

Pseudomonas aeruginosa. Vacunas: un reto a la investigación

Sara C. Esnard, Aniel Moya, Barbara Cedré, Tania Valmaseda, Yadira Pino Navarro, Gustavo Sierra González.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana. Cuba.

E-mail: scesnard@finlay.edu.cu

Pseudomonas aeruginosa, patógeno gramnegativo versátil y oportunista debido a su gran adaptabilidad fisiológica, potencial metabólico y mecanismos de virulencia, es causa frecuente a escala mundial de severas o letales infecciones en pacientes hospitalizados. El empeño por lograr terapias alternativas para prevenir o combatir las infecciones producidas por *P. aeruginosa* ha ocupado a investigadores de todo el mundo desde la segunda mitad del pasado siglo y actualmente se continúan reportando trabajos que respaldan los ensayos de candidatos vacunales, fundamentalmente a partir de antígenos proteicos, mayoritariamente basados en la construcción de vacunas recombinantes. En este artículo se presenta una revisión de trabajos publicados sobre las investigaciones desarrolladas en diferentes países, con el objetivo de obtener candidatos vacunales para la prevención o tratamiento de las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, a partir de la década de los años 50 del siglo XX hasta el 2003.

Palabras claves: *Pseudomonas aeruginosa*, candidatos vacunales.

I. Introducción

Pseudomonas aeruginosa, patógeno gramnegativo versátil y oportunista debido a su gran adaptabilidad fisiológica, potencial metabólico y mecanismos de virulencia, es causa frecuente a escala mundial de severas infecciones en pacientes hospitalizados, siendo capaz de infectar prácticamente todas las localizaciones del organismo humano y desarrollar entonces a partir de la infección, la diseminación hemática, septicemia y lesiones focales en diversos tejidos (1,2).

La infección causada por este microorganismo es facilitada por la presencia de patologías subyacentes como el cáncer y la fibrosis quística o por la ruptura de los mecanismos inespecíficos de la respuesta inmune como sucede en pacientes que sufren de quemaduras (2,3).

Este microorganismo resulta un patógeno importante en pacientes intubados con ventilación asistida en las Unidades de Terapia Intensiva; en pacientes con paraplejía, hemodiálisis, trasplantes y politraumatizados. En todos estos casos, las infecciones están acompañadas de altas tasas de mortalidad (> 50%) (3,4).

En pacientes fibroquísticos específicamente, la infección pulmonar crónica causada por *Pseudomonas aeruginosa* desempeña un importante papel en la morbilidad y mortalidad de estos, y contribuye en el 80% de los casos a una muerte prematura (5).

Una de las características más relevantes de este germen es su elevada resistencia a la mayoría de los antibióticos de más amplio uso clínico. Esto es debido, no sólo a la resistencia innata del microorganismo, sino también a su capacidad de portar plásmidos que codifican para la resistencia a antibióticos e incluso, de transmitirlos mediante procesos de transducción y conjugación bacteriana a otros organismos de la misma especie u otras afines (1,6).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria invasiva y toxigénica. La razón de la elevada patogenicidad que la caracteriza no está completamente esclarecida, sin embargo se considera que la amplia variedad de factores de virulencia que produce incide directamente sobre su elevada tasa de mortalidad. Se ha demostrado que estos determinantes de virulencia participan en la etapa de colonización y supervivencia bacteriana, la invasión tisular, la intoxicación y

daño de los tejidos del huésped infectado y en la inhibición de su respuesta inmune (1,2).

La patogenicidad de este microorganismo es compleja e involucra la producción de un gran número de factores de virulencia como la exotoxina A, exoenzima S, flagelos, *pili*, fimbrias, proteínas de membrana, proteinasa alcalina, elastasa, hemolisinas (fosfolipasa C y ramnolípido), leucocidina o citotoxina, lipopolisacárido y el exopolisacárido acetilado denominado alginato (responsable de la naturaleza mucoide de cepas aisladas en pacientes fibroquísticos), a los que se les atribuye una amplia actividad biológica que incluye pirogénesis, mutagénesis, adherencia específica, actividad antitumoral, capacidad de bloquear la producción de interferón, inactivación de los componentes del complemento C3b y C5a, inhibición de la ozonización y de factores quimiotácticos; necrosis, inhibición de la fagocitosis, muerte de leucocitos (particularmente polimorfonucleares), degradación de IgA e IgG, destrucción tisular local, leucopenia, shock, etc. (7,8,9).

II. Estado cronológico de las investigaciones de candidatos vacunales

II.1 - Investigaciones desarrolladas en el siglo XX

El empeño por lograr terapias alternativas para combatir las infecciones producidas por *P. aeruginosa* ha ocupado a investigadores de todo el mundo desde la segunda mitad del pasado siglo y se ha visto incentivado ante el creciente desarrollo de resistencia de este microorganismo frente a antibióticos de nueva generación (10).

Ya en la década de los años 50 del siglo XX, se reporta la presencia de anticuerpos protectores anti *P. aeruginosa* en gammaglobulina humana normal y se comienza a pensar en la obtención de una inmuglobulina hiperinmune para su eventual aplicación clínica, a partir de inmunizaciones en donantes voluntarios, idea que tropieza con la dificultad de no contar en esos momentos con un preparado vacunal que cumpliera los requisitos para ser aprobado como un producto biológico para uso humano (11).

Durante la década de los 60, fueron preparadas y evaluadas en la prevención de infecciones por *P. aeruginosa* en quemaduras, utilizando modelos animales, varias vacunas experimentales que emplearon como antígenos tanto células enteras

inactivadas como componentes obtenidos a partir del sobrenadante de cultivos bacterianos. Estos preparados vacunales aportaron diferentes grados de protección en el modelo animal de ratón quemado por vía de la inmunización activa. La inmunización pasiva también ofreció cierta protección, pero esta protección varió con el tiempo transcurrido entre la quemadura y la infección antes de ser aplicado el tratamiento. A pesar de que, tanto la vacuna como la inmunoterapia pasiva nunca fueron empleadas en la clínica, sí constituyeron la base para posteriores estudios inmunológicos en los pacientes. En todos los casos, la protección fue serotipo específica (12,13).

A fines de los 60 y en los años 70, los candidatos vacunales más prometedores ensayados fueron un preparado de lipopolisacárido (LPS) heptavalente de la Compañía Parke-Davis denominado Pseudogen (14) y una vacuna también de LPS, pero 16-valente que contiene "extractos de superficie" reconocida como PEV-O1 (15). Ambas preparaciones estimularon significativamente títulos de anticuerpos contra todos los tipos somáticos contenidos en cada preparado vacunal, tanto en pacientes quemados como en voluntarios sanos; además demostraron reducción en la incidencia de sepsis por este microorganismo y de la letalidad en pacientes quemados. La transferencia pasiva de anticuerpos IgG del suero de voluntarios inmunizados con estos candidatos vacunales a pacientes también demostró protección (16).

El candidato Pseudogen fue llevado a ensayos clínicos en pacientes fibroquísticos, con cáncer y en pacientes de Unidades de Cuidados Intensivos. En todos los casos donde se aplicó este preparado vacunal, los pacientes demostraron un moderado incremento en la respuesta de anticuerpos para todos los serotipos contemplados en la vacuna y los resultados correspondientes a la protección de la infección se consideraron en el rango de "notables pero limitados" a "ninguno" (16, 17,18).

El PEV-O1 fue ensayado en modelos animales de neumonía aguda, demostrando incremento significativo de títulos de anticuerpos, incremento de la eliminación de microorganismos a nivel pulmonar y aumento de sobrevivencia ante reto con bacterias aplicadas directamente en el tracto

respiratorio inferior (19). En uno de los estudios sin embargo, mientras se observaba protección, no hubo reducción de la carga microbiana en los pulmones de los animales inmunizados, llevando a los autores a especular que PEV-O1 "podría contener componentes como proteínas de la superficie celular y exoproductos virulentos" (20, 21).

Finalmente, debido a las complicaciones endotóxicas asociadas con el candidato Pseudogen, la desconocida naturaleza de los antígenos involucrados en el extracto de superficie de PEVO1 y las interrogantes promovidas por el diseño de algunos de los estudios clínicos desarrollados, ninguno de estos candidatos vacunales logró la aceptación de las autoridades sanitarias y por consiguiente no obtuvieron el Registro Médico Sanitario correspondiente (21).

El polisacárido O del LPS constituye el inmunógeno más potente y protector de *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, preparados vacunales que incorporaron este antígeno o molécula como principio activo, resultaron altamente tóxicos, a lo que se sumó la necesidad de combinar varios tipos somáticos individuales para lograr una adecuada protección (10). Este antígeno motivó a investigadores como Cryz y cols, quienes en la década de los 80 del pasado siglo, ensayaron la capacidad protectora del LPS y de un polisacárido de alto peso molecular como inmunógenos en un modelo animal sometido a heridas por quemadura con alentadores resultados (10, 22).

En 1987 este investigador ensayó el potencial vacunal de un conjugado formado a partir del polisacárido O serológicamente reactivo de nueve serotipos, unido covalentemente a la exotoxina A vía aminación reductiva. Para el estudio de inmunogenicidad, se inmunizaron conejos blancos Nueva Zelanda por vía intramuscular, los días 0, 14 y 28, con 50 µg de conjugado. Los nueve conjugados obtenidos fueron capaces de provocar una respuesta de IgG antitoxina A y antilipopolisacárido en los animales inoculados, evaluados por ELISA cuantitativo. El estudio de protección pasiva se realizó empleando el modelo ratón quemado, a los que se les aplicó 0,2 mL por vía endovenosa de IgG no concentrada, obtenida a partir de los conejos inmunizados, 24 h antes del reto. La inmunización activa se

evaluó en ratones inmunizados intramuscularmente con 1µg de conjugado con y sin hidróxido de aluminio 5%. El reto se realizó el día 28. Este estudio demostró la factibilidad del desarrollo de vacunas conjugadas exotoxina A-polisacárido O de los serotipos más frecuentemente asociados con infecciones y bacteriemia (23, 24). Sin embargo, estos candidatos vacunales provocaban aún severos efectos secundarios al inmunizar humanos debido fundamentalmente a la toxicidad del lípido A, componente del LPS, lo que trajo como consecuencia la aparición de vacunas por subunidades, como la desarrollada por Cryz y cols en 1988, consistente en una fracción detoxificada del lipopolisacárido conjugada a la exotoxina A. Esta vacuna demostró ser altamente inmunogénica y bien tolerada en humanos. Sin embargo, tuvo el inconveniente de que el proceso de obtención comprendía una gran cantidad de pasos de purificación para el aislamiento de los polisacáridos de varios serotipos, lo que hizo dudar de la factibilidad de su producción industrial (10, 25).

A partir de estos resultados se continuó trabajando en la búsqueda de una vacuna con ese mismo principio antigénico pero de superior calidad (26, 27, 28, 29), llegándose a obtener finalmente por estos investigadores del Instituto Suizo de Vacunas y Sueros, un preparado vacunal denominado Aerugen que se emplea actualmente para la profilaxis activa contra las infecciones fatales por *Pseudomonas aeruginosa* y se evalúa en estudios clínicos fase III en pacientes con fibrosis quística en varios países europeos. Aerugen es una vacuna polivalente que conjugaba polisacáridos O de 8 serotipos prevalentes de *P. aeruginosa* con la Exotoxina A. La inmunización con esta vacuna ha mostrado que preserva la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística y evita o dificulta la infección y la colonización progresiva por *Pseudomonas aeruginosa*. Aerugen constituye la primera vacuna aprobada como medicamento huérfano (orphan drug) en Estados Unidos (29, 30, 31).

Las dificultades confrontadas en una primera etapa con los preparados vacunales a partir del LPS, dirigieron los intereses de investigación en vacunas de *Pseudomonas aeruginosa* hacia las proteínas de membrana externa (PME), las que junto al LPS representan los dos principales

componentes antigénicos asociados a la superficie de este microorganismo, aunque también se ha investigado con otros componentes antigénicos como el flagelo y *pili* para obtener candidatos vacunales dirigidos a la prevención de la colonización y adherencia bacteriana (1,10).

El creciente interés en el potencial vacunal de las PME se debe fundamentalmente a que estas se encuentran altamente conservadas y antigénicamente relacionadas entre los 17 serotipos somáticos individuales reconocidos en el Sistema Internacional de Tipificación Antigénica (IATS) para *Pseudomonas aeruginosa* (32).

En 1987, Mathews- Greer publica sus resultados con un preparado vacunal a base de la PME-F (OprF), también denominada porina, como una vacuna protectora en ratones quemados retados con seis inmunotipos heterólogos, con positivos resultados de protección en este modelo animal representativo de la infección en el hombre (33).

En 1988 Gilleland reporta esta misma preparación vacunal empleada esta vez en el modelo animal de infección pulmonar crónica en ratón. Estos animales fueron inmunizados con el preparado vacunal y posteriormente retados con seis cepas inmunotipo heterólogas inoculadas por vía intratraqueal para provocar la infección pulmonar. En este caso también se observó una significativa protección frente al reto con las seis cepas heterólogas utilizadas, demostrando la efectividad de la inmunización con OprF en este modelo animal (34).

En la década de los 90, Crowe publica los resultados del primer ensayo clínico de una vacuna experimental preparada a partir de antígenos flagelares de seis cepas seleccionadas en representación de los posibles tipos y subtipos flagelares propuestos en el esquema de tipificación flagelar para este germen referido por Lanyi (36). En el trabajo, fueron inmunizados 220 voluntarios sanos por vía intramuscular, obteniéndose una baja reactogenicidad, buena tolerancia y ausencia de reacciones adversas. Esta vacuna experimental, demostró conferir protección activa y pasiva en el modelo animal ratón inmunosuprimido con ciclofosfamida (35).

En 1997 Döring publica el inicio de un ensayo clínico multicéntrico en Alemania, Francia e Italia, con la aplicación de la vacuna flagelar bivalente

5142/1210 IMMUNO. En este ensayo, basados en el análisis estadístico de la prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa* en aproximadamente un 8% de los pacientes fibroquísticos estudiados, y asumiendo la eficacia de la vacuna de un 66% para prevenir las infecciones pulmonares, se designó como placebo un grupo de 400 pacientes fibroquísticos que no presentaban infecciones pulmonares por *Pseudomonas aeruginosa*, atendidos en 16 centros hospitalarios de Alemania, Francia e Italia. El ensayo tuvo un diseño randomizado y a doble ciegas, con un tiempo de duración de 2 años (37). Hasta este momento no hemos encontrado reportes publicados de sus resultados.

A fines del siglo XX, el impetuoso avance de los descubrimientos y conocimientos científicos en el campo de la biología molecular y la genética microbiana, propiciaron el empleo de proteínas recombinantes de *P. aeruginosa* expresadas fundamentalmente en *E. coli* como preparados vacunales usados en modelos animales con alentadores resultados (38, 39, 40, 41).

En 1995 se realiza un estudio que revela la habilidad de péptidos sintéticos que representan epitopos de la OprF para conferir protección contra la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en un modelo murino de neumonía aguda, al seleccionar los péptidos 9,10 y 18 como representantes de epitopos B lineales de la superficie expuesta de la OprF, con el objetivo de determinar si estos péptidos podrían proporcionar protección ante la infección pulmonar crónica en el modelo animal empleado. Finalmente, se reportaron los péptidos 9 y 10 con potencial vacunal al constatar que la inmunización mucosal con éstos, confería protección ante una neumonía aguda causada por este microorganismo proponiendo puedan ser considerados para el posterior desarrollo de inmunógenos protectivos (42).

En 1996 Von Specht y cols publicaron los resultados alcanzados al probar la habilidad de PME recombinantes como vacuna protectora contra sepsis provocada por este germen. Los autores realizaron el clonaje de una proteína híbrida que combinaba epitopos protectivos de las OprF e I. Este preparado demostró ser altamente protector en ensayos de reto intraperitoneal con *P. aeruginosa* en 252 ratones Balb/c inmunosuprimidos con ciclofosfamida divididos en

3 grupos (A-C), realizando la inmunización oral de los animales de los grupos A y B con 8 dosis de 200 μ l c/u de 2×10^9 de la OprI recombinante expresada en *Salmonella dublin* o de la bacteria OprI negativa, suspendidas en 0,1 M de bicarbonato de sodio, por vía intragástrica cada dos semanas.

Los ratones pertenecientes al grupo C recibieron dos dosis orales de la *S. dublin* recombinante, seguidas de seis inyecciones intraperitoneales de 100 μ l de OprI recombinante purificada mezclada v/v con hidróxido de aluminio, lo que indujo anticuerpos IgA específicos en la mucosa gástrica, evidenciados en un modelo de reto con inoculación intraperitoneal. Para comprobar la efectividad de la OprI recombinante en humanos, esta fue purificada y empleada para inmunizar 28 voluntarios, diseñando cuatro grupos randomizados de siete individuos. La inmunización realizada por vía intramuscular fue bien tolerada y no arrojó efectos adversos; lo que motivó emprender otros estudios en busca de nuevas vías de expresión para estas proteínas (43).

Gilleland en 1997 utilizó específicamente el péptido 10 (residuos 305-318) de la proteína nativa OprF para desarrollar un preparado vacunal, escogiendo al virus de la Influenza A como vector para presentar este epitopo en una vacuna humanamente compatible. Varias longitudes o fragmentos del epitopo del péptido 10 fueron insertados en el gen HA (hemaglutinina) del virus de la Influenza A/WSN/33, mediante un sistema de transfección genética reversa. Para los estudios de protección, 150 μ g de cada uno de los virus quiméricos producidos conjugados a hemocianina fueron administrados primero, por vía intramuscular en ratones que fueron sometidos dos semanas después, a una inhalación intranasal de 1000 μ g del péptido conjugado a seroalbúmina bovina (BSA). Ambas dosis de inmunización fueron adyuvadas con hidróxido de aluminio; demostrándose en todas las variantes la capacidad del antisuero obtenido de los animales inmunizados, para expresar anticuerpos contra células completas de varios inmunotipos de *P. aeruginosa*. Los resultados de este trabajo hablaron a favor del empleo de este modelo viral para la presentación de epitopos de proteínas de interés vacunal, como es el caso de la OprF, en el

desarrollo de vacunas para prevenir la infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa* (44).

Mansouri en 1999 presentó un estudio de protección e inmunogenicidad de una vacuna formada por un híbrido de OprF. Esta proteína híbrida consistió en la OprI y los aminoácidos 190-342 de la OprF expresados en *E. Coli*; evaluando primeramente protección y pirogenicidad en animales de laboratorio y posteriormente, aplicándola a 32 voluntarios humanos por vía intramuscular bajo un esquema de tres inyecciones de 20, 50 y 100 μ g de OprF-OprI en intervalos de cuatro semanas, con una dosis de refuerzo a los seis meses posteriores a la tercera inmunización. El preparado vacunal fue bien tolerado y no se observaron efectos secundarios significativos. En todos los voluntarios inmunizados se detectaron elevados títulos de anticuerpos fijadores del complemento y opsonizantes contra las proteínas F e I. Estos alentadores resultados apoyaron la idea de desarrollar una vacuna con estas proteínas para uso humano en pacientes con infecciones respiratorias o con quemaduras (45).

En este mismo año, Chen y cols. dieron a conocer una proteína recombinante compuesta por la Exo. A de *Pseudomonas aeruginosa* y las PME I y F como una vacuna contra las infecciones por este microorganismo. Esta proteína quimérica fue construida a partir de los dominios de translocación de membrana y unión al receptor de la Exo. A unidos a las PME I y F. El potencial vacunal de este producto denominado PEIF fue ensayado en ratones Balb/c y en conejos blancos Nueva Zelanda; mediante la evaluación de títulos de anticuerpos dirigidos contra Exo A y anti OprF, además de la habilidad de neutralizar la citotoxicidad de Exo A y de incrementar la actividad opsonofagocítica contra la cepa PAO1 serogrupos 2 y 6. Los resultados obtenidos demostraron que PEIF fue capaz de inducir la producción de anticuerpos no solamente para neutralizar la actividad citotóxica de Exo.A, sino para promover la fagocitosis de varias cepas de *P. aeruginosa*. En modelo de ratón quemado, la inmunización con este candidato vacunal propició una significativa protección contra la infección por la cepa homóloga PAO1, la heteróloga serogrupo 2 y por la cepa hiperproductora de Exo.A PA103. Estos resultados permitieron a los autores sugerir a PEIF como un nuevo candidato

vacunal contra infecciones causadas por *P. aeruginosa* (46).

Como puede apreciarse, en la década de los 90 se evaluaron una amplia variedad de candidatos vacunales desarrollados y en distintas fases de ensayo, algunos sólo a nivel preclínico y otros transitaron por las fases clínicas II o III aunque en definitiva no se logró en el decenio el licenciamiento de ningún candidato vacunal a pesar de los resultados positivos alcanzados con el candidato denominado Aerugen (30, 31).

II.2. Investigaciones en desarrollo a inicios del siglo XXI:

En este nuevo siglo, se continúan reportando trabajos que respaldan los ensayos de candidatos vacunales fundamentalmente a partir de antígenos proteicos.

Lee NG y cols. en el 2000, realizaron un estudio con el objetivo de determinar si los anticuerpos producidos en pacientes quemados a partir de la inmunización activa con una vacuna a base de las PME de este microorganismo, proporcionaban una eficaz protección contra la infección con *P. aeruginosa* medida en un ensayo letal de reto en el modelo animal ratón. Los resultados obtenidos en este ensayo sugirieron que los anticuerpos anti PME inducidos por esta inmunización protegían pasivamente contra la infección y apoyaron el desarrollo de vacunas profilácticas anti *P. aeruginosa* en pacientes de alto riesgo (47).

Este equipo de investigadores coreanos han dado a conocer recientemente los resultados de un estudio donde compararon la respuesta de anticuerpos ante la inmunización con la vacuna de PME en humanos y conejos, encontrando que en el caso de humanos, la respuesta estuvo dirigida principalmente hacia epitopos discontinuos o dependientes de la conformación lo que reafirmó la importancia de la conformación tridimensional de los epitopos en el desarrollo de vacunas elaboradas a partir de péptidos sintéticos derivados de las PME (48).

Los esfuerzos por investigar posibles candidatos para la inmunización contra esta bacteria también transitan por el camino de las vacunas génicas o de DNA, representadas por un trabajo de Denis-Mize y cols (2000), quienes aprovechan las potencialidades antigénicas e inmunogénicas de la Exotoxina A.

Para estudiar los efectos biológicos e inmunológicos de la expresión in situ de esta proteína, construyeron vectores de expresión de plásmidos eucarióticos que contenían el gen tox A no-citotóxico salvaje y mutado. Análisis *in vitro* por transfección de células UM449 sugirieron que la expresión del gen de la toxina A tipo salvaje fue letal para células transfectadas mientras que la transfección con el gen mutado, resultó en la producción de exotoxina inactiva fácilmente detectada por inmunoblot en lisados celulares. Para investigar los efectos resultantes de la expresión intracelular de genes potencialmente citotóxicos en la construcción de una vacuna de DNA fueron inmunizados ratones con cada uno de los plásmidos, analizándose posteriormente la respuesta humoral y celular. La inmunización con el gen tox A mutado generó la producción de anticuerpos neutralizantes contra la Exotoxina A nativa y potenció una respuesta TH-1, lo que sugirió la importancia de una adecuada selección de genes blanco para el desarrollo de vacunas de DNA contra este microorganismo (49).

Staczek presentó, también en el 2000, un estudio de inmunización a partir de un virus del mosaico del tabaco quimérico que contenía un epitopo de la OprF de *P. aeruginosa* (TMV-9-14). Los ratones inmunizados con este candidato vacunal produjeron anticuerpos específicos anti péptido 9-4 medidos por ELISA frente a 7 cepas inmunotipo específicas, reaccionaron en un ensayo de Western Blot frente a OprF extraída de estas cepas y demostraron capacidad opzonizante. El candidato TMV-9-14 proporcionó inmuno- protección en ratones, ante el reto con cepas salvajes, en un modelo de infección pulmonar crónica (50).

Shiau y cols en el 2000, reportaron los resultados de un estudio realizado en ratones inmunizados con DNA que codificó para una Exotoxina A modificada. El plásmido recombinante contenía el gen de la proteína pero con su región C-terminal eliminada y fue expresado en el vector pSecTag Xpress. La expresión de esta exotoxina bacteriana en células animales fue demostrada primeramente en células 3T3 por transfección transiente y ensayo de Western Blot. Este DNA plasmídico recombinante fue inoculado por vía intramuscular en ratones Balb/c donde se pudieron identificar anticuerpos específicos anti Exo A. Los ratones inmunizados estuvieron protegidos de intoxicación ante el reto con dosis

letales de Exo. A, lo que demostró la adquisición de un nivel de inmunidad adecuado (51).

Bennet-Guerrero y cols, investigaron las potencialidades inmunogénicas de la región central (core) del LPS y presentaron en el 2000 un artículo sobre la preparación y evaluación preclínica de una nueva vacuna constituida por la región central de los LPS de cuatro especies gramnegativas (*E.coli* K-12, *E.coli* R1, *P. aeruginosa* PAC608 y *Bacteroides fragilis*), mezclados e incorporados a liposomas multilamelares. La actividad endotóxica de estos liposomas fue de un 0,1% menor que la endotoxicidad de los LPS nativos. La administración *in vivo* de esta preparación mezclada con hidróxido de aluminio en conejos no ofreció pirogenicidad o supertoxicidad a los 7 días de inoculación. El suero de los animales inmunizados demostró la presencia de anticuerpos que produjeron reacciones cruzadas frente a un amplio panel de LPS de numerosas bacterias gramnegativas y serogrupos relevantes de *E.coli* y *P. aeruginosa*. La inmunización activa de ratones con este preparado vacunal brindó protección contra un reto letal con el LPS de *E.coli* O18. Estos resultados aportaron evidencias a favor de estrategias profilácticas y eficaces basadas en el empleo de vacunas elaboradas a partir del LPS de bacterias gramnegativas de mayor ocurrencia en infecciones hospitalarias para reducir la incidencia de estas en individuos de alto riesgo (52).

Como ejemplo de candidatos vacunales que utilizan otros antígenos, Hertle en 2001 presentó una vacuna de doble función que emplea una proteína quimérica que incluyó la exotoxina A y secuencias del pili tipo IV, capaz de reducir la adherencia bacteriana y neutralizar la actividad citotóxica de la exotoxina A. Para la construcción de esta vacuna se emplearon secuencias principales del *pili* tipo IV insertadas en un vector que codificaba una versión no tóxica (por eliminación del sitio activo) de la proteína. Esta proteína quimérica denominada PE64Delta553 *pili* fue expresada en *E.coli*, replegada a una conformación cercana a la nativa y caracterizada mediante ensayos bioquímicos e inmunológicos. PE64Delta553 *pili*, se unió al gangliósido GM1 y una vez inoculada por vía intramuscular en conejos produjo una respuesta de anticuerpos que redujo la adherencia bacteriana y neutralizó la actividad de muerte celular de la toxina. Estos

resultados argumentaron a favor de la posterior evaluación de esta proteína quimérica como vacuna para la prevención de la colonización por *P. aeruginosa* en individuos susceptibles (53).

Kikuchi refirió, también en el año 2001, una novedosa variante de candidato vacunal al emplear células dendríticas genéticamente modificadas para expresar el ligando CD40, pulsadas con la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Este autor demuestra que las células dendríticas manipuladas genéticamente con un adenovirus recombinante como vector para expresar el ligando CD40 proporcionaron inmunidad humoral específica contra PAO1, sin células T CD4. En el estudio, empleando diferentes cepas de *P. aeruginosa* se intentó demostrar si esa estrategia resultaba en el incremento de la inmunidad específica frente a patógenos de significativa relevancia y encontraron que la inmunización en ratones con la célula dendrítica pulsada con el microorganismo intacto, manifestaba la ventaja potencial de inducir inmunidad contra múltiples antígenos simultáneamente en el modelo animal utilizado (54).

Otro interesante reporte en el 2001 fue el de Price y cols acerca de su estudio sobre la protección contra *Pseudomonas aeruginosa* en un modelo de infección pulmonar crónica, aportada por la inmunización genética contra la Opr F de esta especie bacteriana. Estos autores se basaron en la capacidad protectogénica de este antígeno para ser seleccionado como candidato para una vacuna de DNA. En el trabajo emplearon el plásmido eucariótico de expresión pV1020, clonando el gen de 977- pb de la OprF del DNA genómico de la cepa PAO1. Estos autores refirieron el éxito logrado en la construcción de esta vacuna génica y su eficacia al producir anticuerpos anti OprF, reactivos, ante antígenos de células completas, y opsonizantes, sugiriendo su potencial efectividad en humanos así como la posibilidad de incorporar otros antígenos proteicos, o epitopos antigénicos, para aumentar su efectividad, y propusieron el análisis de diferentes vectores de expresión o una combinación de ellos para maximizar la respuesta inmunogénica en humanos (55).

Como continuación del trabajo anterior del 2001 (55), en el 2002, Price y cols. publican los resultados obtenidos en una investigación

realizada para incrementar la eficacia protectora de la vacuna génica OprF al emplear dos estrategias de inmunización diferentes. En la primera, los animales recibieron primeramente dos inoculaciones intradérmicas mediante pistola de genes con la vacuna de OprF, recibiendo una dosis de repetición vía intramuscular con un péptido sintético conjugado (KLH), o con un virus influenza quimérico. Tanto el péptido sintético como el virus quimérico contenían el péptido 10, previamente identificado como protectogénico. La segunda estrategia involucraba la adición de la Opr I, a la fracción C-terminal de la OprF, como una proteína de fusión, para constituir la vacuna de DNA. Los resultados de los ensayos de reto demostraron la mayor efectividad de esta última variante (56).

En 2002, Priebe y cols. aprovechando la capacidad de los antígenos O lipopolisacáridicos de ser altamente inmunogénicos y la peculiaridad que sus epitopos protectivos demuestran ser pobremente inmunogénicos, mientras que los no protectivos o mínimamente protectivos a menudo provocan la mejor respuesta inmune, utilizaron un sistema de reemplazamiento de genes basado en la Flp recombinasa para construir una cepa PAO1 viva atenuada denominada Delta *aroA*, con el objetivo de desarrollar una vacuna de amplia protección. Este preparado fue inoculado en ratones por vía intranasal e intraperitoneal para evaluar su reactogenicidad e inmunogenicidad. La inmunización intranasal en ratones y conejos produjo elevados títulos de IgG para células bacterianas completas y para antígenos termoestables de los siete prototipos de cepas de *P. aeruginosa* serotipos O2/O5 y también anticuerpos opsonizantes contra múltiples miembros del serogrupo O2/O5 sin provocar efectos adversos importantes. Esto demostró el significativo potencial del uso de vacunas vivas atenuadas para la vacunación contra cepas LPS-lisas de *Pseudomonas aeruginosa* (57).

Recientemente, estos autores reportaron los resultados de un estudio sobre protección contra neumonía fatal por *P. aeruginosa* en el modelo animal ratón después de la inmunización nasal con la cepa mutante viva atenuada por delección del gen *aroA* (PAO1 Delta *aroA*). Después de la inmunización activa con esta cepa se encontraron altos niveles de protección contra PAO1 y otras cepas del serogrupo O2/O5 pero no contra otras de serogrupo heterólogo (58).

Nuriddinova y cols, presentaron en el 2003, los resultados experimentales de un candidato vacunal obtenido a partir de un medio de cultivo denominado K-4 basado en péptidos del hidrolizado de caseína con un punto isoeléctrico de 4,1 para la obtención de antígenos de *P. aeruginosa*, aislándose de la fase líquida del cultivo dos fracciones antigénicas conteniendo el *slime* o capa mucoide extracelular. Estudios de la toxicidad de las fracciones antigénicas revelaron que una de ellas resultó de baja toxicidad en modelo animal ratón. Esta fracción fue utilizada para obtener una vacuna piocianica. Una dosis vacunal de este candidato con 0,2 mg del antígeno adsorbido en hidróxido de aluminio, contribuyó a la protección activa de ratones retados con cepas homólogas y heterólogas de *P. Aeruginosa* (59).

Mansouri y colaboradores también en el 2003, reportaron los resultados de un ensayo clínico realizado a partir de las experiencias obtenidas en 1999 en su estudio de protección e inmunogenicidad de la vacuna formada por un híbrido de OprF e I (45). Esta proteína híbrida consistía en la OprI y los aminoácidos 190-342 de la OprF expresados en *E. Coli* probándose entonces reactogenicidad e inmunogenicidad en voluntarios sanos. En esta segunda ocasión, estos autores evaluaron reactogenicidad e inmunogenicidad de la vacuna OprF-OprI recombinante constituida por la proteína de membrana externa OprI completa y los aminoácidos 190-342 de la OprF, en ocho pacientes que sufrían de quemaduras de segundo y tercer grado, que involucraban entre el 35 y 55% de la superficie corporal, inmunizándolos en tres ocasiones con dosis de 100µg de la vacuna OprF-I. A estos pacientes se les inoculó simultáneamente toxoide tetánico, como control, con el objeto de comparar los anticuerpos anti OprF-I producidos, con aquellos resultantes de la inmunización con el toxoide tetánico, vacuna que forma parte habitual de los calendarios de vacunación. La vacuna OprF-I fue bien tolerada y no se reportaron efectos adversos serios. En ninguno de los pacientes quemados se desarrolló infección sistémica por *Pseudomonas aeruginosa* durante o después del tratamiento de sus lesiones. La detección de la presencia de anticuerpos anti *Pseudomonas* efectuada por ELISA, evidenció seroconversión en siete pacientes después de la inmunización, lo que

indicó la utilidad de la aplicación de esta vacuna proteica en la terapéutica del quemado (60).

Considerando la efectividad demostrada por vacunas basadas en la OprF para reducir la severidad de las lesiones pulmonares provocadas por la infección crónica por *Pseudomonas aeruginosa* en el modelo animal ratón, Staczek presenta los resultados obtenidos con el empleo de una vacuna de OprF denominada F/1 que contiene secuencias carboxi-terminales de OprF fusionadas a la OprI en un vector de expresión. Cuando se administró esta vacuna en tres ocasiones mediante pistola de genes en ratones de línea no isogénica, se evidenció protección mediada por anticuerpos. Para demostrar el papel de los anticuerpos inducidos por F/1, se inmunizaron con F/1 dos grupos de ratones; uno formado con animales deficientes en células B (B-) y otro grupo de animales con células B intactas (B+); retando ambos grupos con *P. aeruginosa*. Ambos grupos fueron posteriormente examinados para detectar la severidad de las lesiones. Como se esperaba, el grupo de animales inmunizados con F/1, B+, sufrió de menos lesiones y de menor severidad que el grupo de ratones inmunizados con el vector vacío, B+. Sin embargo, sorprendentemente, tanto los ratones inmunizados con F/1 y con el vector vacío B-, estuvieron protegidos a niveles similares al de los animales inmunizados con F/1, B+. Exámenes de la población de células que intervienen en la inmunidad y de los niveles de citoquinas indicaron un incremento relativo en la cantidad de linfocitos T CD3+ en los animales B- inmunizados con F/1 o con el vector vacío, en comparación con los B+. Estos resultados indicaron el papel que desempeña en la protección la inmunidad mediada por células en animales B-; lo que confirmó la hipótesis del autor acerca del importante papel desempeñado por la inmunidad celular en la protección contra las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* (61).

Como último exponente, que conocemos se haya realizado en el campo de las investigaciones para la obtención de candidatos vacunales para *P. aeruginosa*, en 2003, Theilacker y cols, reportaron la construcción y caracterización de un vacuna conjugada de exopolisacárido mucoide-alginato para la protección ante la infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa* con el objetivo de incrementar la inmunogenicidad de este exopolisacárido mucoide que posee la

capacidad de inducir anticuerpos opsonizantes en ratones que aportan protección contra la infección pulmonar crónica en modelos animales (62).

III. Conclusiones

1. En todos estos años de investigaciones, se ha logrado el diseño y ejecución de ensayos preclínicos exitosos, que han empleado modelos animales como el de ratón quemado o el murino de infección pulmonar, llegando a reproducir la infección causada por este microorganismo en el hombre y que ya constituyen modelos básicos clásicos de la preclínica para los ensayos de protección y como estimado preliminar de la efectividad de candidatos vacunales.
2. Los candidatos investigados han sido diseñados especialmente para tratar las infecciones pulmonares en enfermos fibroquísticos y para pacientes quemados, empleando como antígenos vacunales fundamentalmente, el LPS y proteínas de membrana externa seleccionadas.
3. Pocos proyectos de investigación han cursado un ciclo de vida que les permitiera transitar desde los estudios básicos a los preclínicos, clínicos hasta la obtención de un producto final, y muchas han interrumpido el desarrollo de alguna etapa y concluido.
4. En la mayoría de los ensayos clínicos efectuados se han empleado grupos de voluntarios sanos y de pacientes fibroquísticos ó quemados fundamentalmente; utilizando vías de inmunización intra muscular, endovenosa u oral.
5. Para el estudio de la respuesta inmune, se ha utilizado ampliamente el ELISA y para evaluar la respuesta humoral inducida por un candidato vacunal la técnica por excelencia ha sido y es, la determinación de la producción de anticuerpos opsonizantes.
6. En el año, 2003, y hasta la fecha, se conoce que candidatos como el Aerugen transitan por las últimas etapas de los ensayos clínicos fase III con resultados muy alentadores y que ha sido reconocido por la FDA como "vacuna huérfana" en los Estados Unidos (30,31).

7. La tendencia actual de las investigaciones de candidatos vacunales en *Pseudomonas aeruginosa* se dirige hacia la construcción de vacunas recombinantes.
8. Consideramos finalmente, que todo lo que ha podido realizarse hasta el momento en el terreno de las investigaciones en vacunas de *Pseudomonas aeruginosa* ha logrado mantener vigente el estímulo y la motivación de los científicos del mundo, por lo que esperamos contar en un futuro inmediato con más de una vacuna licenciada para bien de la humanidad.

Referencias

1. Kiska DL and Gilligan H. *Pseudomonas*. En: Murray P R; Baron E J; Pfaller M A; Tenover F C y Tenover F C eds. *Manual of Clinical Microbiology* 7th Edition. American Society for Microbiology, Washington DC; 1999:517-25.
2. Microbiología Médica 15^{ta} Edición, 1966. En Jawetz, Melnick y Adelberg. G.F. Brooks, J.S. Butel y L.N. Ornston eds. Editorial El Manual Moderno, S. A. de C. V. México, DF.:265-72. 1996.
3. Pruitt BA, McManus AT, Kim SH y Goodwing CW. Burn Wound Infections: Current Status. *World J. Surg.* 1998; 22:135-145.
4. Rosenfeld M, Emerson J y Accurso F. Diagnostic accuracy of oropharyngeal cultures in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 1999; 28:323-28.
5. Rosenstein BJ y Zetlin PL. Cystic Fibrosis. *Lancet*, 1998; 331(9098):227-82.
6. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare?. *Clin.Infect. Dis.* 2000; 34:634-40.
7. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, Ohara M, Gropper MA, Frank DW, Martin TR y Wiener-Kronish JP. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Invest.* 1999;104:743-50.
8. Azghani AO, Miller EJ y Patterson BT. Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung.*, 2000; 178:261-69.
9. Tang HB, Di Mango E, Brian R, Gambelino M, Iglewski B, Goldberg JB y Prince A. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun.* 1996; 64:37-43.
10. The Jordan Report. Annual Report. Accelerated Development of Vaccines. Division of Microbiology and Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. 1995:21-23.
11. Rosenthal SM, Millican RC y Rust J. A factor in human γ globulin preparations active against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 1957; 94:214-17.
12. Holder IA. *Pseudomonas* immunotherapy. Review article. *Serodiagnostic and Immunotherapy.* 1988; 2:7-16.
13. Alms TH y Bass JA. Induction of protection by an alcohol-precipitated fraction from the slime layer. *J Infect Dis.* 1967.117:249-56.
14. Markley K y Smallman E. Protection by vaccination against *Pseudomonas* infection after thermal injury. *J Bacterio.* 1968. 96:867-74.
15. Alexander JW, Fisher MW, McMillan BG y Altemier WA. Prevention of invasive *Pseudomonas* infection in burns with a new vaccine. *Arch Surg.* 1969. 99:249-56.
16. Miller JM, Spilsbury JF, Jones RJ, Roe EA y Lowsbury EJJ. A new polyvalent *Pseudomonas* vaccine. *J Med Microbiol.* 1977;10:19-27.
17. Young LS, Meyer RD y Armstrong D. *Pseudomonas aeruginosa* vaccine in cancer patients. *Am Intern Med.* 1973;79:518-27.
18. Polk HC Jr, Borden S y Alderete JA. Prevention of *Pseudomonas* respiratory infection in a surgical intensive care unit. *Am Surg.* 1973. 177:607-15.
19. Pennington JE. Immunotherapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection. En: Doggart RE ed. *Pseudomonas aeruginosa* clinical manifestations of infection and current therapy. New York Academic Press. 1976;192-215.
20. Pennington JE, Pier GB. Efficacy of cell wall *Pseudomonas aeruginosa* vaccines for protection against experimental pneumonia. *Rev Infect Dis.* 1983. 5:5852-57.
21. Pennington JE, Hickey WF, Blackwood LL y Arnaut MA. Active immunization with lipopolysaccharide *Pseudomonas* antigen for chronic *Pseudomonas* bronchopneumonia in guinea pigs. *J Clin Invest.* 1981; 68:1140-48.
22. Cryz SJ, Furer E y Germainer R. Protection against fatal *Pseudomonas aeruginosa* burn sepsis by immunization with lipopolysaccharide and high -

- molecular weight polysaccharide. *Infect. Immun.* 1984;43:795-9.
23. Cryz SJ, Jr., Fürer J, Sadoff R, Germainer L, Pastan I, Willingham MC y Fitzgerald DJP. Use of *Pseudomonas aeruginosa* Toxin A in the construction of conjugate vaccines and immunotoxins. *Rev. Infect. Dis.* 1987. 9(3):644-49.
 24. Cryz SJ, Lang AB, Sadoff JC, Germainer R y Fürer E. Vaccine potential of *Pseudomonas aeruginosa* O-Polysaccharide-Toxin A conjugates. *Infect. Immun.* 1987; 55(7):1547-51.
 25. Cryz SJ, Sadoff JC, Ohmann D y Fürer E. Characterization of the human immune response to a *Pseudomonas aeruginosa* O-Polysaccharide-Toxin A conjugate vaccine. *J Lab Clin Med.* 1988.111:701-07.
 26. Saad UB, Lang AB, Wedgwood J, Rudeberg A, Que JU, Fürer E y Cryz SJ. Safety and immunogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* conjugate A vaccine in cystic fibrosis. *Lancet.* 1991. 338:1236-37.
 27. Cryz SJ, Wedgwood J, Lang AB, Rudeberg A, Que JU, Fürer E y Schaad UB. 1994. Immunization of noncolonized cystic fibrosis patients against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 169:1159-62.
 28. Lang AB, Schaad UB, Rudeberg A, Wedgwood J, Que JU, Fürer E y Cryz SJ. 1995. Effect of high affinity anti- *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide antibodies induced by immunization on the rate of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *J Pediatrics* 127:711-17.
 29. Cryz SJ, Lang AB, Rudeberg A, Wedgwood J, Que JU, Fürer E y Schaad UB. Immunization of cystic fibrosis patients with a *Pseudomonas aeruginosa* O-Polysaccharide-Toxin A conjugate vaccine. *Behring Inst Mitt.* 1997. 98:345-49.
 30. Berna Biotech AG. AERUGEN. <http://www.bernabiotech.com/rd/literature/aerugen/2003>.
 31. Berna Biotech AG: News. BernaBiotech's Aerugen Granted Orphan Drug Designation in the USA.
 32. http://www.bernabiotech.com/news/archive/artivcle/20020515_01.html
 33. Liu PV, Matsumoto H, Kusuma H y Bergan T. Survey of heat-stable, major somatic antigens. *Acta Microbiol. Acad.Sci. Hung.* 1983.13:295-318.
 34. Mathews-Greer JM y Gilleland HE Jr. Outer Membrane Protein F (Porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine against heterologous immunotype strains in a burned mouse model. *The Journal Infect. Dis.* 1987. 155(6):1282-91.
 35. Gilleland HE. Jr, Gilleland LB y Mathews-Greer JM. Outer Membrane Protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. *Infect. Immun.* 1988. 56(5):1017-22.
 36. Lanyi B. Serological properties of *Pseudomonas aeruginosa* type-specific thermolabile (flagellar) antigens. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 17:35-48.
 37. Crowe B, Enzersberger O, Schober-Bendixen S, Mitterer A, Mundt W, Livey I, Pabst H, Kaeser R, Eibl M, Eibl J y Dorner F. 1991. The first clinical trial of Immuno's experimental *Pseudomonas aeruginosa* flagellar vaccines. En: Homma JY, Tanimoto H, Holder IA, Hoiby N, Döring G (eds): *Pseudomonas aeruginosa* in Human Diseases. Antibiot Chemother. Basel Karger vol 44:141-56.
 38. Döring G y Dorner F. A multicenter vaccine trial using the *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine IMMUNO in patients with cystic fibrosis. *Behring Inst. Mitt.* 1997; 98:338-344.
 39. Gilleland HE. Jr, Gilleland LB y Mathews-Greer JM. 1988. Outer Membrane Protein F preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a vaccine against chronic pulmonary infection with heterologous immunotype strains in a rat model. *Infect. Immun.* 56(5):1017-22.
 40. Duchene M, Barron C, Schweizer A, von Specht B y Domdey H. 1989. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein I. Molecular cloning, primary structure and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171, 4130-37.
 41. Finke M, Duchéne M, Eckhardt A, Domdey H y von Specht B. 1990. Protection against experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection by recombinant *P. aeruginosa* lipoprotein I expressed in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 58: 2241-44.
 42. Funke M, Muth G, Reichhelm T, Thoma M, Duchene M, Hungerer K, Domdey H y von Specht B. Protection of immunosuppressed mice against infection with *Pseudomonas aeruginosa* by recombinant *aeruginosa* lipoprotein I and lipoprotein-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 1991; 59:1251-54.

43. Hughes E y Gilleland HE Jr. Ability of synthetic peptides representing epitopes of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* to afford protection against *P.aeruginosa* infection in a murine acute pneumonia model. *Vaccine*. 1995; 13(18):1750-53.
44. von Specht BU, Knapp B, Muth G, Hungerer KD, Lücking C, Schmitt A y Domdey H. Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccine candidate. *Journal of Biotechnology*, 1966; 44:145-53.
45. Gilleland HE Jr., Gilleland L, Staczek J, Harty R, García-Sastre A, Engelhardt O y Palese P. Chimeric Influenza viruses incorporating epitopes of Outer Membrane Protein F as a vaccine against pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Behring Inst. Mitt.* 1997. 98:291-301.
46. Mansouri E, Gabelsberger J, Knapp B, Hundt E, Lenz U, Hungerer K, Gilleland HE Jr, Staceck J, Domdey H y von Specht B. Safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* hybrid outer membrane protein F-I vaccine in human volunteers. *Infect. Immun.* 1999. 67:1461-70.
47. Chen TY, Shang HF, Chen TI, Lin CP, Hui CF y Hwang J. Recombinant protein composed of *Pseudomonas* exotoxin A, outer membrane proteins I and F as vaccine against *P. aeruginosa* infection. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1999.52:524-33.
48. Lee NG, Jung SB, Ahn BY, Kim YH, Kim JJ, Kim IS, Yoon SM, Nam SW, Kim HS and Park WJ. Immunization of burn-patients with a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy. *Vaccine*. 2000; 18(18):1952-61.
49. Lee NG, Ahn BY, Jung SB, KimYG, Kim HS y Park WJ. Conformation-dependent antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane proteins induced by immunization in humans. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2000. 27(1):79-85.
50. Denis-Mize KS, Price BM, Baker NR y Galloway DR. Analysis of immunization with DNA encoding *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 27(2): 147-54.
51. Satczek J, Bendahmane M, Gilleland LB, Beachy RN y Gilleland HE Jr. Immunization with a chimerical tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P aeruginosa*. *Vaccine*. 2000. 18:2226-74.
52. Shiau JW, Tang TK, Shih YL, Tai C Sung YY, Huang JL y Yang HL. Mice immunized with DNA encoding a modified *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A develop protective immunity against exotoxin intoxication. *Vaccine*. 2000. Dec 8;19(9-10): 1106-12.
53. Bennet-Guerrero E, McIntosh TJ, Barclay GR, Snyder DS, Gibbs RJ, Mythen MG y Poxton IR. Preparation and preclinical evaluation of a novel liposomal complete-core lipopolysaccharide vaccine. *Infect. Immun.* 2000; 68(11):6202-08.
54. Hertle R, Mrsny R y Fitzgerald D. Dual-function vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization of chimerical Exotoxin A-pilin protein. *Infect. Immun.* 2001; 69(11): 6962-69.
55. Kikuchi T, Hackett NR y Crystal RG. 2001. Cross-strain protection against clinical and laboratory strains of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by dendritic cells genetically modified to express CD40 ligand and pulsed with specific strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Hum Gene Ther* 12(10): 1251-63.
56. Price BM, Galloway DR, Baker NR, Gilleland LB, Staczek J y Gilleland JR. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection in mice by genetic immunization against Outer Membrane Protein F (OprF) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 2001; 69(5):3510-15.
57. Price BM, Barten Legutki B, Galloway DR, von Specht BU, Gilleland LB Gilleland HE Jr. y Staczek J. Enhancement of the protective efficacy of an oprF DNA vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002; 33(2-3):89-99.
58. Priebe GP, Brining M, Hatano K, Grout M, Coleman F, Pier GB y Golberg JB. Construction and characterization of a live attenuated *aroA* deletion mutant of *Pseudomonas aeruginosa* as a candidate intranasal vaccine. *Infect. Immun.* 2002;70(3):1507-17.
59. Priebe GP, Meluleni GJ, Coleman FT, Goldberg J y Pier GB. 2003. Protection against fatal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice after nasal immunization with a live attenuated *aroA* deletion mutant. *Infect. Immun* 71(3):1453-61.
60. Nuriddinova NR, Ivanova LE, Sheremet'ev NN. y Garib Flu. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* vaccine on the basis of antigens isolated from the

- supernant of culture media K-4. Zh *Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 4:40-3.
61. Mansoury E, Blome-Eberwein S, Gabelsberger J, Germann G and y Specht BU. Clinical study to assess the immunogenicity and safety of a recombinant *Pseudomonas aeruginosa* OprF-OprI vaccine in burns patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003; 37(2-3): 161-6.
62. Staczek J, Gilleland LB, van der Heyde HC y Gilleland HE. DNA vaccines against chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003; 37(2-3):147-53..
63. Teilacker C, Coleman FT, Mueschenborn S, Llosa N, Grout M y Pier GB. Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoide exopolisaccharide-alginate conjugate vaccine. *Infect Immun*. 2003; 71(7):3875-84.

***Pseudomonas aeruginosa*. Vaccines: a challenge to research**

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative pathogen, versatile and opportunistic in terms of their physiological and metabolic potential and virulence mechanisms, which is a frequent cause of severe or lethal infections in hospitalized patients over the world. The aim to achieve alternative therapies to prevent or combat the infections caused by *P. aeruginosa* has occupied investigators from all the world since the second half of last century and at the moment works have been reported that support assays of vaccine candidates, starting mainly from protein antigens and based on the construction of recombinant vaccines. In this article a review of published works on research developed in different countries with the purpose to obtain vaccine candidates for the prevention or treatment of the infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* beginning since the decade of the fifties of the 20th century up to the year 2003.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, vaccine candidates.