

# Evaluación de la respuesta de anticuerpos hacia antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*

Aniel Moya<sup>1</sup>, Adriana Callicó<sup>1</sup>, Bárbara Cedré<sup>1</sup>, Frank Camacho<sup>1</sup>, Alexei Simón<sup>1</sup>, Juan Almenares<sup>2</sup>, Tania Valmaseda<sup>1</sup>, Alina Ocanto<sup>1</sup>, Armando Cádiz<sup>3</sup>, Sara C. Esnard<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No.19805. La Lisa. A.P. 1601 C.P. 11600, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: [amoya@finlay.edu.cu](mailto:amoya@finlay.edu.cu)

<sup>2</sup> Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba.

<sup>3</sup> Planta de Hemoderivados. Ciudad de La Habana, Cuba.

*Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno extracelular que genera una respuesta de anticuerpos específicos con utilidad para el diagnóstico y vacunas. En el presente estudio nos propusimos evaluar en suero humano los niveles de anticuerpos contra antígenos relevantes de *P. aeruginosa*. Realizamos la determinación de anticuerpos IgG contra tres exoenzimas, consideradas como factores de virulencia de mayor importancia en infecciones. Este resultado dio paso a la evaluación del reconocimiento de IgG e IgA hacia antígenos de la envoltura celular bacteriana por ELISA de células enteras. Todos los sueros evaluados mostraron títulos de IgG e IgA superiores a los individuos sanos, con excepción de dos muestras de pacientes que no mostraron alto título. Este ensayo permitió analizar el nivel de reconocimiento hacia los antígenos más expuestos de la bacteria que incluyen principalmente LPS y proteínas de membrana externa. Se encontró diferencias entre los valores de densidad óptica a 450 nm de individuos sanos y enfermos. El método usado permitió seleccionar dos sueros de pacientes de diferentes tipos de infecciones que fueron comparados por Western blot. Se observó que aunque los sueros tenían reacción hacia distintos serotipos de *P. aeruginosa*, la intensidad del reconocimiento variaba según el tipo de infección.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, inmunoglobulinas, fibrosis quística, diagnóstico de infecciones.

## Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es un importante patógeno en el humano que predominantemente afecta las vías respiratorias y que solamente produce infección en pacientes con problemas en los mecanismos normales de defensa inmune (1).

Múltiples son los reportes cada año sobre sus infecciones en pacientes inmunodeprimidos y pacientes con fibrosis quística, donde llega a constituir la principal causa de muerte por infecciones bacterianas (2). Esta bacteria durante su colonización expresa gran variedad de toxinas que por su efecto en el hospedero son consideradas como factores de virulencia (3).

Estudios recientes dirigen la atención hacia la excreción de enzimas extracelulares capaces de interactuar con las células epiteliales a través de mecanismos tan eficientes como el sistema de secreción tipo III (4) y la liberación de vesículas que contienen enzimas proteolíticas (3). Ambos mecanismos junto al sistema sensor del quórum (5) y las biopelículas (6) hacen que una vez establecida la infección la erradicación sea prácticamente imposible, lo que influye en los altos índices de morbilidad y mortalidad (7).

En la etapa de invasión a los tejidos *P. aeruginosa* produce y excreta toxinas que le permiten implantarse; entre ellas las más estudiadas son: la elastasa, la proteasa alcalina y la exotoxina A (8).

La elastasa es una metaloproteasa que degrada la elastina, el colágeno, la IgA, la IgG y la fibronectina, para exponer receptores al ataque bacteriano en la mucosa de los pulmones donde interfiere en la función ciliar en infecciones crónicas (9). Asociada a la alta densidad de crecimiento bacteriano se ha demostrado que también degrada la transferrina y libera hierro al medio el cual puede generar radicales hidróxilos en el sitio de la infección y contribuir al daño tisular (10). Junto con la elastasa, la proteasa alcalina destruye estructuras compuestas por fibrinas y elastina; se reporta que inactiva el interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (11).

Por otro lado la exotoxina A tiene el mismo mecanismo de acción de la toxina diftérica. Esta exoenzima tiene actividad necrótica en el sitio de colonización bacteriana y cuando se purifica tiene alto poder letal en animales de experimentación, incluyendo primates (10). Esta exotoxina daña severamente los tejidos infectados y produce hemorragias de órganos internos, especialmente en los pulmones y la córnea.

En infecciones crónicas estas tres enzimas son excretadas en la colonización y se ha demostrado que son antigénicamente relevantes. Tal es el caso de la exotoxina A, que se emplea conjugada con LPS en vacunas, generando anticuerpos protectores (12).

En el estudio de la infección resulta interesante el análisis de la elastasa, la fosfatasa alcalina y la exotoxina A, como marcadores de la infección (13), sin embargo es variable la respuesta inmune humoral que se dirige hacia ellos.

En la infección en humanos se producen anticuerpos específicos contra el patógeno, que tienen valor diagnóstico. Durante infecciones crónicas por *Pseudomonas* en pacientes fibroquísticos se han empleado técnicas inmunoenzimáticas que correlacionan el nivel de anticuerpos IgG específicos con la severidad de la infección; observándose en pacientes con infección pulmonar, cómo según la subclase de IgG que se genere es determinante para conducir o no al daño del epitelio pulmonar (14, 15). Toda esta información ha sido la base de la generación de inmunógenos vacunales; sin embargo a pesar de ello aún no contamos con una vacuna efectiva. En este trabajo se evalúa la respuesta de anticuerpos en grupos de pacientes infectados hacia enzimas proteolíticas, que han sido definidas como marcadores de la

severidad de infecciones pulmonares y la respuesta de sueros seleccionados hacia antígenos de membrana externa de *P. aeruginosa* empleando ELISA de células enteras y Western blot.

## Materiales y Métodos

### 1. Microorganismos usados durante el estudio

**Tabla 1. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* empleadas en el estudio.**

Cepa	Descripción
Serotipo O1	(ATCC): 33348
Serotipo O2a	(ATCC): 33349
Serotipo O4	(ATCC): 33351
Serotipo O5	(IATS)O5
Serotipo O6	(ATCC): 33354
Serotipo O7	(ATCC): 33353
Serotipo O8	(ATCC): 33355
Serotipo O9	(ATCC): 33356
Serotipo O10	(ATCC): 33357
Serotipo O11	(ATCC): 33358
Serotipo O12	(ATCC): 33359
Serotipo O13	(ATCC): 33360
Serotipo O14	(ATCC): 33361

ATCC: American Type Culture Collection

IATS: International Antigenic Typing Scheme

### 2. Obtención de sueros

Los sueros utilizados en este trabajo fueron colectados en hospitales de Ciudad de La Habana, Cuba. Todos fueron seleccionados de individuos con infección por *P. aeruginosa*, confirmada por diagnóstico microbiológico. Se colectaron 11 sueros de pacientes con sepsis nosocomial, 5 de pacientes con fibrosis quística y 2 con infección respiratoria. Todas las muestras de sueros fueron consideradas como sueros con títulos IgG anti-*Pseudomonas aeruginosa*.

Los sueros de individuos presumiblemente sanos fueron obtenidos del Laboratorio (SUMA) del Banco de Sangre de Marianao (Ciudad Habana, Cuba). Todas las muestras fueron certificadas como sueros libres de enfermedades transmisibles (VIH, hepatitis B, hepatitis C y *Treponema pallidum*) y estos se seleccionaron siguiendo las medidas de bioseguridad para el empleo de este tipo de muestras.

Los sueros empleados en el estudio fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

### 3. Obtención de suero negativo a *Pseudomonas aeruginosa*

Para los ensayos inmunoenzimáticos fue necesario crear un suero control negativo a antígenos de membrana externa de *P. aeruginosa*, el cual se obtuvo por adsorción con el empleo de una mezcla de sueros de donantes sanos según el siguiente protocolo: Se sembraron cepas de 13 serotipos distintos de la bacteria (Tabla 1), en placas de agar sólido suplementado con Caldo Cerebro Corazón (BHI), a 37 °C durante 24 h. La biomasa obtenida fue resuspendida en solución salina estéril y se inactivó durante 1 h a 56 °C, con agitación constante. Luego se centrifugó la suspensión a 5 000 g durante 30 min y las células inactivadas se resuspendieron en igual volumen de suero e incubaron 1 h a 37 °C para eliminar títulos presentes hacia células enteras. Se centrifugó nuevamente

por 30 min a 5 000 g para separar las células del suero y al suero obtenido libre de células bacterianas se le añadió por segunda vez células de *P. aeruginosa* inactivadas. Este procedimiento se repitió tres veces al mismo suero para eliminar los anticuerpos específicos a antígenos de superficie. Por último, el suero recuperado se filtró estéril con un filtro Sartorius 0,2 µm y se conservó a -20 °C hasta su empleo.

### 4. Electroforesis y Western Blot para LPS y células completas

#### Preparación de LPS

Para la evaluación del lipopolisacárido (LPS) por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS se realizó la preparación de la muestra, según el método de digestión con proteínaasa K (16). La tinción se realizó con una solución de plata específica para LPS (17).

#### Preparación de células enteras

Se tomó 1 mL de cada suspensión celular de *P. aeruginosa*, crecida en medio BHI hasta un valor de densidad óptica (D.O) a 600 nm de 0,9 y se centrifugó a 5000 g durante 1 min. Al precipitado obtenido, se le añadió 100 µL de solución de lisis (1M Tris-HCL pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 4% β-mercaptoetanol) y se calentó a 100 °C durante 5 min. La muestra fue centrifugada a 5000 g durante 5 min para separar las células del sobrenadante y se aplicaron en cada pocillo 20 µL de muestra. Se realizó electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 12,5 % con SDS, (18). La tinción se realizó con azul Coomassie para observar el patrón de bandas correspondientes a las células enteras.

#### Western blot

Después de la electroforesis, las proteínas de un segundo gel (réplica sin teñir), se transfirieron a un papel de nitrocelulosa Hybond-C Extra (Amersham Biosciences), se bloqueó con la solución de bloqueo (Solución Tampón Fosfato-Salina (STFS) pH 7.2 /Tween 20 (0,05%)/Leche descremada (3%) durante 1 h a 37 °C y posteriormente se lavó tres veces con solución de lavado (STFS/Tween 20(0,05%)). Al papel de nitrocelulosa se le añadió la muestra de suero a evaluar diluido 1/200 con STFS /Tween 20 (0,05%)/leche (1%) y se incubó a 37 °C durante 2 h. Se realizaron tres lavados con la solución de lavado y posteriormente se incubó 1 h con el anticuerpo anti IgG humana obtenido en carnero conjugado con peroxidasa de rábano picante (A6029, SIGMA-Aldrich), diluido 1/10000 en STFS /Tween 20 (0,05%)/leche (1%). A continuación se realizaron dos lavados con la solución de lavado y un tercero sólo con STFS. Finalmente se añadió la solución sustrato (STFS/Diaminobencidina 25 µg/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 µL) (18) y se reveló hasta observar las bandas de reconocimiento correspondientes.

### 5. Determinación de enzimas proteolíticas

Se determinó el título de anticuerpos específicos a exotoxina A, elastasa y proteasa alcalina según Tramper-Stranders, et al (13).

Esta determinación se realizó utilizando el estuche de ELISA comercial (Mediagnost lot 090204, Reutlingen, Germany). Este ELISA semicuantitativo determina los niveles de IgG contra tres antígenos de *P. aeruginosa*: elastasa, exotoxina A y proteasa alcalina. Las muestras de suero fueron diluidas por un factor de dilución de 1/1000 con STFS. En cada uno de los pocillos de una

microplaca de ELISA de 96 pocillos se aplicó 100 µL de la muestra diluida e incubada a 37 °C durante 2 h. Luego se aspiró y se lavó tres veces intensivamente con STFS/Tween-20, y se le aplicó posteriormente la solución del conjugado (anti IgG humana-peroxidasa) a cada pocillo. Se incubó la placa por 2 h a 37 °C y después de tres lavados con STFS/Tween-20, se añadió a los pocillos 100 µL de solución sustrato (tetrametil bencidina, lot. P330303) y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad. Después de media hora la reacción se detuvo con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1%). La lectura se realizó en un lector de placas (Labsystems Multiskan Multisoft, Finlandia) a 450 nm. El título fue extrapolado de los valores de densidad óptica de dos sueros controles negativos y dos positivos de acuerdo al manual del fabricante.

## 6. ELISA de células completas

Las células empleadas en el ELISA se inactivaron por calor a partir de un cultivo celular de *P. aeruginosa* crecido toda la noche en medio BHI. Se tomaron 100 mL de cultivo y se centrifugó durante 30 min a 5 000 g. El botón celular obtenido se resuspendió en igual volumen de STFS estéril y se inactivó a 56 °C, durante 1 h con agitación suave en un baño (HAAKE, Alemania). Luego al comprobar la viabilidad de las células en medio rico BHI, no se observó crecimiento bacteriano.

Se recubrió una placa PolySorp™ (Nunc, Dinamarca) de 96 pocillos con 100 µL/pocillos de una suspensión celular *P. aeruginosa* serotipo O11 inactivadas, ajustada con STFS pH 7.2 a una DO<sub>600nm</sub> de 1,0, lo que equivalió a una concentración aproximada de 8 x 10<sup>8</sup> células por mL. Cada placa se incubó durante toda la noche a 37 °C sin agitación hasta que se evaporó el solvente.

Al día siguiente, después de tres lavados con la solución de lavado (STFS pH 7.2/Tween 20 (0,05%), la placa se bloqueó con la solución de bloqueo (STFS pH 7.2/Tween 20 (0,05%)/Leche descremada (3%)), durante 1 h y luego se añadió el suero diluido con STFS: 1/200 para determinar IgA y 1/500 para la determinación de IgG. Se incubó 1 h a 37 °C. A continuación se realizaron tres lavados con solución de lavado y se añadió el anticuerpo conjugado con la peroxidasa de rábano picante diluido 1/10000. Se incubó durante 1 h a 37 °C. Después de seis lavados con solución de lavado se añadió a cada pocillo 100 µL de la solución sustrato (12,5 mL de Tampón Fosfato-Citrato pH 4.6, 5 mg de 1,2 orto-fenilendiamina (OPD) y 5µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck)). Se dejó reaccionar durante 15 min a temperatura ambiente y se detuvo la reacción con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1%). La lectura se realizó a una D.O. de 492 nm. El ELISA de células completas fue utilizado para determinar IgA e IgG. Para IgG se empleó un conjugado anti-IgG humano obtenido en carnero acoplado a peroxidasa de rábano picante (SIGMA-Aldrich #A6029) y para IgA se empleó un conjugado anti-IgA humano obtenido en carnero, acoplado a peroxidasa de rábano picante (SIGMA-Aldrich #A7032). Como suero control positivo se empleó una mezcla de sueros positivos obtenidos en nuestro laboratorio [19]. El suero negativo empleado para determinar IgA e IgG fue descrito anteriormente en este artículo. El valor de corte se determinó como la media de los valores de D.O. a 492 nm de los sueros controles negativos + 2 desviaciones estándar.

## Resultados y Discusión

La generación de vacunas efectivas y de anticuerpos específicos para uso terapéutico en infecciones por *P. aeruginosa* es difícil por

la variedad de estructuras antigénicas que se presentan durante sus infecciones. Esta característica no es única de este microorganismo, todas las bacterias patógenas en cierto grado contienen estructuras que activan el sistema inmune generando respuestas ante el estímulo antigénico, lo que ha permitido el desarrollo de vacunas que controlan infecciones bacterianas. En el caso de *P. aeruginosa*, aunque se conocen los principales factores de virulencia, las vacunas que se han desarrollado hasta la fecha no son capaces de controlar los estados infectivos que ella produce. El reto principal es encontrar el antígeno adecuado, pues *P. aeruginosa* es una bacteria oportunista que durante sus infecciones su efecto es más pronunciado en la medida que aumenta el deterioro del sistema inmune del hospedero.

Cuando evaluamos la respuesta de anticuerpos hacia antígenos de *P. aeruginosa* observamos que es mayor el nivel de reconocimiento hacia enzimas proteolíticas en pacientes infectados. En la Figura 1 mostramos el reconocimiento hacia tres factores de virulencia que produce *P. aeruginosa* en sus infecciones (13).

Una vez que se establece la infección en el tejido, *P. aeruginosa* produce enzimas con alto efecto virulento que genera una marcada respuesta de anticuerpos útiles para su empleo como marcador del grado de infección (20). Esto no ocurre en pacientes sanos donde *P. aeruginosa* no llega a una producción prolongada de exoenzimas, pues la infección oportunista no ha ocurrido como es el caso del suero normal y mezcla de sueros en la (Figura 1). Sin embargo siempre se detectan anticuerpos hacia casi todos los antígenos de esta bacteria por el grado de exposición a esta especie bacteriana y su interacción con el ser humano de manera frecuente sin causar infección. Al parecer hay anticuerpos que imposibilitan el inicio de la infección en individuos inmunocompetentes que a esos niveles son suficientes.

La presencia en individuos enfermos de elevados niveles de anticuerpos contra antígenos bacterianos son indicios de infecciones recientes o de eventos que están aconteciendo en el momento de la toma de muestra (Figura 1). Sin la necesidad de acudir a técnicas microbiológicas de aislamiento bacteriano se puede estudiar la producción de anticuerpos específicos y por técnicas avanzadas, conocer hacia qué epítomos se dirigen los anticuerpos de mayor afinidad (21).

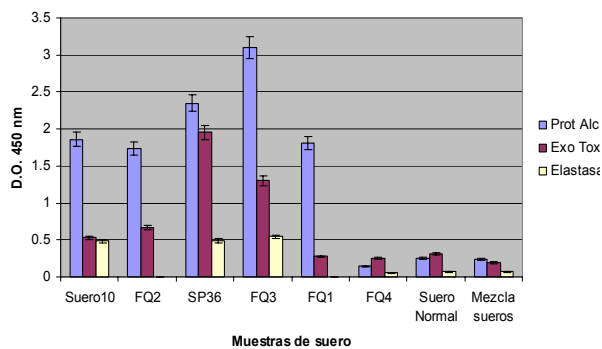
Al evaluar el reconocimiento de inmunoglobulinas empleando un ELISA de células completas para *P. aeruginosa* serotipo O11, observamos que los antígenos de la envoltura celular permiten ver el grado de respuesta hacia estos antígenos. El primer paso acometido en nuestro experimento fue la obtención de sueros negativos a antígenos de membrana externa, pues incluso individuos sanos mostraron reacción hacia este tipo de antígenos. Esta bacteria presente en múltiples ambientes es capaz de generar anticuerpos en el humano al estar en contacto de forma frecuente. El suero negativo fue útil para establecer el valor de corte de este ELISA cualitativo empleado. Se seleccionó el serotipo O11, entre los 20 reportados, por los resultados obtenidos en estudios de clasificación de cepas circulantes en nuestro país, donde se ha observado un marcado reconocimiento de anticuerpos en sueros evaluados hacia este serotipo en particular (22).

Son los antígenos de membrana externa los más estudiados en la búsqueda de candidatos vacunales efectivos, pues son los más expuestos de la bacteria y en contacto con los mediadores de la respuesta inmune en las etapas iniciales de la infección. En este

trabajo dirigimos nuestra determinación a los niveles de IgG en pacientes infectados y añadimos la evaluación de la IgA, como otra de las inmunoglobulinas más importantes en el control de bacterias que interactúan durante una infección en tejidos mucosales, como es el caso de individuos con infección pulmonar.

Los anticuerpos IgA específicos a *P. aeruginosa* pueden ser también considerados como marcadores tempranos de la colonización bacteriana en infecciones pulmonares de pacientes fibroquísticos, donde la inmunidad a nivel de mucosa desempeña un importante papel durante la infección (23). Estos niveles de IgA sérica pudieran ser un indicador de la IgA secretora.

En la Figura 2 se muestra el reconocimiento a antígenos de *P. aeruginosa*, se evalúan los niveles de IgG e IgA específicos. Como era de esperar, ambos valores detectados en suero hacia células

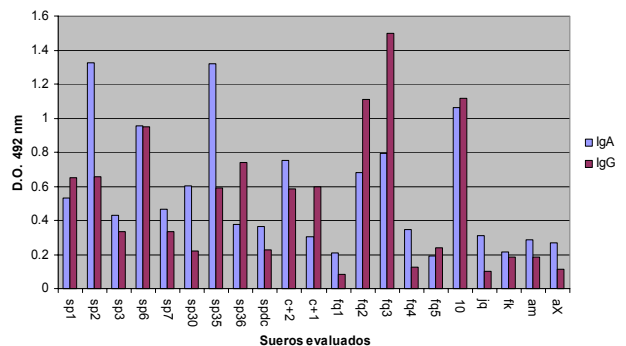


**Figura 1.** Reconocimiento de IgG evaluado por ELISA de células completas de sueros de pacientes seleccionados contra proteasa alcalina, exotoxina A y elastasa. Hacia estos factores de virulencia la respuesta de anticuerpos medida es más pronunciada en pacientes enfermos (suero 10, FQ2, SP36, FQ3, FQ1, FQ4) que en individuos sanos (sueros normal y mezcla de sueros).

Los sueros fq3, fq2 y suero 10 tienen títulos de IgG por encima de 1,0 a DO<sub>492nm</sub>. La dilución de trabajo de los sueros para determinar IgG fue de 1/500, para buscar mayor especificidad hacia antígenos de membrana externa de esta bacteria. Consideramos que la existencia de estructuras antigénicas muy similares entre *E. coli* y *P. aeruginosa* (24) son responsables de las reacciones cruzadas de los anticuerpos hacia células completas de ambas bacterias, que dan lugar a una sobrestimación de la presencia de anticuerpos cuando no se tiene en cuenta este problema. Antígenos similares pueden falsear los datos que se analizan; por esta razón se buscó la dilución más idónea para evaluar anticuerpos hacia antígenos de membrana externa de *P. aeruginosa* (21). Ambas bacterias presentan una alta homología en el genoma en comparación con los demás genomas bacterianos hasta la fecha secuenciados y similitudes en los componentes proteicos de la envoltura celular (25).

Los valores del título de IgA de sueros de pacientes fueron relativamente superiores a las muestras de suero de individuos sanos. Por otra parte los sueros sp35, sp2 y 10 tienen títulos de IgA por encima de 1 a DO<sub>492nm</sub>, mostrándonos que se generan también ante la infección por esta bacteria anticuerpos IgA. En el caso de la IgA se trabajó con la dilución 1/200 de los sueros atendiendo a que las concentraciones en suero de IgA son menores que las de IgG (26). La respuesta humoral contra *P. aeruginosa*, cuando coloniza

completas inactivadas fueron más elevados en pacientes enfermos que en los individuos sanos. Los niveles de inmunoglobulinas específicas varían incluso de un paciente a otro, aunque presenten la misma enfermedad. Activaciones diferentes en la producción de anticuerpos hacia patógenos extracelulares como *P. aeruginosa* son el resultado de la exposición antigénica en pacientes con infecciones severas, los cuales correlacionan con el pronóstico de la infección (13). En esta experiencia, en el caso del suero fq 4 los valores de IgG son bajos, tanto contra exoenzimas (Figura 1) como para antígenos de la membrana externa (Figura 2). Este hecho puede estar justificado por el grado de inmunosupresión en el paciente; pues se conoce que la severidad de las infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística trae como consecuencia final un deterioro de la capacidad para generar anticuerpos contra el patógeno.



**Figura 2.** Presencia de anticuerpos IgA e IgG en sueros de pacientes infectados y de individuos sanos, evaluados en el estudio. Se observan los valores de D.O.<sub>492nm</sub> de las muestras a los cuales se les restó el valor de D.O.<sub>492nm</sub> correspondiente al suero control negativo.

el tracto mucosal de las vías respiratorias es la que más prevalece en el control de las infecciones por parte del hospedero. La eliminación de *P. aeruginosa* en infecciones sistémicas está mediada principalmente por anticuerpos IgG1 y la opsonización dependiente del complemento (13) y la IgA secretora es probablemente la primera línea de defensa en la prevención de la adherencia y la subsiguiente infección de tejidos mucosales como son los pulmones, tracto urogenital, o sinus paranasal. Por la importancia de ambas inmunoglobulinas en la infección por *P. aeruginosa* es que las vacunas contra este patógeno deben inducir anticuerpos protectivos del tipo IgA e IgG (26, 27).

La diferencia que se observa en los valores de D.O.<sub>492nm</sub> observados entre los enfermos e individuos sanos, es una expresión de los anticuerpos generados en los pacientes enfermos. Esto apoya la idea de que durante la infección por *Pseudomonas* las inmunoglobulinas participan en la defensa del organismo contra el patógeno (28). Solo en tres muestras de pacientes los niveles de IgG fueron inferiores al resto de las muestras evaluadas como ocurre con el suero fq1, fq4 y el jq. Sin embargo al evaluar los títulos de IgG hacia enzimas proteolíticas el fq1 mostró alto título hacia la proteasa alcalina. No podemos por esta razón decir que estos pacientes no producen anticuerpos contra la bacteria durante la infección; pero esto podría ser una señal del momento en que se

encuentra la infección, señal que puede ser detectable a partir de muestras de sueros. Sería interesante correlacionar el estado del paciente en el momento de la toma de muestra de suero y su estado clínico, pues es probable que exista alguna correlación entre estos valores que nos permitan llegar a mejores diagnósticos.

Al establecer una comparación de un suero con bajo nivel de IgA (suero sp36) con uno de mayor lectura de D.O. a 492 nm (suero 10), observamos que su respuesta hacia exotoxinas presenta otro patrón de reconocimiento (Figuras 1 y 2).

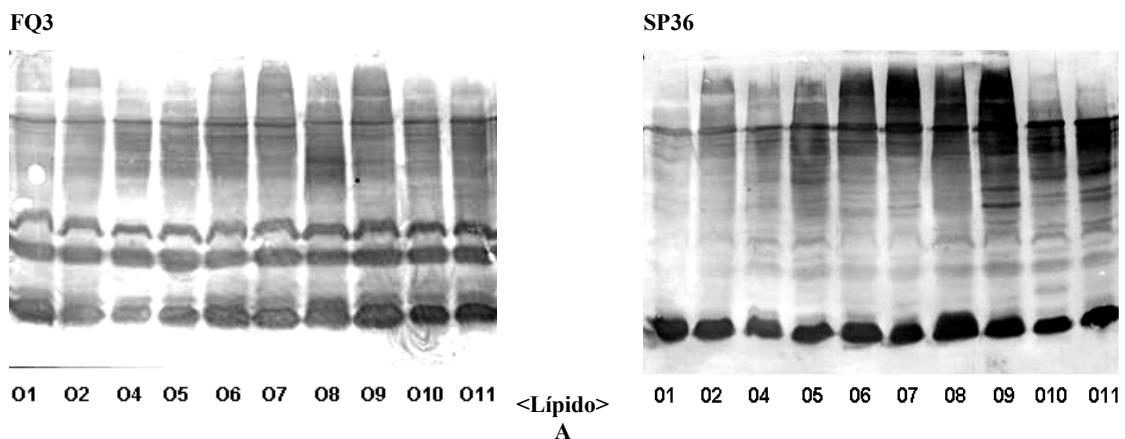
Los valores de reconocimiento hacia estas enzimas son superiores en el suero sp36 que los valores encontrados en el suero 10, donde se obtuvo mayor lectura de D.O. a 492 nm hacia células enteras (Figura 2). El suero fq3 con alto título de IgG hacia células completas mostró valores de IgG anti exotoxina A inferiores al suero sp36, el cual tuvo menos lectura contra antígenos de células enteras que los sueros 10 y fq3 *Pseudomonas aeruginosa* expresa gran cantidad de factores de virulencia que varían según el curso de la infección y las condiciones de crecimiento en que la bacteria establece la infección en el hospedero. Según los resultados que se muestran en la Figura 2, a diferencia de los sueros de individuos sanos (fk, am, aX) en enfermos se estimula la producción de anticuerpos hacia estructuras de membrana externa.

En todos los casos de individuos enfermos los anticuerpos contra exoenzimas evaluados fueron superiores a individuos sanos y fue hacia la proteasa alcalina la mejor respuesta según esta técnica de evaluación. Este ELISA comercial permite detectar infección crónica en pacientes con fibrosis quística, para el que ha sido creado. Sin embargo existe una gran necesidad de encontrar métodos serológicos que permitan detectar la colonización temprana (13), pues estos anticuerpos se generan una vez implantado el microorganismo en la infección y están presentes en infecciones crónicas de una manera más marcada que en otras infecciones.

Es de una importancia relevante detectar *P. aeruginosa* al inicio de su colonización, pues con un tratamiento adecuado puede detenerse o prevenirse. La infección por *Pseudomonas* en pacientes con fibrosis quística es monitoreada frecuentemente por cultivos de esputo o lavados orofaríngeos. Los métodos serológicos tales como la inmunoelectroforesis cruzada, el Western blot y el ELISA para detectar *P. aeruginosa* no son usados de rutina en el diagnóstico de infección en pacientes con esta afección.

El ELISA de células enteras tiene una alta sensibilidad (96-100%) para detectar colonización crónica (29), sin embargo cuando se determinan anticuerpos particulares se han observado resultados muy variables de un paciente a otro. Tramper-Stranders et al, reportaron en el 2006 que los exámenes serológicos usando antígenos específicos para diagnosticar colonización crónica en pacientes con fibrosis quística no tenían un alto valor diagnóstico para detectar infección temprana en comparación con los métodos de cultivos sucesivos. Pues para etapas iniciales de la colonización se encontraban valores contradictorios en cuanto a la generación de anticuerpos específicos en el enfermo. Sin embargo la detección de anticuerpos específicos sí permite conocer la respuesta inmune humoral en este tipo de pacientes y correlacionarla con el grado de severidad de la infección (13).

El análisis por Western blot del reconocimiento de dos sueros hacia células completas provenientes de dos tipos de infecciones diferentes, el suero SP36 (sepsis nosocomial) y el FQ3 (fibrosis quística) y hacia LPS, nos permitió conocer cómo ambos sueros reconocían antígenos de envoltura celular de una forma muy similar, los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4.



**Figura 3.** Western blot de 10 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* para evaluar el reconocimiento hacia antígenos de células completas de los sueros FQ3 (paciente con fibrosis quística) y suero SP36 (paciente con sepsis nosocomial), con alto reconocimiento hacia exotoxina A, proteasa alcalina y elastasa. Se observa una banda común en todas las muestras correspondientes al Lípido A del LPS.

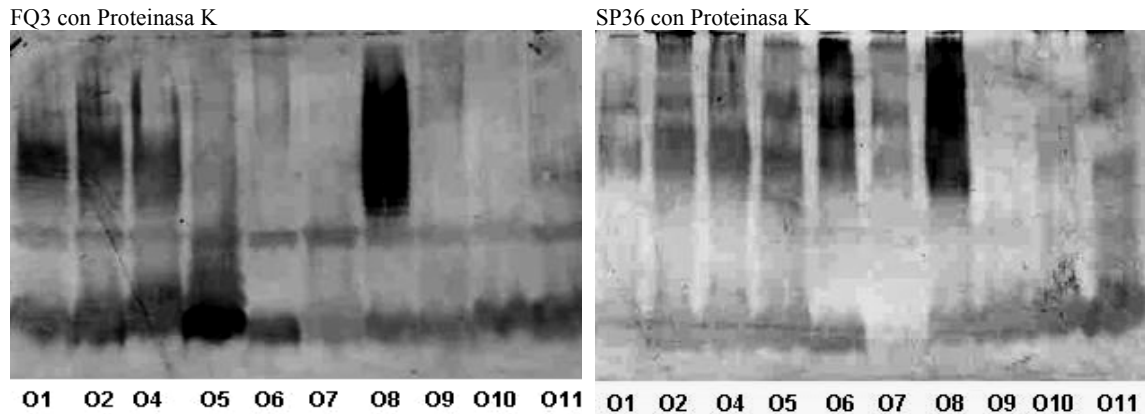
Como se observa en la Figura 3, aunque difiere en intensidad de un suero a otro dando idea de cierta avidez, al evaluar el reconocimiento es similar en ambos hacia los mismos antígenos. El reconocimiento hacia antígenos de células enteras es bastante

marcado, pues como se aprecia incluye bandas presentes a lo largo de todo el papel de nitrocelulosa; la infección genera anticuerpos específicos. Es interesante cómo el reconocimiento hacia la banda correspondiente al lípido A del LPS es bastante fuerte y es que este

antígeno genera una fuerte respuesta de anticuerpos. Sin embargo el suero del paciente FQ (fq3) mostró un mayor reconocimiento. Es un verdadero reto seleccionar de todos los antígenos que generan la producción de anticuerpos cuál es el antígeno que produce una respuesta humoral útil para la selección de inmunógenos vacunales.

Para evaluar la respuesta específica hacia LPS de cada una de las cepas analizadas en el Western blot (Figura 3), se empleó un método que eliminara las proteínas presentes y solo quedarán al transferirse al papel de nitrocelulosa los LPS presentes (Figura 4). Como se observa el reconocimiento hacia LPS, aunque sigue

siendo fuerte para el suero fq3, este es diferente de un serotipo a otro. Pues para *P. aeruginosa* se han reportado hasta la fecha 20 tipos diferentes de LPS banda B, banda responsable de su diferencia por serotipificación (30) y es de especial interés para la producción de candidatos vacunales basados en LPS. Las proteínas de membrana externa en *P. aeruginosa* son similares, de ahí el reconocimiento casi idéntico observado en la Figura 3, que es ya diferente en la Figura 4. Este reconocimiento está en dependencia de los anticuerpos del tipo IgG que se miden en este ensayo y que son un reflejo del grado de exposición a esta bacteria.



**Figura 4.** Western blot de 10 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* para evaluar el reconocimiento hacia LPS por parte de los sueros FQ3 (paciente con fibrosis quística) y suero SP36 (paciente con sepsis nosocomial), con alto reconocimiento hacia exotoxina A, proteasa alcalina y elastasa. Para la preparación de los LPS se empleó el método de digestión con proteínasa K de Hitchcock y Brown, 1983.

La respuesta de anticuerpos está influenciada por las condiciones inmunológicas del paciente, el tratamiento de antibióticos y factores relativos a la bacteria que coloniza, tales como fenotipo y producción de exoproteínas. Pocos artículos refieren el papel diagnóstico de la respuesta de anticuerpos en este tipo de infecciones, pero se conoce cómo aumenta la producción de los mismos en determinados tipos de infección. En pacientes con fibrosis quística, por ejemplo, una de las formas de medir severidad de la infección es según los títulos de IgG hacia la exotoxina A, pero estos títulos no son suficientes para eliminar la infección pues la forma de crecimiento en biopelícula hace más persistente y difícil de eliminar la bacteria por el sistema inmune del hospedero (23). Es bien conocido que en individuos con niveles normales de inmunoglobulinas la infección no progresa pues es neutralizado uno de los eventos principales de la colonización, que es la adherencia, donde los anticuerpos juegan un importante papel en el bloqueo de esta etapa.

En muchas infecciones en humanos el patógeno y el hospedero coexisten por años e incluso décadas (ejemplo: VIH, herpes virus, tuberculosis y malaria). En pacientes con fibrosis quística ocurre lo mismo y aunque la respuesta inmune humoral en estos pacientes es similar a individuos sanos, esta no es capaz por sí sola de eliminar el patógeno en infecciones crónicas. Poco es conocido acerca de la expansión clonal que ocurre en el patógeno durante infecciones prolongadas que involucran adaptaciones genéticas importantes. En infecciones de pacientes con fibrosis quística pulmonar se observa que los factores de virulencia requeridos para el inicio de la infección aguda van diferenciándose en el transcurso de infecciones. Este fenómeno se debe posiblemente a que el fenotipo de las cepas de *P. aeruginosa* presente difiere cada vez más del

fenotipo salvaje como consecuencia de cambios que ocurren en la expresión del genoma bacteriano en infecciones prolongadas (31). Como consecuencia la respuesta humoral hacia el patógeno también ha de variar, pues el microorganismo modifica durante la infección crónica la expresión de estos factores, a modo de sobrevivir en el ambiente donde desarrolla su colonización y de esta manera evade la acción protectora del sistema inmune del hospedero.

Las inmunoglobulinas permiten como herramienta diagnóstica, seguir en qué momento de la infección bacteriana se encuentra el paciente y su empleo para el diagnóstico de infecciones en pacientes de riesgo, como a los pacientes con fibrosis quística pudiera brindarse una mayor calidad en la atención que se le da a este tipo de pacientes en nuestro país.

## Referencias

1. Zheng M. et al. CD4+T cell-independent DNA vaccination against opportunistic infections. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115:3536-3544.
2. Corech R, Rao A, Laxova A, Moss J, Rock MJ, Li Z, Kosorok MR, Splaingard ML, Farrell PM, and Barbieri JT. Early Immune Response to the Components of the Type III System of *Pseudomonas aeruginosa* in Children with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43(8):3956-3962.
3. Bauman SJ, Kuehn MJ. Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes and Infection* 2006;(8):2400-2408.
4. Li L, Ledizet M, Kar K, Koski RA. and Kazmierczak BI. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for rapid and quantitative assessment of Type III virulence phenotypes of *Pseudomonas*

- aeruginosa* isolates. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2005; 4(22):1-14.
5. Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, and Iglewski BH. Microarray Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Regulons: Effects of Growth Phase and Environment. *Journal of Bacteriology* 2003;185(7):2080-2095
  6. Filloux A, Vallet I. Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medicine/Sciences* 2003; 19(1):1-7.
  7. West SE, Zeng L, Lee BL, Kosorok MR, Laxova A, Rock MJ, Splaingard MJ, Farrell PM. Respiratory infections with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA* 2002; 287(22):2958-67
  8. Horii T, Muramatsu H, Monji A, Miyagishima D. Release of exotoxin A, peptidoglycan and endotoxin after exposure of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates to carbapenems in vitro. *Chemotherapy* 2005; 51(6):324-31.
  9. Sokol PA, Kooi C, Hodges RS, Cachia P, and Woods D. E. Immunization with a *Pseudomonas aeruginosa* Elastase Peptide Reduces Severity of Experimental Lung Infections Due to *P. aeruginosa* or *Burkholderia cepacia*. *The Journal of Infectious Diseases* 2000; 181:1682-92.
  10. Miller RA, Britigan BE. Protease cleaved iron-transferrin augments oxidant-mediated endothelial cell injury via hydroxyl radical formation. *The Journal of Clinical Investigation* 1995; 95:2491-500.
  11. Krunkosky TM, Maruo K, Potempa J, Jarrett CL and Travis J. Inhibition of Tumor Necrosis Factor-alpha-Induced RANTES Secretion by Alkaline Protease in A549 Cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2005; 33(5):483-489.
  12. Zuercher AW, Imboden MA, Jampen S, Bosse D, Ulrich M, Chtioui H, Lauterburg BH and Lang AB. Cellular immunity in healthy volunteers treated with an octavalent conjugate *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology* 2005; 143:132-138
  13. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Sliker MG, Terheggen-Lagro SW J, Teding van Berkhout F, Kimpen JLL and Wolfs TFW. Diagnostic value of serological tests against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. *Thorax* 2006; 61:689-693.
  14. Johansen HK, Norregaard L, Gotzsche PC, Pressler T, Koch C, Hoiby N. Antibody response to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients: a marker of therapeutic success?--A 30-year cohort study of survival in Danish CF patients after onset of chronic *P. aeruginosa* lung infection. *Pediatr Pulmonol* 2004; 37(5):427-32.
  15. Pressler T. IgG subclass and chromosomal antibodies and bacterial infection. Subclass antibodies and the clinical course of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 1996; 66(104).
  16. Hitchcock, PJ and TM Brown. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide types in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol*; 1983; 154:269-277.
  17. Tsai CM, Frasch CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1982; 119(1):115-9.
  18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Cap. 18. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Second Ed. 1989:18.47, 18.69-18.75.
  19. Valmaseda T, Alba L, Ochoa R, Moya A, Pino Y, Esnard S. C. Determinación de las condiciones de ensayo óptimas en un ELISA para la detección de anticuerpos séricos IgG anti-LPS de *Pseudomonas aeruginosa* O11. *VacciMonitor* 2004; 13 (3):18-26.
  20. Holder IA. *Pseudomonas* immunotherapy: a historical overview. *Vaccine* 2004; 22:831-839.
  21. Simón A. Selección de mimotopos antigénicos de *Pseudomonas aeruginosa* usando sueros de pacientes. *Tesis de Diploma*. Instituto Finlay. 2006.
  22. Moya A, Joó L, Rodríguez A, Hernández J, Hernández J, Almenares JF, Berrios D, Rodríguez Z, Cádiz A, Esnard SC Immunoglobulin preparation against LPS of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11. *VacciMonitor* 2002; 11(1):1-17.
  23. Bals R, Weiner DJ, and Wilson JM. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *The Journal of Clinical Investigation* 1999; 103(3):303-7.
  24. Brinkman FSL, Bains M, Hancock RW. The Amino Terminus of *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Protein OprF Forms Channels in Lipid Bilayer Membranes: Correlation with a Three-Dimensional Model. *Journal of Bacteriology* 2000;182(18):5251-5255.
  25. Stover C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406: 959-964.
  26. Baumann U, Mansouri E, von Specht B-U. Recombinant OprF-OprI as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Vaccine* 2004; 22:840-847.
  27. Cripps AW, Peek K., Dunkley M, Vento K, Marjason JK, McIntyre ME., Sizer P, Croft D, Sedlak-Weinstein L. Safety and Immunogenicity of an oral inactivated whole-cell *P. aeruginosa* vaccine administered to healthy human subjects. *Infection and Immunity* 2006; 74(2):968-974.
  28. Cross AS, Opal SM, Bhattacharjee AK, Donta ST, Peduzzi PN, Fürer E, Que JU, Cryz Jr. SJ. Immunotherapy of sepsis: flawed concept or faulty implementation? *Vaccine* 1999; 17:S13-S21.
  29. Pedersen SS, Espersen F, Hoiby N. Diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1987; 25:1830-6.
  30. Rocchetta HL, Burrows LL, and Lam JS. Genetics of O-Antigen Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Review* 1999; 63(3):523-553.
  31. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, and Olson MV. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *PNAS* 2006; 103(22):8487-8492.

## Evaluation of antibodies response to *Pseudomonas aeruginosa* antigens

### Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is an extracellular pathogen which elicits a specific antibody response useful for diagnosis and vaccines. The aim of the present study was to evaluate in human serum the levels of antibodies against relevant antigens of *P. aeruginosa*. Determination of IgG antibodies against three exoenzymes, considered as virulence factors of great importance in infections, was carried out. Then, evaluation of IgG and IgA recognition towards antigens of the outer membrane was performed by ELISA of whole cells. All the evaluated sera showed IgG and IgA titers higher than those of the healthy individuals, with exception of two patients' samples that did not show high titers. This assay allowed the analysis of the recognition level towards the most exposed antigens of the bacterium mainly including LPS and outer membrane proteins. Differences were found among optical density values at 450 nm of healthy and sick individuals. The method used allowed to select two patients' serum of different types of infections which were compared by Western blot. It was observed that although the sera reacted against different serotypes of *P. aeruginosa*, the recognition intensity varied according to the type of infection.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, immunoglobulins, cystic fibrosis, quística fibrosis, infection diagnosis.

Recibido: Diciembre de 2006      Aprobado: Abril de 2007