

Reconocimiento de antígenos lipopolisacáridicos de *Pseudomonas aeruginosa* por sueros humanos

Jonatán Hernández¹, Jacquelin Alfonso¹, Juan F. Almenares², Aniel Moya¹, Jose L. Pérez, Sara C. Esnard¹, Armando Cádiz¹, Gustavo Sierra¹.

1. Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad Habana, Cuba
 2. Centro de Estudios de Biotecnología Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.
- E-mail: jhernandez@finlay.edu.cu; jonatanhr@yahoo.com

En este trabajo se procedió al reconocimiento de lipopolisacáridos de diferentes serotipos de *Pseudomonas aeruginosa* por sueros humanos. Los lipopolisacáridos fueron aislados por el método Wespthal y Jann. Se utilizaron un total de 104 sueros de pacientes infectados y donantes voluntarios, provenientes de instalaciones hospitalarias y del Banco de Sangre, para el reconocimiento de antígenos lipopolisacáridicos, mediante el ensayo de Dott Blot. Los resultados mostraron que los serotipos de mayor reconocimiento, por los sueros testados, fueron el O11, O13, O16 y el O15, existiendo diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$).

Palabras claves: Pseudomonas, lipopolisacáridos, serotipos

Introducción

Pseudomonas aeruginosa está considerada como una de las especies patógenas oportunistas más relevantes y de más amplia distribución en la naturaleza, junto a *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (1,2). La infección por *P. aeruginosa* requiere en la mayoría de los casos de una disminución de la inmunidad del huésped, y de ahí que la respuesta ante la infección bacteriana sea muy débil (1,3). Esta bacteria es la cuarta de los patógenos más aislados en infecciones nosocomiales en el mundo con un 10,1% de las infecciones adquiridas en medios intrahospitalarios, considerándose como un gran problema de salud a escala mundial (4,5). Dentro de los principales determinantes antigénicos de *P. aeruginosa* se encuentra el Lipopolisacárido (LPS), el cual representa la base química de su seroespecificidad somática y uno de los principales participantes de la virulencia de esa especie bacteriana (6). Se reconocen, oficialmente por el Sistema Internacional de Tipificación Antigénica [ITASS (siglas en inglés)], 17 serotipos de *P. aeruginosa* (2), aunque otros autores consideran la existencia de 20 serotipos (1). Se considera que de 7 a 10 de estos serotipos, están involucrados en más del 90% de

las enfermedades clínicas (7). Actualmente, no existe una terapia completamente efectiva contra esta enfermedad, aunque se mantiene una terapia con gammas hiperinmunes comerciales que de forma combinada con los antibióticos contribuyen a eliminar la infección (1,8,9,10,11). El presente trabajo está encaminado al reconocimiento de antígenos lipopolisacáridicos de diferentes serotipos de *Pseudomonas aeruginosa* por sueros humanos.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo. Purificación de LPS

En este trabajo se emplearon cepas clínicas autóctonas cubanas de *P. aeruginosa* serotipos: O2, O4, O6, O7, O8, O10, O11, O12, O13, O15, O16, pertenecientes a la colección del Instituto Finlay. Las mismas fueron cultivadas en Caldo Corazón (BIOCEN) hasta el final de la fase logarítmica. Para todos los casos las células fueron inactivadas con formaldehído hasta una concentración final de 0,3%. La biomasa resultante fue resuspendida en agua destilada estéril y sometida a un proceso de lavado.

Los LPS fueron purificados por el método de fenol acuoso (12), combinado con una digestión

enzimática de DNAsa y RNAsa durante 1h a 37 °C. Posteriormente se utilizó la disgección por Pronasa durante 48 h a temperatura ambiente. La cuantificación de los LPS se realizó por el ensayo del KDO (13) y sus perfiles migratorios fueron visualizados e identificados por electroforesis mediante la tinción con plata, empleando patrones de Peso Molecular entre 10-90 kDa (Sigma) (14). Estas determinaciones fueron correlacionadas con la prueba de identidad, según el método de aglutinación en placa, descrito por Pitt (15), utilizando un set de antisueros somáticos que reconoce a los 17 tipos somáticos (LPS). Los contaminantes proteicos se cuantificaron mediante Lowry (16) y los ácidos nucleicos por lectura espectrofotométrica a 260 nm.

Reconocimiento de antígenos lipopolisacáridicos de diferentes serotipos de *P. aeruginosa*

Se utilizaron un total de 104 sueros de donantes voluntarios y de individuos infectados, provenientes del Banco de Sangre y del Hospital "Calixto García", respectivamente, ambos de Ciudad de la Habana, Cuba. Las muestras de los infectados fueron obtenidas de pacientes ingresados en la UCI del Servicio de Quemados del Hospital "Calixto García". Los pacientes fueron clasificados como graves, muy graves, críticos y críticos extremos, predominando en ellos las lesiones de tipo dérmicas AB e hipodérmicas. Se estudiaron pacientes, entre las edades de 17 a 67 años, de ambos sexos y con antecedentes patológicos personales adecuados para el estudio. Las muestras de los donantes de sangre fueron obtenidas a partir de los sueros de los mismos, provenientes del Banco de Sangre BETERA de Marianao, en Ciudad de la Habana. Como control positivo fue utilizado el INTACGLOBIN, el cual demostró en estudios anteriores (17), la presencia de IgG antipseudomonas. Se utilizó como control negativo un total de 30 sueros de niños entre 2-5 años, que respondieron francamente negativo a diferentes pruebas realizadas en nuestro

laboratorio, como ELISA para la determinación de IgG e IgM antipseudomonas (18).

Estos sueros fueron testados para el reconocimiento del antígeno lipopolisacáridico, mediante el ensayo de Dott Blot (19). Se aplicaron 10 µl de la muestra. Las tiras fueron bloqueadas 1 h a 37 °C con leche descremada, al 3% en tampón fosfato salino (TSF) (p/v). Posteriormente, se lavaron tres veces durante 10 min con agua/Tween 20, después se añadió el antisuero apropiado (donantes voluntarios y de quemados) diluido 1/200 en TSF-BSA 1%-Tween 20, 0,05%, durante toda la noche a 4 °C. Luego se lavaron con agua/tween y se incubaron con un conjugado anti IgG humano-peroxidasa diluido 1/1000 (Amersham). Después se lavaron nuevamente --como se describió antes-- y se revelaron las bandas utilizadas con 4-cloro-1-naftol y peróxido de hidrógeno como sustrato de la peroxidasa (5 mg de 4-cloro-1-naftol, 1 mL de metanol, 24 mL TSF y 15 µl de H₂O₂) (19).

Los datos resultantes de los experimentos fueron procesados en el laboratorio sobre una base de datos de Microsoft Excel/97. Además, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de clasificación simple y se aplicó el STATISTIC GRAPHICS/98 para el cálculo de los estadígrafos (media, desviación estándar, y error de la media) y el análisis de las medias.

Resultados

Purificación de los LPS de diferentes serotipos *P. aeruginosa*

El proceso de extracción y purificación del LPS de *P. aeruginosa* llevada a cabo, nos permitió obtener productos con bajos niveles de contaminantes, como se muestra en la Tabla 1. Los LPS de los serotipos O2, O11, O12, O13 y O16 mostraron rendimientos superiores al promedio obtenido, mientras que O4, O7, O8 y O15 estuvieron por debajo, mostrando la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$, nivel de confianza 95%) en cuanto al rendimiento de LPS obtenidos a partir de los diferentes serotipos utilizados.

Tabla 1: Rendimiento de LPS purificado y niveles de contaminantes.

LPS de los diferentes serotipos	mg de LPS / g de biomasa bacteriana húmeda	Conc. Proteína (% p/p)	Conc. A. Nucleicos (% p/p)
O2	4,58	< 1	< 1
O4	3,00	< 1	< 1
O6	4,30	< 1	< 1
O7	1,77	< 1	< 1
O8	2,98	< 1	< 1
O10	3,08	< 1	< 1
O11	5,12	< 1	< 1
O12	6,23	< 1	< 1
O13	4,73	< 1	< 1
O15	3,15	< 1	< 1
O16	4,71	< 1	< 1
Promedio	3,96	< 1	< 1

Identidad: Mediante el test de identidad comprobamos la formación de aglutinaciones cuando se enfrentaron el antígeno y el anticuerpo monoclonal específico para cada serotipo, corroborando que el LPS purificado pertenecía a dicho serotipo. (Datos no mostrados).

SDS-PAGE. Tinción con Plata: En la tinción con plata (Figura 1), se observa el perfil migratorio correspondiente a las bandas características de los LPS purificados, no evidenciándose la presencia de bandas de proteínas contaminantes.

Como característica fundamental en todas las muestras se observa una banda de bajo peso molecular (12-17 kDa) correspondiente al núcleo y parte del Lípido A. Las bandas de mediano y mayor peso molecular (30-76 kDa) pertenecen a la región O-polisacáridica que, por su heterogeneidad molecular, se distribuye, a lo largo de toda la corrida. Estos resultados concuerdan con lo descrito por diversos autores (20,21,22,23,24) para este tipo de producto.

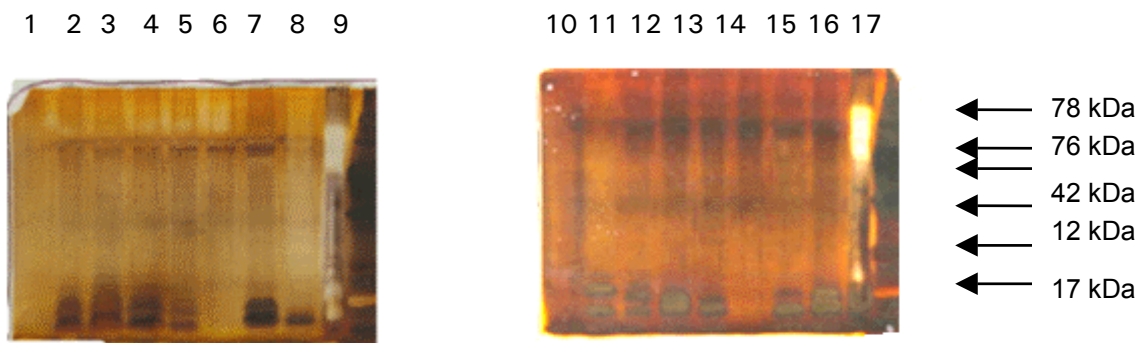


Figura 1: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en condiciones de reducción.

Línea 1: LPS Serotipo O7
 Línea 2: LPS Serotipo O6
 Línea 3: LPS Serotipo O12
 Línea 4: LPS Serotipo O8
 Línea 5: LPS Serotipo O15
 Línea 6: LPS Serotipo O13
 Línea 7: LPS Serotipo O2

Línea 8: LPS Serotipo O4
 Línea 9: Patrón de Peso Molecular
 Líneas 10-13: LPS Serotipo O11
 Línea 14: LPS Serotipo O10
 Línea 15: LPS Serotipo O16
 Línea 16: LPS Serotipo O11
 Línea 17: Patrón de Peso Molecular

Reconocimiento al LPS purificado de los diferentes serotipos de *P. aeruginosa* por sueros de una determinada población

Específicamente, nuestro estudio estuvo centrado, en el reconocimiento del antígeno lipopolisacárido de diferentes serotipos de *P. aeruginosa*, en los sueros de los pacientes

quemados y en los de donantes voluntarios. A través del Dot-blot se comprobó la presencia anticuerpos anti-lipopolisacáridos en dichos sueros. Según nuestros resultados, los serotipos de mayor reconocimiento fueron O11, O15, O13, O16, O8, como se evidencia en el Dot-blot (Figura 2).

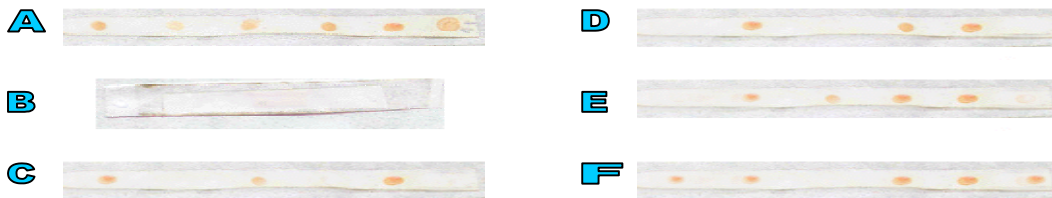


Figura 2: Dot-Blot para determinar anticuerpos anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa*

A: LPS, Serotipos: O11, O8, O12, O13, O15, O16
 B: Control negativo
 C: LPS, Serotipos: O13, O7, O11, O10, O16
 D: LPS, Serotipos: O2, O8, O10, O6, O11
 E: LPS, Serotipos: O2, O4, O6, O13, O7

F: LPS, Serotipos O4, O16, O10, O11, O13, O15
 A-C: sueros de donantes
 D-E: sueros de quemados
 F: INTACGLOBIN

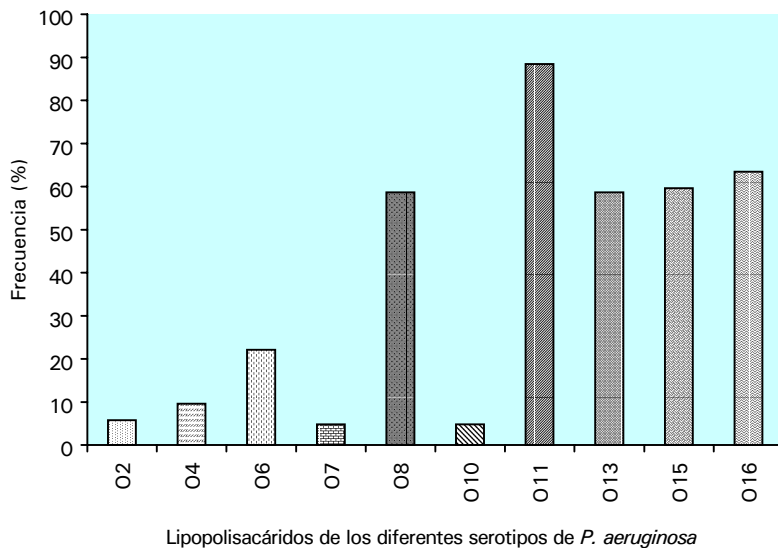


Figura 3: Frecuencia de la incidencia de diferentes serotipos de *P. aeruginosa* por los sueros de pacientes y donantes.

Las Figura 3 muestra la frecuencia del reconocimiento de lipopolisacáridos de *Pseudomonas aeruginosa*. Un total de 91 sueros, de todos los testados, reconocieron al LPS del serotipo O11, con una frecuencia de reconocimiento de 88,46%, a continuación se encuentran el O16, O15, O13 y el O8, con una frecuencia de reconocimiento por los sueros de 63,46%, 59,61% y 58,65% respectivamente, siendo los serotipos O2, O7 y O10 los menos reconocidos. El serotipo O13 mostró una frecuencia idéntica al O8.

Discusión

Los resultados obtenidos fueron muy similares a los obtenidos por Hatano y Masoud (25) en 1994, los que registraron valores que oscilan en rango de 1-3 mg/g de biomasa bacteriana húmeda en las cepas analizadas, aplicando el mismo método de extracción que se utilizó en nuestro trabajo. El serotipo O7 fue el que rindió menos. Esto se debe fundamentalmente a que la purificación de LPS, empleando el método de fenol acuoso de Westphal y Jann (12), permite a los LPS con cadenas O-laterales largas ser extraídos con elevados rendimientos debido a sus marcadas características hidrofílicas. Ha sido reportado por Pitt (15) que el serotipo O7 no manifiesta estas cadenas O-laterales largas y es definido como semirrugoso y con características semihidrofílicas. Esta puede ser la causa del bajo recobrado obtenido utilizando esta metodología. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Schiller *et al* (26), quienes reportan la ausencia de unidades repetitivas de alto peso molecular, en las cadenas laterales, cuando los extractos acuosos obtenidos del serotipo O7 fueron evaluados por SDS-PAGE. Esto concuerda con lo reportado internacionalmente para el serotipo O11 (27) y con los estudios realizados por Esnard *et al* (28,29), quienes reflejan el predominio de este serotipo en aislamientos de infecciones hospitalarias. Trabajos desarrollados colateralmente, en la provincia de Santiago de Cuba, reportan los mismos resultados para este serotipo y el O8, al caracterizar tanto cepas clínicas como de ambiente hospitalario (30). Sin embargo, en nuestro trabajo los serotipos O13 y O16 mostraron un reconocimiento significativo, no reportado hasta este momento en ningún estudio relacionado con esta temática, específicamente para sueros de donantes. Estos resultados fueron corroborados por estudios de serotipificación de cepas circulantes en Ciudad de la Habana, donde se evidenció la presencia del serotipo O13 en sueros de quemados (31). El hecho de que los serotipos O16 y O15 y O8 fueran reconocidos por un número relativamente alto de sueros diferentes se debe a dos razones fundamentalmente: 1: estos serotipos están

circulando en la población estudiada; 2: su reconocimiento se debe a reacciones cruzadas entre estos serotipos y el O11. Esta última afirmación concuerda con trabajos realizados por Yokota *et al* (24), quienes demostraron la existencia de reacciones cruzadas entre los diferentes serotipos de *P. aeruginosa*, por el reconocimiento de epítopes comunes en la región O-polisacáridica del LPS. Similares resultados fueron encontrados por Cobas *et al* (30) para los serotipos O11, O15 y el O4, en trabajos desarrollados en la provincia de Santiago de Cuba. Los resultados obtenidos para los serotipos O16, O15 y O8, no pueden ser correlacionados con los estudios de serotipificación de las cepas ya que este fue realizado solo en casos de pacientes quemados y no en sueros de donantes voluntarios (31). Por lo tanto, es muy importante ampliar los estudios de serotipificación de las cepas de *P. aeruginosa* a los sueros de donantes y comprobar si su presencia se debe a la existencia de reacciones cruzadas o a la circulación propia de los mismos. Es significativo señalar que un aspecto importante que limitó el estudio de nuevos aislamientos y de los existentes, en el caso de los quemados, fue el estado de sepsis generalizado que afectó a estos pacientes, así como la severidad de las lesiones y el shock fisiopatológico propios del trauma que en la mayoría de los casos ocasionó la muerte de los pacientes y por lo tanto no se pudo estudiar la infección desde sus inicios hasta su desaparición. Autores como Pitt (6, 15, 32) hablan a favor de la localización de tipos somáticos individuales de acuerdo al país en que se realice la investigación y la procedencia de los aislamientos (33). En el caso del INTACGLOBIN se evidenció la presencia de anticuerpos anti-LPS contra los serotipos O11, O8, O4 y O6, y sólo del O11 en el GAMMAR IV.. En el caso del INTACGLOBIN el estudio del espectro de anticuerpos presente en el producto ha demostrado la presencia de IgG anti-pseudomonas con títulos por aglutinación que fluctúan entre 1:32 y 1:28 (31), lo cual confirma los resultados obtenidos por la Dra. Esnard (29) en el Instituto de Higiene y Epidemiología en Ciudad de la Habana, quienes demostraron la

presencia de anticuerpos antipseudomonas en donantes de sangre, donde un 20% de los mismos tenían títulos 1:40, lo que puede considerarse significativo. La presencia de anticuerpos antipseudomonas en los sueros de donantes de sangre reflejan contactos con este microorganismo, ya que son poblaciones normales que no han sido inmunizadas ni han tenido el riesgo de un contacto nosocomial. Por lo tanto, el estudio que dirija su atención a la producción de inmunoglobulinas específicas al serotipo que más circule en el ambiente, daría resultados muy alentadores en la inmunoterapia contra las infecciones por *P. aeruginosa*.

Referencias

1. Jones AM, Webb AK. Recent advances in cross-infection in cystic fibrosis: Burkholderia cepacia complex, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA and Pandoraea spp. *J R Soc Med.* 2003; 96 Suppl 43:66-72.
2. Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, Wiener-Kronish JP. Single-Nucleotide-Polymorphism Mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion Toxins for Development of a Diagnostic Multiplex PCR System. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3526-31.
3. Lesman-Movshovich E, Gilboa-Garber N. *Pseudomonas aeruginosa* lectin PA-III as a powerful probe for human and bovine milk analysis. *J Dairy Sci.* 2003; 86(7):2276-82.
4. Adewoye LO and Worobec EA.. Identification and characterization of the *gltK* gene encoding a membrane associated glucose transport protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* 2002; 53:323-330.
5. Roy-Burman A, Sayerl RH, Racine S, Swanson. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis.* 2001;183(12):1767-74.
6. Pitt TL: Epidemiological typing of *P. aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1988;7:238-47.
7. Kumar A. Evidence of proton-dependent efflux of drugs as a resistance mechanism in *Serratia marcescens*. Abstract # C1-2020, 41st Annual ICAAC, Chicago, Illinois.
8. Kumar A and Worobec EA. Fluoroquinilone resistance of *Serratia marcescens*: involvement of a proton gradient-dependent efflux pump. *J Antimicro. Chemother.* 2002; 50:593-596.
9. Hancock REW. Outer Membrane Proteins. In: Biotechnology Handbook: *Pseudomonas*. (Ed. T. Montie) Plenum Publishing Corp. London, UK. 1998:139-167.
10. Zhanel GG, Laing N, Hazelton P, Karlowky JA and Hoban DJ. Development and characterization of glycopeptide intermediate susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA). 66 *Conjoint Meeting on Infectious Disease*, Toronto, ON; 1998.
11. Tschetter LR, Adewoye LO. Characterization of *gltB*, the structural gene for the *Pseudomonas aeruginosa* glucose binding protein. Canadian Society of Microbiologists Annual General Meeting, Guelph, ON. 1998.
12. Westphal O and Jann K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedures. *Methods Carbohydr. Chem.* 1965;5:83-1
13. KDO Yashwant D.K, Zelther JY. "A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gramnegative bacteria. *Analytical Biochemistry.* 1978;85:595-601.
14. Chao-Ming Tsa and Carl E. Frasch A Sensitive Silver Stain for Detecting Lipopolysaccharides in Polysacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 1982;1:115-19
15. Pitt TL, Barth AL. *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important *Pseudomonas*. *Princ. and Pract. of Clin. Microbiol.* 1997; 8:14-8.
16. Lowry OH. *et al.* Protein measurement with the Folin reagent. *J.Biol.Chem.* 1951;193: 265-275.
17. Castañeda L, Castellano F, Castellano ME, Cádiz A. Utilización de Intacglobin en sepsis graves en una unidad de cuidados intensivos. *Rev. Cienc. Med.* 1994;3(12):1-61.
18. Hatano K, *et al.* Biologic activity of antibodies to the neutral polysaccharide component of the *PS. aeruginosa* lipopolysaccharide an blocked by o-side chains and mucoid exopolysaccharide. *Infect Immun.* 1994;3:231-237.

19. Kumar PN. Antilipopolsaccharide antibody levels in patient with AIDS at the onset of *Ps. aeruginosa* bacteremia. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1994; 7(6):587-91.
20. Hoiby N, Pedersen SS, Shand GH, Doring G, Holder IA (eds): Lipopolysaccharide and virulence of *P.aeruginosa*. *Infection. Antibiot Chemother.* 1989;42:1-7.
21. Kato J, Nakamura T, Kuroda A, Ohtake H. Cloning and characterization of Chemotaxis Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999; 63(1):155-61.
22. Darveau RP and Hancock REW. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J. Bacteriol.* 1983;155:831-38.
23. Masoud H, et al. General strategy for structure analysis of the oligosaccharide region of lipopolysaccharides of *P. aeruginosa*. *Biochemistry.* 1994;33(35):: 10568-78.
24. Yokota S, et al. Identification of the lipopolysaccharide core region as the receptor site for a cytotoxin-converting, phage, phi ctx, of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1994;176 (17):5262-69
25. Hatano K, Goldberg JB, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* LPS: Evidence that the O side chains and common antigens are on the same molecule. *J. Bacteriol.* 1994;8: 5117-5128.
26. Shiller NL. Characterization of susceptibility of *P. aeruginosa* to complement-mediated Killing. Role of antibodies to the rough lipopolygaccharide serun-sensitive strains. *Infect Immun* 1988; 56:632-39.
27. Beveridge TJ. Structure of gramnegative Cells Walls and their Derived Membrane Vesicles. *J. Bacteriol.* 2000; 8(181):725-33.
28. Esnard SC. Identificación y caracterización de bacilos Gramnegativos no fermentadores aislados en el medio hospitalario. *Rev. Cubana. Hig. Epimediol.* 1997;35(1):30-7.
29. Esnard SC. *Pseudomonas aeruginosa* I. Biología. *Vaccimonitor.* 1997; 6(9):2-9.
30. Cobas PG. Caracterización de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico y ambiental. *Tesis de Maestría en Biotecnología.* 1998.
31. Berrios D. Estudio de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes quemados. Tesis de Diploma. 2000.
32. Bhat R, Marx A, Galanos C, and Conrad RS. Structural studies of lipid A from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: occurrence of 4-amino-deoxyarabinose. *J. Bacteriol.* 1990;172:6631-6636.
33. Adewoye LO, and Worobec EA. Multiple environmental factors regulate the expression of the carbohydrate-selective OprB porin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 1999;45:1033-1042.

Recognises of antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* by human sera

Abstract

This work presents the recognition of different serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide by human sera. The lipopolysaccharides were purified by the methods of Wespthal and Jann. On the other hand, a total of 104 serums, of infected patients and voluntary donors, coming from different hospitals and from the Blood Bank of the Marianao municipality were used for the recognition of the antigenic lipopolysaccharides, using of dot blot. Our results showed that the serotypes most frequently recognized by the tested serums, were O11, O13, O16 and O15, with significant differences among them. ($p < 0,05$)

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, lipopolysaccharide, serotypes.