

PARTICIPACION DE EPITOPES FLAGELARES DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* EN LA ADHESION CELULAREDILIA ANDREWS¹, HERIBERTO FERNANDEZ², HUGO FOLCH³, GISELA ELLER³,
MIREILLE POLLETTE⁴¹ Departamento de Microbiología, Universidad de Concepción; ² Instituto de Microbiología Clínica e³ Instituto de Inmunología, Facultad de Medicina, ⁴ Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

Resumen Utilizando una cepa flagelada (052) y una aflagelada (T-1), se estudió la participación de epítopes flagelares de *C. jejuni* en la adhesión a células HEp-2 *in vitro*. La cepa 052 presentó una capacidad de adhesión significativamente mayor que la cepa T-1. Cuando los ensayos de adhesión fueron realizados en presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopes flagelares, la capacidad de adhesión de la cepa 052 experimentó una inhibición que fluctuó entre 64,3 y 92,9%. Mediante una prueba de ELISA se comprobó que estos anticuerpos monoclonales eran específicos y estaban dirigidos exclusivamente contra epítopes flagelares de la cepa 052, no reaccionando con la cepa T-1. Estos resultados demuestran que epítopes flagelares de *C. jejuni* estarían participando en el proceso de adhesión, sugiriendo la intervención del flagelo en la instalación del proceso infeccioso.

Palabras clave: *Campylobacter jejuni*, adhesión, flagelo, anticuerpos monoclonales

Campylobacter jejuni es un bacilo Gram negativo curvo, de carácter zoonótico, reconocido como importante agente productor de diarrea en el hombre, tanto en países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo^{1,2}. Esta bacteria ha sido aislada como patógeno entérico en prácticamente todos los países latinoamericanos, con frecuencias variables (México 5,3%, Argentina 6,1%, Venezuela 9,2%, Chile 5,7-14,1%, Brasil 7,3-18,5%, Panamá 11,7%, Perú 15-23% y Ecuador 23%), posiblemente debido a las condiciones ecológicas propias de cada lugar, que intervienen en el ciclo epidemiológico de *C. jejuni*².

Es importante conocer los factores de virulencia de las diferentes bacterias patógenas, tanto para entender los procesos involucrados en la interacción huésped-parásito como para conocer de su existencia en cepas aisladas de diversos

orígenes, en especial en bacterias como *C. jejuni* cuya distribución en la naturaleza es bastante amplia². Los mecanismos de patogenidad identificados en *C. jejuni* son la capacidad para producir toxinas y para invadir el epitelio intestinal. La adhesión a superficies mucosas ha sido descrita recientemente como otro de sus factores de virulencia, la cual estaría mediada por el lipopolisacárido, algunas proteínas de membrana externa y el flagelo^{3,4}.

La adhesión en *Campylobacter* ha sido observada utilizando cultivos celulares^{5,6,7}. Sin embargo, las estructuras responsables de este proceso no han sido bien definidas. Varios trabajos realizados en animales de experimentación han aportado evidencias de la participación del flagelo en la colonización intestinal, sugiriendo su rol como eventual adhesina e indicando que el proceso de adhesión de *C. jejuni* a células de mamíferos, supuestamente como etapa previa a la colonización estaría mediado, en gran proporción, por esta estructura bacteriana^{4,6,8,9}. Este hecho reviste importancia para explicar la patogenia del cuadro diarrei-

Recibido: 9-V-1995

Aceptado: 22-IV-1996

Dirección postal: Dr. Heriberto Fernández, Instituto de Microbiología Clínica, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia, Chile

co y, en forma más específica, para explicar los pasos que anteceden a la instalación definitiva del proceso diarreico.

El objetivo de este trabajo fue determinar, en el flagelo de *C. jejuni*, la presencia de epítopes flagelares que pudiesen participar en la adhesión de esta bacteria a células HEp-2.

Material y Métodos

Cepas bacterianas: En este estudio fue utilizada una cepa virulenta de *C. jejuni* (cepa 052), aislada de las deposiciones de un lactante de sexo masculino, de 4 meses de edad, ingresado al Servicio de Pediatría del Hospital Regional de Valdivia, por presentar síndrome diarreico agudo y que no había recibido tratamiento antimicrobiano.

Como control negativo fue utilizada la cepa de *C. jejuni* T-1, una variante aflagelada, cedida por el Dr. M. García del «Laboratory Center for Disease Control», Ontario, Canadá.

Microscopía electrónica (ME) y anticuerpos monoclonales (AM): La presencia o ausencia de flagelos en las cepas estudiadas se estableció por ME, mezclando 250 µl de bacterias con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 2%, pH 6. Las preparaciones, teñidas negativamente, fueron aplicadas a una grilla cubierta con membrana de colodión y film de carbón, siendo observadas en microscopio Philips EM-300 con un voltaje de aceleración de 60 KW¹⁰. Utilizando el mismo método se comprobó la pureza de las preparaciones de flagelos puros, aislados de las células bacterianas por el método de centrifugación diferencial propuesto por Ueki y col¹¹, con los cuales se prepararon AM.

Los AM utilizados (1F12, 2A5, 2A12 y 3A3) fueron obtenidos en el Instituto de Inmunología de la Universidad Austral de Chile por los métodos habituales¹² y su reactividad frente al flagelo de *C. jejuni* fue medida por ELISA⁶ utilizando como antisuero 100 µl de sobrenadante sin diluir del cultivo de los clones. El mismo ensayo se repitió con 100 µl de sonificado de *C. jejuni* T-1. Como control de lectura inespecífica se utilizó suero de ratón no inmunizado diluido 1/500 y como control negativo, medio RPMI-1640. Fueron considerados positivos los sobrenadantes que mostraban lecturas tres veces más altas que la del suero de ratón no inmunizado.

Ensayos de adhesión a células HEp-2: Fueron realizados en monocapas de células HEp-2 cultivadas en placas Lab-Tek de 8 pocillos, con medio RPMI-1640 adicionado de 10% de suero fetal bovino (RPMI-10%)^{5,14}. Las monocapas fueron lavadas dos veces con 1 ml de RPMI-10%, inoculadas con una suspensión (10⁸ u.f.c.) de la cepa 052 o de la cepa T-1 en el mismo medio e incubadas por 18 h a 37°C en estufa de CO₂. Posteriormente, fueron lavadas 5 veces con PBS, fijadas con metanol, teñidas con Giemsa y examinadas por microscopía de contraste de fase (1000X). La adhesión bacteriana fue determinada siguiendo el criterio de Lindblom y col¹⁵ considerando que hubo adhesión cuando al menos el 20% de las células HEp-2 presentaban una o más bacterias adheridas.

Ensayos de inhibición de la adhesión: La cepa 052 fue suspendida (10⁸ u.f.c.) en 1 ml del sobrenadante de los hibridomas productores de AM. Cada suspensión fue incubada durante 30 min a 37°C en atmósfera de microaerofilia, centrifugada y los sedimentos bacterianos resuspendidos en RPMI-10%, inoculados en monocapas de células HEp-2, continuando con el procedimiento descrito para los ensayos de adhesión. Se consideró que hubo inhibición significativa de la adhesión cuando ésta experimentó una reducción igual o superior a 50% en relación a los ensayos realizados en ausencia de anticuerpos¹⁶. Como control negativo se utilizó 1 ml de RPMI-10% sin anticuerpos.

Todos los ensayos fueron realizados dos veces, en duplicado. Los resultados se expresaron como la media obtenida en los cuatro ensayos, para cada una de las condiciones experimentales.

Análisis estadístico: El análisis estadístico de los resultados fue realizado utilizando la dócima de proporciones «z»¹⁷.

Resultados

La ME permitió confirmar la presencia de un flagelo de 6,8 µm de longitud en cada extremo de la cepa *C. jejuni* 052 (Fig. 1a). La imagen obtenida por ME de la cepa T-1 aflagelada se muestra en la Fig. 1b. Ninguna de las dos cepas en estudio presentó fimbrias u otras estructuras similares. La centrifugación diferencial resultó apropiada para obtener fracciones del flagelo de longitud variable (0,1-3,0 µm), sin que se observen otras

TABLA 1.— Adhesión de las cepas de *Campylobacter jejuni* 052 (virulenta) y T-1 (variante aflagelada) a células HEp-2.

CEPAS	Adhesión (%)	$\bar{x}$ Bact/cel $\pm$ SD
052	70,0*	4,46 $\pm$ 2,29*
T-1	27,5*	1,36 $\pm$ 0,78*

$\bar{x}$ Bact/cel $\pm$ SD: Promedio de bacterias adherida por célula $\pm$ desviación estándar

* $p < 0,01$

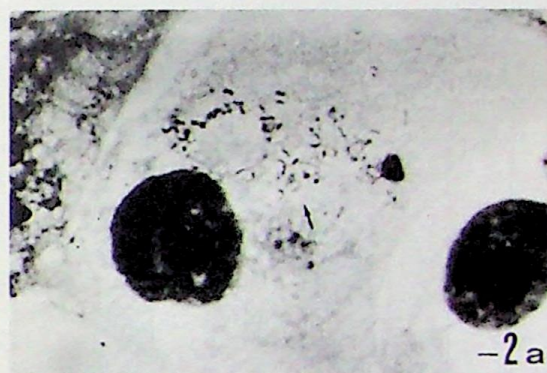
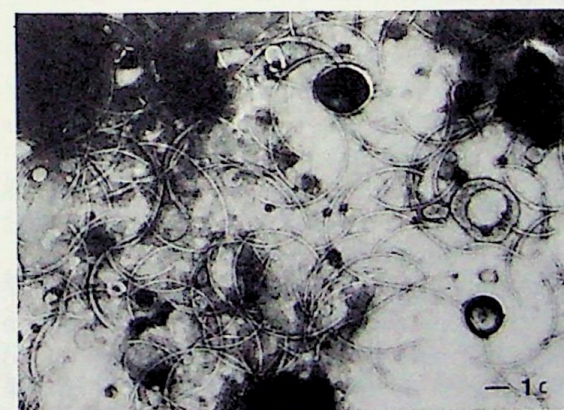
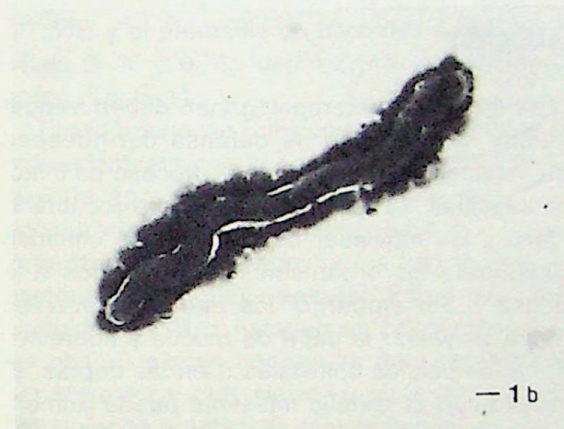
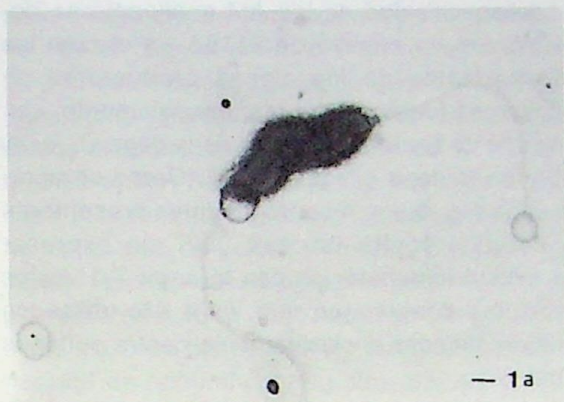


Fig. 2.— Fotomicrografía mostrando (a) adhesión de las cepas 052 y (b) de la cepa T-1 de *C. jejuni* a células HEp-2 (1.000 x). Barra = 8 μ m

Fig. 1.— Fotomicrografía electrónica de *C. jejuni* mostrando (a) una célula flagelada de la cepa 052 (16.000x); (b) una célula aflagelada de la cepa T-1 (16.000 x) y (c) una preparación de flagelos purificados de la cepa 052 (22.572 x). Barra = 1 μ m.

estructuras o partes del cuerpo bacteriano (Fig. 1c).

La interacción de *C. jejuni* con la línea celular HEp-2 se muestra en la Tabla 1. La cepa 052 tie-

ne la capacidad de adherirse a células epiteliales en cultivo (Fig. 2a). El 70% de las células HEp-2 presentaron adhesión bacteriana con un promedio de 4,46 ($\pm$ 2,29) bacterias por célula. La cepa T-1 también demostró capacidad de adherencia (Fig. 2b), aunque en una proporción significativamente menor (27,5%) y con un promedio de 1,36 ($\pm$ 0,78) bacterias adheridas por célula.

TABLA 2.— Subclase de los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales y su efecto sobre la adhesión de la cepa 052 a células HEP-2

CLONES	Subclase Ig G	% de inhibición de la adhesión	$\bar{x}$ Bact/cel $\pm$ SD
1F12	Ig G2a	64,3	3,80 $\pm$ 0,76
2A5	Ig G3	92,9	1,50 $\pm$ 0,55
2A12	Ig G3	78,6	2,70 $\pm$ 1,67
3A3	Ig G3	75,0	1,86 $\pm$ 0,66

$\bar{x}$ Bact/cel $\pm$ SD: Promedio de bacterias adheridas por célula $\pm$ desviación estándar.

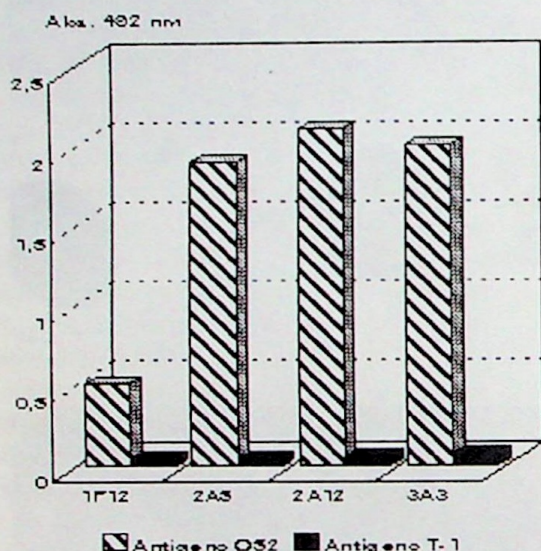


Fig. 3.— Resultados del ELISA de 4 clones anti-flagelo de *Campylobacter* probados contra bacterias enteras de las cepas 052 y T-1.

(Abs. 402 nm = absorbancia a 402 nanómetros).

Establecido el fenómeno de adhesión, se evaluó la actividad de 4 AM anti-flagelo (1F12, 2A5, 2A12, 3A3) en relación a la capacidad de adhesión observada con la cepa 052. Como se detalla en la Tabla 2, todos los AM utilizados fueron capaces de inhibir la adhesión de esta cepa a las células HEP-2. El porcentaje de inhibición más alto (92,9%) lo presentó el anticuerpo producido por el clon 2A5. El AM 1F12, previamente identificado por ELISA como bajo productor de anticuerpos, inhibió en menor porcentaje el fenómeno de adhesión (64,3%) observándose, en estos ensayos, el mayor número de bacterias adheridas por célula.

La especificidad de los AM anti-flagelo se demostró con un ensayo de ELISA en el cual los sobrenadantes de los clones productores de anticuerpos fueron probados, paralelamente, con sonificado de bacterias enteras de la cepa *C. jejuni* 052 y de la cepa aflagelada T-1. Como se aprecia en la Fig. 3, los 4 sobrenadantes presentaron anticuerpos contra la cepa 052, sin expresar reactividad inmunológica con la cepa T-1. Estos resultados demuestran que los 4 AM utilizados estaban dirigidos exclusivamente contra epítopes flagelares.

Discusión

Las bacterias enteropatógenas deben vencer diversos mecanismos de defensa del huésped para establecer exitosamente el proceso de infección intestinal. La capa de mucus que recubre el epitelio y los movimientos peristálticos eliminan rápidamente los organismos no adheridos a la mucosa¹⁸. Sin embargo, las bacterias móviles pueden atravesar la capa de mucus y sobrevivir junto a las células epiteliales o en las criptas. El contacto con el epitelio intestinal puede aumentar, además, a través de la unión mediada por moléculas existentes en la superficie de la bacteria y de la célula epitelial¹⁹. *C. jejuni* es una bacteria que no presenta fimbrias y en cuya superficie tampoco se observa otras estructuras fibrosas, postulándose que las proteínas que potencialmente podrían participar en los procesos de adhesión de la bacteria a las células epiteliales del huésped estarían ubicadas en los flagelos⁴.

En nuestro estudio hemos podido confirmar, por ME la presencia de un flagelo de 6,8 μ m de longitud en cada extremo de la cepa 052 (Fig. 1a) y la ausencia de éstos en la cepa T-1 (Fig. 1b). Ninguna de las dos cepas en estudio presentó fimbrias u otras estructuras similares, lo que concuerda con las observaciones realizadas por Pead¹⁰ y por Hernández y col²⁰.

La importancia de la motilidad de *Campylobacter* como factor de colonización intestinal fue preconizada por Morooka y col⁹ y Diker y col⁸ en un modelo de ratón recién nacido. Newell y McBride⁶, utilizando el mismo modelo experimental, informaron que la colonización fue igualmente eficiente en una cepa silvestre móvil como en una mutante flagelada inmóvil, mientras que con una

cepa aflagelada la colonización fue pobre, sugiriendo que el flagelo, activo o inactivo, es necesario para la colonización del tracto gastro-intestinal de ratón por *C. jejuni*. Con estas evidencias, nos abocamos al estudio de la interacción de *C. jejuni* con la línea celular HEP-2 pudiendo comprobar que la cepa 052 tiene la capacidad de adherirse a células epiteliales en cultivo (Fig. 2a). El 70% de las células HEP-2 presentó adhesión bacteriana con un promedio de $4,46 (\pm 2,29)$ bacterias por célula (Tabla I). La cepa aflagelada T-1 también mostró capacidad de adherencia (Fig. 2b). Sin embargo, la proporción de células con bacterias asociadas (27,5%) y el promedio de bacterias adheridas por célula ($1,36 \pm 0,78$) fueron significativamente menores (Tabla 1).

El fenómeno de adhesión, que fue observado reiteradamente con la cepa *C. jejuni* 052 en una cuantía aproximadamente 3 veces mayor a la encontrada con la cepa aflagelada T-1, sugiere la participación del flagelo en la asociación de la bacteria con la célula epitelial. Estos resultados, obtenidos *in vitro*, estarían en concordancia con las observaciones hechas en modelos animales por Morooka y col⁹, Newell y McBride⁶ y Diker y col⁸ quienes establecen que el flagelo es un factor necesario para promover la colonización intestinal de *C. jejuni* en ratones. Pavloskis y col²¹, utilizando conejos como modelo biológico, también concluyen que los flagelos de *Campylobacter* son necesarios para inducir la colonización intestinal los cuales, además, son capaces de provocar una respuesta inmune protectora.

Establecido el fenómeno de adhesión, se evaluó el efecto de 4 AM anti-flagelo (1F12; 2A5, 2A12, 3A3) sobre la capacidad de adhesión de la cepa 052 (Tabla 2). Cuando se realizaron ensayos de adhesión en presencia de AM, se observó inhibición del fenómeno de adhesión. El anticuerpo producido por el clon 2A5 produjo el efecto inhibitorio más alto (92,9%), lo cual podría indicar que el epítipo al cual se dirige este anticuerpo estaría más expuesto en el flagelo, se presentaría en forma más repetida sobre la molécula o su rol sería más importante en el proceso de adhesión. Alternativamente, podría pensarse que estos resultados se deben solamente a que este anticuerpo tiene mayor afinidad por el epítipo que los AM 3A3 y 2A12, los que ejercieron una acción inhibitoria similar (75% y 78,6 % respectivamente) y menor que la ejercida por el monoclonal

2A5. El AM 1F12, previamente identificado por ELISA como bajo productor de anticuerpos, ejerció el menor efecto inhibitorio sobre el fenómeno de adhesión (64,3%) presentando, además, el mayor número de bacterias adheridas por célula. Las diferencias observadas en relación a la inhibición de la adhesión permiten sospechar que existen epítopos que participarían más eficientemente que otros en la adhesión, ya sea por su configuración o por su ubicación en el filamento flagelar. En un trabajo previo, Newell²² describió la existencia de, al menos, 6 epítopos diferentes en el flagelo de *Campylobacter*.

La especificidad de los AM anti-flagelo se demostró con un ensayo de ELISA en el cual los sobrenadantes de los clones productores de anticuerpos fueron probados, paralelamente, con sonificado de bacterias enteras de las cepas 052 y T-1. Como se observa en la Fig. 3, ninguno de los 4 sobrenadantes que mostraron positividad frente a la cepa 052 reaccionó con la cepa T-1. El hecho que los AM hayan reaccionado sólo con un sonificado de la cepa flagelada demuestra que ellos estaban dirigidos exclusivamente contra epítopos flagelares, los cuales no se encuentran en el sonificado de la cepa T-1, formado únicamente por antígenos somáticos. Por otro lado, estos resultados indican que la centrifugación diferencial¹¹ resultó apropiada para obtener fracciones puras de flagelos, libres de otras estructuras o partes del cuerpo bacteriano (Fig. 1c). Los AM utilizados en este trabajo, todos de la clase IgG, presentaron diferente reactividad inmunológica con la prueba de ELISA, lo cual, junto a los diferentes efectos observados sobre la adhesión, sugieren que los epítopos flagelares parecen ser distintos, participando con diferentes grados de eficiencia en el fenómeno de adhesión y en la inducción de anticuerpos. La inhibición de la adhesión por estos AM podría ser la expresión *in vitro* del efecto protector observado *in vivo* por Pavloskis y col²¹ utilizando anticuerpos policlonales anti-flagelos y por Ueki y col²³ utilizando AM de la clase IgM e IgA. Newell²², utilizando 6 AM de la clase IgG y 2 de la clase IgM, no encontró el efecto protector descrito por Pavloskis y col²¹ y Ueki y col²³. Sin embargo, establece que existirían varios epítopos flagelares, los que por una inadecuada exposición en el flagelo no ejercerían el efecto protector observado por estos autores.

Nuestros resultados demuestran que el flagelo de *Campylobacter* participa en la adhesión y, por tanto, esta estructura tendría participación en la instalación del proceso infeccioso. La proteína flagelar de *C. jejuni* ha sido reconocida como altamente inmunogénica en seres humanos²⁴ y como la inmunidad protectora a bacterias enteropatógenas se asocia con una rápida eliminación del microorganismo en el intestino, estos anticuerpos estarían dirigidos contra antígenos de colonización. Creemos que estudios futuros que permitan una mejor comprensión de las interacciones entre la adhesina y el receptor conducirán a nuevos modos de intervenir en el proceso infeccioso. En relación a *Campylobacter*, esto es especialmente importante en países en vías de desarrollo donde el porcentaje de aislamiento de estas bacterias en casos de diarrea es alto, como ocurre en Asia, África y América Latina^{1, 2}.

Agradecimientos: Este trabajo contó con el apoyo financiero de los proyectos S-92-05 DID.UACH, FONDECYT 59-89 y FONDECYT 1930353.

Summary

Participation of Campylobacter jejuni flagellar epitopes in cellular adhesion

Using a flagellated (052) and an aflagellated (T-1) strains we studied the participation of flagellar epitopes of *C. jejuni* in the adhesion to HEp-2 cells in vitro. Strain 052 was significantly more adherent than strain T-1. When adhesion assays were carried out with anti-flagella monoclonal antibodies, strain 052 showed inhibition of their adhesive capacity that varied between 64.3 and 92.9%. With an ELISA test it was demonstrated that those monoclonal antibodies were specific and directed exclusively against flagellar epitopes of strain 052 being unreactive with strain T-1. Our results show that flagellar epitopes could participate in the adhesion process suggesting that flagella could be involved in the installation of the infectious process.

Bibliografía

- Blaser MJ, Taylor DN, Feldman RA. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections. *Epidemiol Rev* 1983; 5: 157-75.
- Fernández H. Thermotolerant *Campylobacter* species associated with human diarrhea in Latin America. *J Braz Ass Adv Sci* 1992; 44: 39-42.
- Reina J. Análisis de los mecanismos de patogenicidad y virulencia descritos en las campilobacterias termotolerantes. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993; 11: 497-501.
- Walker RI, Caldwell MB, Lee EC, Guerry P, Trust TJ, Ruiz-Palacios GM. Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. *Microbiol Rev* 1986; 50: 81-94.
- Konkel ME, Joens LA. Adhesion to and invasion of HEp-2 cells by *Campylobacter* spp. *Infect Immun* 1989; 57: 2984-90.
- Newell DG, McBride H, Dolby JM. 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* 1985; 95: 217-27.
- Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Newburg DS, López-Vidal Y, Calva J. *In vitro* models for studying *Campylobacter* infections. In: Nachamkin I, Blaser MJ, Tompkins LS (eds). *Campylobacter jejuni*: current status and future trends. Washington DC: American Society for Microbiology, 1992; 176-83.
- Diker KS, Hascelik G, Diker S. Colonization of infant mice with flagellar variants of *Campylobacter jejuni*. *Acta Microbiol Hungar* 1992; 39: 133-6.
- Morooka T, Umeda A, Amako K. Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*. *J Gen Microbiol* 1985; 131: 1973-80.
- Pead PJ. Electron microscopy of *Campylobacter jejuni*. *J Med Microbiol* 1979; 12: 383-5.
- Ueki Y, Fujimoto S, Umeda A, Amako K. Purification and antigenic analysis of the flagella of *Campylobacter jejuni*. *Microbiol Immunol* 1988; 32: 327-37.
- Andrews E. Epitopes de flagelo de *Campylobacter jejuni* reconocidos por anticuerpos monoclonales: importancia en la adhesión celular. Tesis de Magister. Escuela de Graduados. Universidad Austral de Chile, 1992; 1-108.
- Engwall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunoabsorbent assay. ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *J Immunol* 1972; 109: 129-35.
- De Melo M, Gabbiani G, Pechère J. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEp-2 cells. *Infect Immun* 1989; 57: 2214-22.
- Lindblom CB, Cervantes LE, Sjögren E, Kaijser B, Ruiz-Palacios GM. Adherence, enterotoxigenicity, invasiveness and serogroup characteristics for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from adult patients with acute enterocolitis. In: Ruiz-Palacios GM, Calva E, Ruiz-Palacios BR (eds). *CAMPYLOBACTER V. Proceedings of the Fifth International Workshop on Campylobacter infections*. México, 1989; 199-201.
- Soto Ramírez LE, Cervantes LE, López-Vidal Y, Ruiz-Palacios GM. Role of outer membrane proteins and lipopolysaccharides on adherence and invasion by *Campylobacter jejuni*. In: Ruiz-Palacios GM, Calva E, Ruiz-Palacios EM (eds). *CAMPYLOBACTER V. Proceedings of the Fifth International Workshop on Campylobacter infections*. México, 1989; 192-5.
- Siegel S. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. México: Editorial Trillas, 1975.