proteínas inespecíficas, minimizando la absorción no específica al anticuerpo inmovilizado. El flujo de elución de la columna (4ml/min) hizo posible que el tiempo de unión del complejo Ag-Ac fuera adecuado (aprox. 1 hora).

La cantidad de proteína eluida de la columna ($x = 7.32 \text{ mg/dl}$; $IC_{50} = 1.88-12.72$) es menor a la cantidad de proteína inicial sometida al proceso de inmovilización (20 mg/dl). Las proteínas restantes pudieron quedar atrapadas en la columna porque no fueron reconocidas por el anticuerpo inmovilizado en el soporte o bien porque las condiciones de elución no fueron lo suficientemente drásticas para destruir el complejo antígeno-anticuerpo formado y no lograr la completa elución de proteínas.

Las condiciones de acoplamiento y orientación del anticuerpo hacia las matrices de cromatografía deben mejorarse, ya que dicha orientación puede ser al azar, y por consiguiente, la eficiencia de la interacción del complejo Ag-Ac puede decrecer. Se recomienda utilizar entrecruzadores químicos tales como dimetil pimelidato de sodio o antimunoglobulina unida a Affi-Gel⁽⁵⁹⁾.

Las condiciones de la unión de antígeno se optimizaron utilizando buffers con rangos de pH entre 7-9, ya que estas

moléculas tienen un punto isoeléctrico dentro de ese rango y se mantienen estables, mientras que en condiciones ácidas el equilibrio de la reacción Ag-Ac se rompe por lo que la elución de los antígenos se llevó a cabo cambiando de pH 9 a pH 3.

La cantidad de antígenos obtenida (7.32 mg/dl, 20 ml) en estas condiciones de elución es muy escasa para realizar pruebas de caracterización bioquímica con resultados reproducibles.

El blot obtenido de estos antígenos purificados muestra el apareamiento de una sola banda similar para los tres antígenos (inicialmente de peso molecular 95, 110 y 185 kDa) de peso molecular de 73 kDa la cual fue reconocida por el pool de leches maternas.

10. CONCLUSIONES

- La utilización de electroforesis de proteínas para separar proteínas de superficie de *C. jejuni* de alto peso molecular, 95, 110, 185 kDa, resultó ser lo suficientemente adecuada para la obtención de dichos antígenos por medio de la visualización de sus distintas bandas.
- La preparación de antisueros polivalentes contra proteínas de alto peso molecular de *C. jejuni* se llevó a cabo mediante la inoculación en conejos de las bandas obtenidas por medio de electroforesis e inmunoblot.
- La purificación de los antisueros polivalentes obtenidos se llevó a cabo por medio de precipitación con sulfato de amonio y luego por medio de cromatografía líquida de alta presión con columnas de proteína A, la cual ofrece buenos resultados en cuanto a medición de proteínas rápida y alta cantidad de proteínas purificadas.
- Las columnas de inmunoafinidad preparadas a partir de los antisueños obtenidos, utilizando como matriz hidrazida presentaron un porcentaje de proteína unida a la columna de 72.22, 66.66 y 50.00 % respectivamente y una cantidad de IgG de 0.36, 0.5 y 0.57 mg/ml de columna, los cuales, en comparación con la cantidad recomendada (1 a 10 mg de anticuerpo por ml de matriz), son bajos.
- No se realizó la evaluación preliminar de las propiedades antigénicas de los antígenos purificados por que no se obtuvo una cantidad adecuada para montar una prueba de EIA en suero.
- La caracterización bioquímica de los antígenos obtenidos no se llevó a cabo por que no se obtuvo una cantidad adecuada para montar este tipo de pruebas con resultados reproducibles.

11. RECOMENDACIONES

- Producir antisueros monoclonales para cada una de las bandas de proteína de 95, 110 y 185 kDa de *C. jejuni*, para mejorar la especificidad del anticuerpo obtenido.
- Las condiciones de orientación del anticuerpo unido a la matriz pueden mejorarse agregando una antiinmunoglobulina al Affi-Gel, optimizando así las condiciones de orientación del anticuerpo, para aumentar luego la eficiencia de la interacción del complejo Ag-Ac e incrementar la cantidad de antígeno reconocido y atrapado por la columna.
- El cambio de pH de la columna de afinidad (de pH 9 a pH 3) provoca la disociación del complejo Ag-Ac provocando la elución de los antígenos atrapados en la misma; los resultados obtenidos demuestran que la cantidad de éstos es muy escasa, por lo que se cree que el cambio de pH no es una condición lo suficientemente efectiva para lograr una mayor cantidad de antígeno eluido.
- La cromatografía líquida de alta resolución tiene la desventaja de ser un método caro en cuanto a adquisición y mantenimiento, por lo que se recomienda utilizar una columna de afinidad para cromatografía de flujo por gravedad (p.e. Econo-Pac Protein A kit, Bio-Rad 732-2020), siendo un método más accesible y fácil de usar, con resultados similares a los obtenidos con el método de cromatografía líquida de alta presión, reduciendo así los costos de operación y se obtendrían cantidades mayores de antígenos para realizar pruebas de caracterización bioquímica.
- Incubar la matriz que se utilizará para fabricar la columna de afinidad con antiinmunoglobulina para mejor orientación del anticuerpo utilizado.

12. REFERENCIAS

1. Diálogo sobre la Diarrea, No. 48: junio - septiembre 1994; AHRTAG OPS/OMS.
2. Ashraful HJ, Kazi MR. Campylobacter jejuni as a cause of acute diarrhoea in children: a study at an urban hospital in Bangladesh. J Tropical Med and Hygiene. 1991; 94: 50-54.
3. Diálogo Sobre la Diarrea No. 48: octubre - diciembre 1994; AHRTAG OPS/OMS.
4. Cruz JR, et al. Infection, diarrhea, and dysentery caused by Shigella species and Campylobacter jejuni among Guatemala rural children. Ped Infect Dis J 1994; 13:216-23 .
5. Black R, Levine M. Experimental C. jejuni infection in humans. J Infect Diseases 1988; 157: 1102-1104.
6. Cover T, Elaser M. The pathobiology of Campylobacter spp infections in humans. An Rev Med 1989; 40: 269-83.
7. Nachamkin I, et al. Campylobacter and Arcobacter. p. 483-491. (In Murray P, Baron E. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed Washington DC: ASM Press Washington. xxiii + 1437 p).
8. Laboratory Center for Disease Control: Division of enteric Bacteriology. National Reference Service for Campylobacter. Ottawa, Ontario, Canada. Doc. Tec. 1990. 10 p.
9. Gini G. Manual de Procedimientos para Microbiología Clínica. Guatemala: Merck Centroamericana. 1990. 65 p.
10. Walker R, et al. Pathophysiology of Campylobacter Enteritis. Microbiol Reviews 1986; 3: 81-94.

11. Boer E, Humpherey TJ. Comparison of methods for the isolation of thermophilic Campylobacter from chicken products. (In International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organism Vol 4(5) 51 1991 Sidney, Australia. John Willey & Sons Ltda)
12. Wen-Lan, et al. Evaluation of transport media for Campylobacter jejuni in human fecal specimens. J of Clin Microbiol 1983; 18: 803-807.
13. Park CH, et al. A rapid diagnosis of Campylobacter enteritis by direct smear examination. Am J Clin Pathol 1983; 80:388-390.
14. Sazie ES, Titus AE. Rapid diagnosis of Campylobacter enteritis. Ann Intern Med. 1982; 96:62-63.
15. Thompson JS, et al. Use of tri-gas incubator for routine specimens. J Clin Microbiol 1990; 28: 2808-2803.
16. Goosens H, et al. Modified selective medium for isolation of Campylobacter spp from feces: comparison with Prestom Medium, a blood free medium and a filtration system. J Clin Microbiol. 1986; 24: 840-843.
17. Goosens H, et al. Comparison of the solid and semisolid selective medium with the filtration method for the isolation of Campylobacter jejuni, Campylobacter coli and Campylobacter laridis from stool specimens: a five year study. J Clin Microbiol. 1987; 27: 1077-1080.
18. Shanker S, et al. Sensitivity of a filtration method for detection of Campylobacter, Helicobacter spp in faeces. J Clin Microbiol 1988 26: 47-49.

19. Bopp CA, et al. In vitro antimicrobial susceptibility plasmid analysis and serotyping of epidemic associated Campylobacter jejuni J of Clin Microbiol 1985; 21: 4-7.
20. Maggi L, et al. Campylobacter jejuni y Campylobacter coli marcadores epidemiológicos en cepas aisladas en Santiago. Rev Med Chile. 1988; 116: 1105-1110.
21. Hernandez J, Owen R. Biotypes and DNA ribopatterns of thermophilic Campylobacters from faeces and seawater in Eastern Spain. Lett in Appl Microbiol 1991; 13: 207-219.
22. Kiehlbauch J, Plikaytis E. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal genes for species identification and subtyping of Aerotolerant Campylobacter species. J of Clin Microbiol 1991; 29: 1670-1676.
23. López JV, Infecciones por Campylobacter jejuni en niños: ¿infecciones recurrentes o persistentes? Comparación de cepas por ribotipia (Tesis de graduación) 1994. 60 p.
24. Kiehlbauch J, et al. Chromosomal DNA fingerprinting: a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. J Med Microbiol 1989; 30: 89.
25. Nujten P, et al. Size and physical map of the Campylobacter jejuni chromosome. Nuc Ac Res 1991; 18: 6211-6213.
26. Blaser MJ, et al. Epidemiology of Campylobacter jejuni infections. Epidemiol Rev 1983;5:157-163.
27. Perez-Perez G, et al. Clinical and Immunologic significance of cholera-like toxin and Cytotoxin production by Campylobacter species in patients with acute inflammatory diarrhea in the united

Acta Pediatric 1993:82; 835-8.

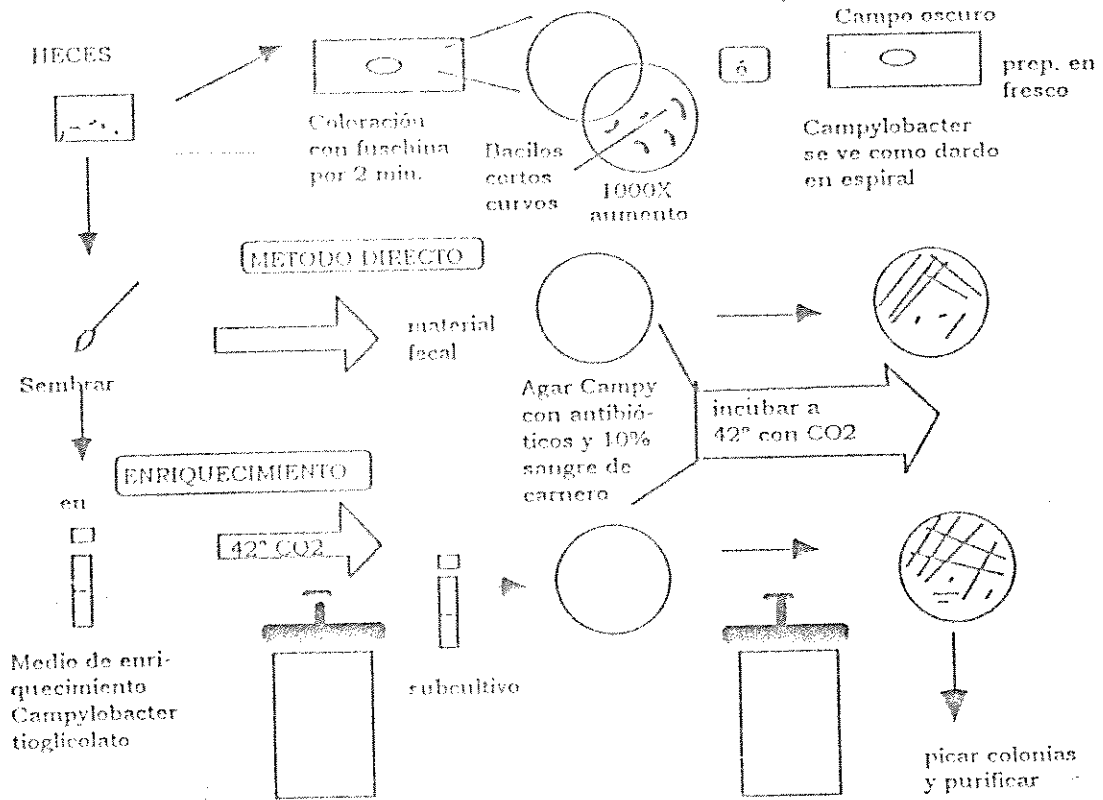
37. Kuroki S, et al. Guillian Barre syndrome associated with Campylobacter spp infection. International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organism. Vol 4(5) 51 1991. Sidney, Australia. John Willey & Sons Ltda.
38. Blaser M. Campylobacter species p. 1649-1658. (In Mandell GL, et al. Principles and practice of infectious diseases. Churchill Livingstone, New York, 1989. xxx+ 3689 p).
39. Taylor D, et al. Influence of Strains characterictics and immunity on the epidemiology of Campylobacter spp. infections in Thailand. J of Clin Microbiol 1988; 26:863-868.
40. Martin P, et al. Immune response to Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in a cohort of children from birth to years of age. Infect and Immun 1989; 57: 2542-2546.
41. Ruiz Palacios GM, et al. Serum immune response to Campylobacter jejuni infection in young children. Microbial Ecology in Health and Disease Abstracts. VI International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and related organism. Vol 4 (5) 1991. Sidneym Australia, John Willey & Sone Ltda.
42. Cruz, JR. Propiedades anti-infecciosas de la Leche Humana. Revisión con énfasis en observaciones en la población centroamericana. INCAP, Doc tec E-1200 25 p (p. 5-10).
43. Mascart-Lemone F, et al. Kinetics of Anti- Campylobacter jejuni monomeric and polymeric Immunoglobulin A1 and A2 response in Serum during acute enteitis. J of Clin Microbiol. 1987; 25:1253-1257.
44. Pearson AD, et al. Colonization of Broiler Chickens by

46. Campylobacter jejuni Applied and Environmental Microbiology. 1993, 4:987-996.
47. Hsu J, et al. Production of hyperimmune bovin colostrum against Campylobacter jejuni. J App Bacteriol 1993;74: 564-569.
48. Field L, et al. Virulence of Campylobacter jejuni for chickens embryos is associated with decreased bloodstream clearance and resistance to phagocytosis. Infect and Immun 1991; 59: 1448-1456.
49. Hunt J. Campylobacter. 357-418. (In Foods and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual 7th ed. 1992 AOAC International Arlington.)
50. Stern N, et al. Campylobacter. 765-796. (In Compendium of Methods for the microbiological examination of foods. 3th edition Venderzant C, Spleho DF APHA Technical Comitee on Microbiological Methods for foods.)
51. Gresendore BA, et al. Rapid and Sensitive detection of Campylobacter spp in chicken products by using the Polimerase Chain Reaction. Appl and Env Microbiol 1992; 58: 3804-3809.
52. Pazzaglia G, et al. Campylobacter jejuni versus Campylobacter coli in developing countries: How accurate are prevalence estimates? J of Infect Diseases 1990; 162:570.
53. Magie M, et al. Effect of enteroviruses on adherence to and invasion of Hep-2 cells by Campylobacter spp isolates. Infect and Immun 1990; 58: 1101-1105.
54. Wu SJ, et al. Identification of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli Antigens with Mucosal and Systemic Antibodies. Infect and Immun 1991;45:2555-2559.

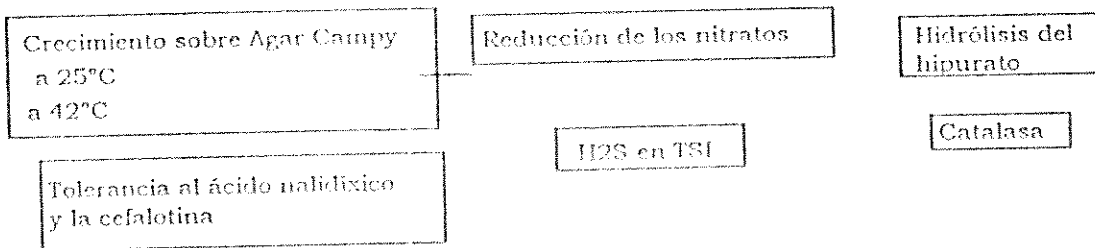
53. Johnstone A, Thorpe R. *Immunochemistry in practice* 2nd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications 1988, 306 p (30-35p)
- 54 Harlow E, Lane D. *Antibodies: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1988. 300p (92-105 pp.)
55. Center For Disease Control *Preparación de Antígenos Doc. Tec.* 1982, 3p.
56. Center For Disease Control *Preparación de Antígenos Rosecka de E. coli Doc Tec.* 1982, 2p.
57. Lehninger A. *Bioquímica, curso breve*. Bozal P. trad. 2da ed Barcelona: Ediciones Omega, 1985, 450 p (80-81 pp).
58. Walker J, ed. *Methods in Molecular Biology, Proteins*. 1984. Vol I. Clifton, New Jersey: Human Press. v + 364 p. (13-21 pp).
59. Catsimopoulos N. *Isoelectrical Focussing* Academic Press N York, San Francisco, London, 1976. xi, 259 p 1976.

13. ANEXOS.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE Campylobacter

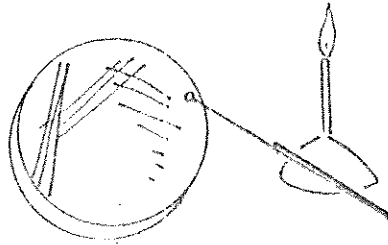


PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACION Y DIFERENCIACION:

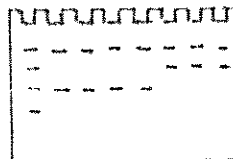


Esquema No. 1 Tomado de Cini G. Manual de Procedimientos para Microbiología Clínica (9)

DIAGRAMA DE FLUJO DE TRABAJO



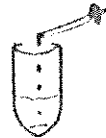
Recuperación de cultivos
stock de *C. jejuni*.



Comprobación y purificación
por medio de electroforesis
de las bandas de alto peso
molecular de *C. jejuni*



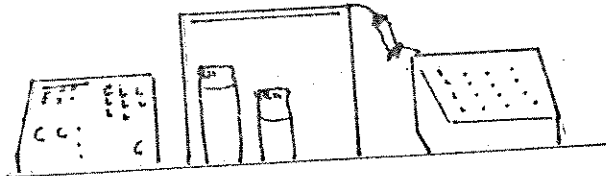
Producción de antisueros
en conejos



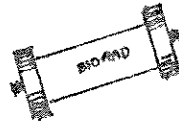
Primera purificación de
antisueros obtenidos
(precipitación con sulfato de amonio)

.../sigue

.../ continuación



Segunda purificación de antisueros
(proteína A HPLC)



(cromatografía líquida de alta presión con proteína A)



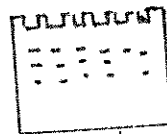
Montaje de columnas de inmunofinidad
utilizando los antisueros purificados



Recuperación de cultivos de *C. jejuni*
(preparación de antígenos con SDS)



Pasar estos antígenos a través de la
columna de afinidad preparada previamente



Evaluación de proteínas obtenidas

ANEXO No. 4

Cuadro 1.

Cantidades de antisuero obtenidas y cantidades de proteínas medidas (método de Biuret) antes y después de su precipitación con sulfato de amonio

Antisuero	Cantidad Obtenida ml	Proteína (ml/dl) antes	Proteína (ml/dl) después	Cantidad obtenida después
1	20	2.7	2.4	12
2	13	1.8	1.8	5
3	20	2.6	2.4	10

Cuadro 2.

Cantidades de antisuero purificadas y cantidad de proteínas medidas (método de Biuret) antes y después de su purificación con proteína A (HPLC)

Antisuero	Cantidad ml	Proteína (ml/dl)	Proteína (ml/dl) purificada HPLC	Cantidad ml diluída en eluyente
1	12	2.4	1.8	20
2	5	1.8	0.8	15
3	10	2.4	1.6	15

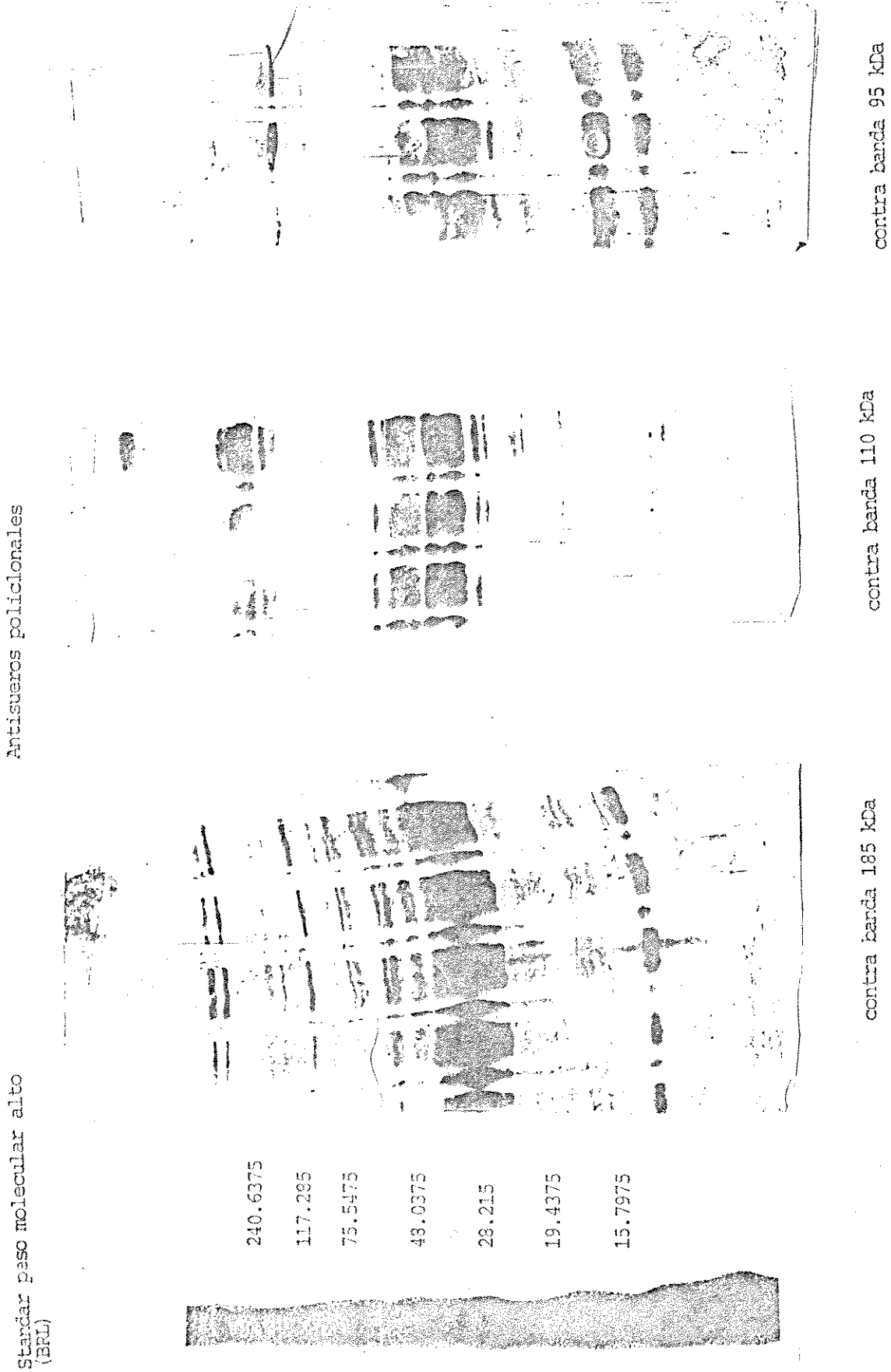
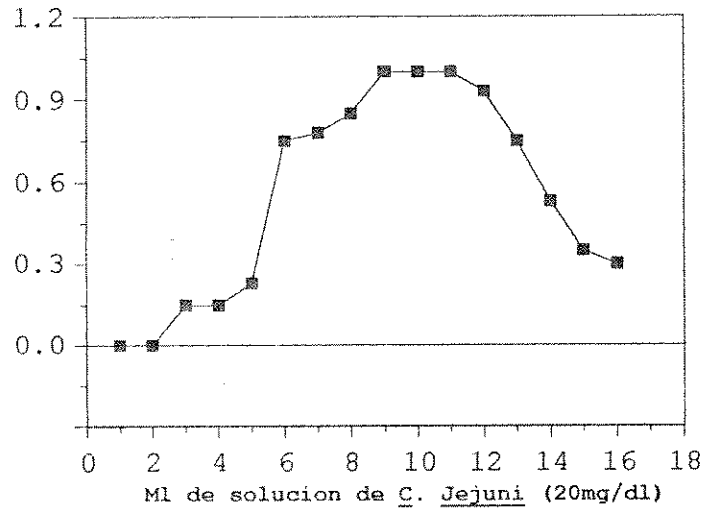


FIG. 1. Evaluación de los antisueros policlonales producidos contra cada una de las bandas de alto peso molecular (95,110 y 185 kDa) de *Campylobacter jejuni*, *contra banda de 185 kDa*. Se utilizó como antígeno cultivos puros de esta bac-

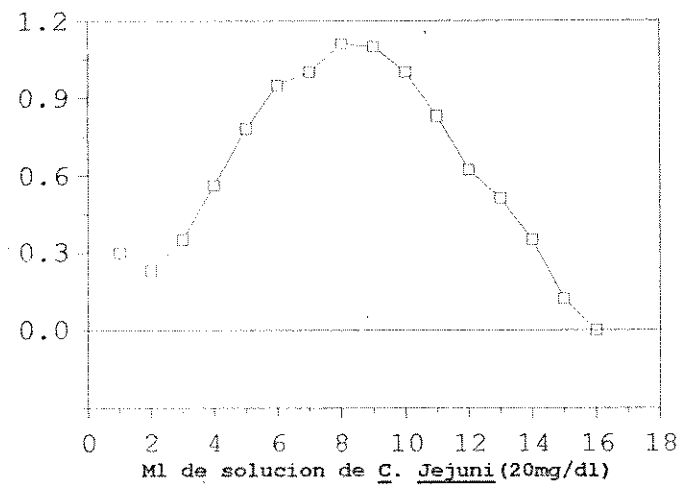
**Columna de Afinidad : Antígeno de Superficie de C. jejuni de 95 KDa
Saturación de la Columna**

Proteínas mg/dl



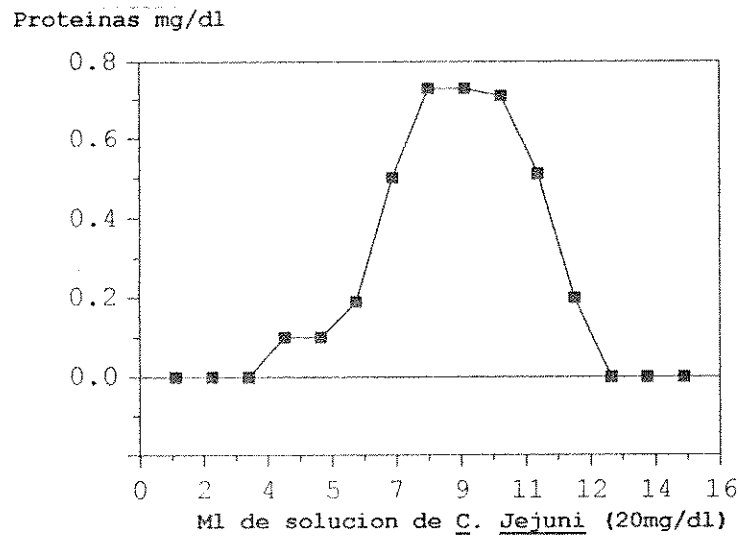
Elución de la Columna

Proteínas mg/dl

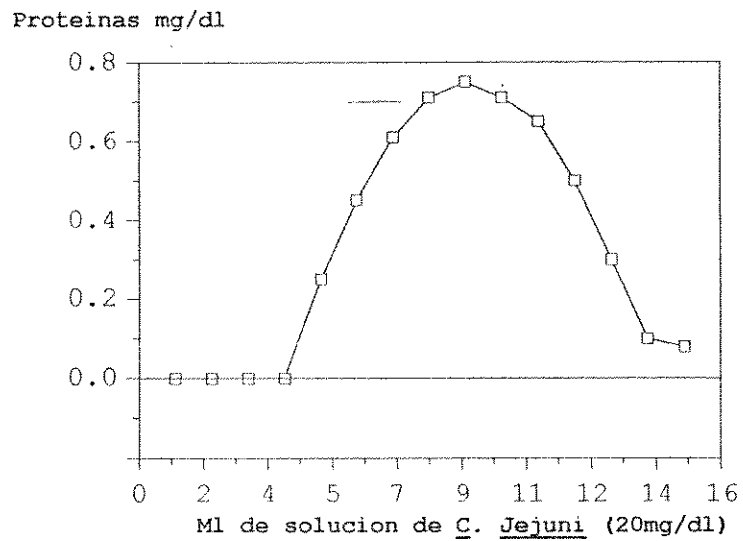


Columna de Afinidad : Antígeno de Superficie de C. jejuni de 110 KDa

Saturación de la Columna



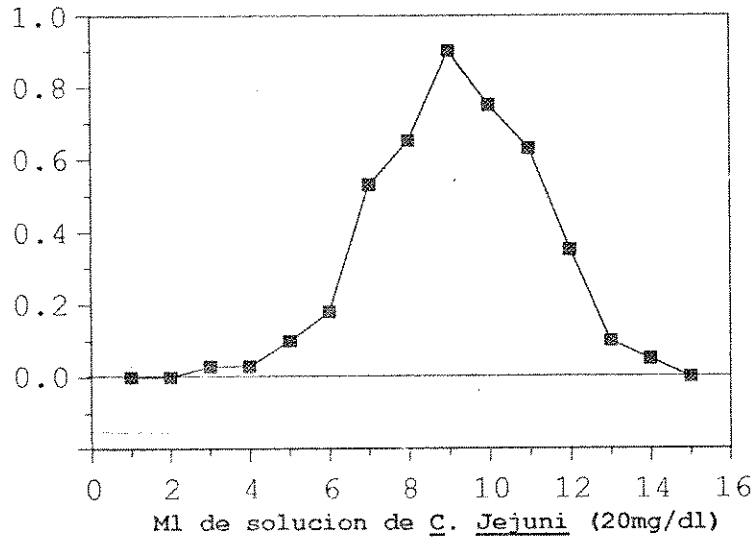
Elución de la Columna



Columna de Afinidad : Antígeno de Superficie de C. jejuni de 185 KDa

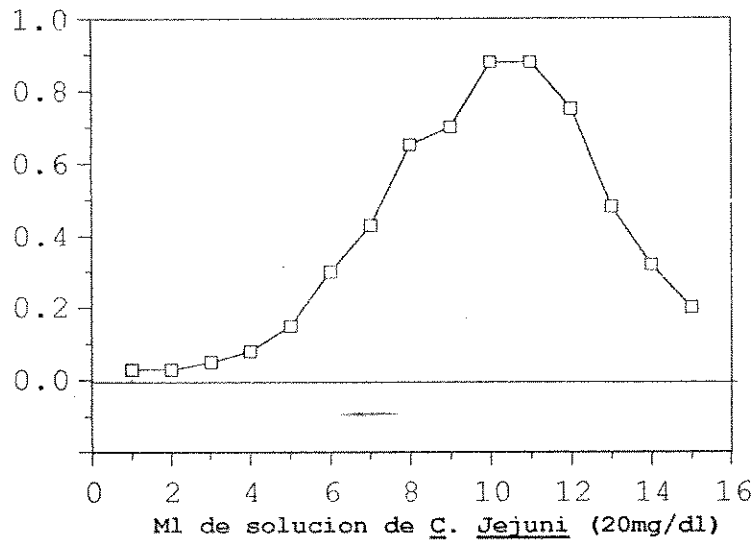
Saturación de la Columna

Proteínas mg/dl



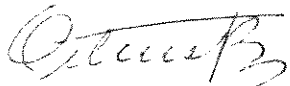
Elución de la Columna

Proteínas mg/dl






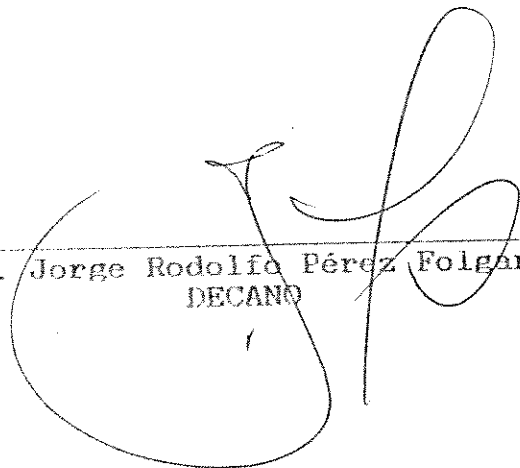
Magda Teresa Catalina Flores López
TESISTA



Licda. Olga Rebeca Torres de Matute
ASESORA



Lic. Gerardo Leónel Arroyo Catalán
DIRECTOR DE ESCUELA



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
DECANO