

Evaluación en animales del efecto protector de una inmunoglobulina anti *Pseudomonas aeruginosa* para uso terapéutico

Bárbara Cedré, Mildrey Fariñas, Adriana Callicó, Aniel Moya, Dayana Díaz, Elina Parajón, Yolanda Valdés, Sergio Sifontes, Juan Francisco Infante, Luis Izquierdo, Luis García, Arturo Talavera, Sara C. Esnard, Rosa L. Solís.

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: bcedre@finlay.edu.cu

Pseudomonas aeruginosa constituye uno de los agentes patógenos oportunistas de mayor frecuencia de aislamiento en los diversos procesos infecciosos, por lo que es reconocido como un gran problema de salud a nivel mundial. Al no existir un fármaco de alta efectividad ni vacunas disponibles contra esta bacteria, se emplea una terapia con inmunoglobulinas polivalentes comerciales que de forma combinada con los antibióticos contribuyen a eliminar la infección, aunque los preparados disponibles en el mercado no contienen concentraciones suficientemente elevadas de anticuerpos específicos contra este microorganismo. En este trabajo se llevó a cabo la evaluación en un modelo animal de una inmunoglobulina anti-*Pseudomonas aeruginosa* para uso terapéutico mediante un ensayo de reto con una cepa virulenta. Se evaluó dosis y vía de administración de la misma, así como el valor profiláctico o terapéutico de los anticuerpos. Esta gammaglobulina resultó ser protectora en animales mostrando una sobrevivencia cercana a un 75% en comparación con el grupo control no protegido y además se logra eliminar el estado de portador en los individuos infectados.

Palabras clave: Inmunoglobulina anti-*Pseudomonas*, protección, modelo animal.

Introducción

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo gramnegativo que constituye uno de los agentes patógenos oportunistas de mayor frecuencia de aislamiento en los diversos procesos infecciosos, por lo que es reconocido como un gran problema de salud a nivel mundial (1, 2). Es considerada una de las de más amplia distribución en la naturaleza junto a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (3,4). La infección por *P. aeruginosa* requiere en la mayoría de los casos de una disminución de la inmunidad del hospedero, y de ahí que la respuesta ante la infección bacteriana sea muy débil (5).

P. aeruginosa es un patógeno oportunista que causa infecciones del tracto urinario, infecciones en el sistema respiratorio, dermatitis, bacteremia y una variedad de infecciones sistémicas, particularmente en pacientes con quemaduras severas, con cáncer y pacientes con SIDA que se encuentran inmunocomprometidos. Existe un grupo poblacional especialmente vulnerable a las infecciones por *P. aeruginosa* constituido por los enfermos de fibrosis quística en la que esta bacteria es la responsable de la muerte prematura de estos pacientes (6,7).

En nuestro país esta bacteria se ha mantenido entre los tres primeros lugares como causa de sepsis en los diferentes servicios hospitalarios de alto riesgo, teniendo una elevada significación en la tasa de letalidad.

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 siglo pasado y se ha visto incentivado ante el creciente desarrollo de resistencia de este microorganismo frente a antibióticos de nueva generación. Actualmente, no existe una terapia completamente efectiva con gammas hiperinmunes comerciales que de forma combinada con los antibióticos contribuyen a eliminar la infección (8).

Con este propósito se han preparado y evaluado en modelos animales varias vacunas experimentales para la prevención de este microorganismo (9, 10, 11).

P. aeruginosa es una bacteria resistente a una gran variedad de agentes físicos y químicos, lo cual influye en la alta frecuencia de aislamiento observada y en que sea considerado un patógeno nosocomial primario.

Al no existir un fármaco de alta efectividad, ni vacunas disponibles contra este patógeno, se mantiene una terapia con inmunoglobulinas polivalentes comerciales que de forma combinada con los antibióticos contribuyen a eliminar la infección, aunque los preparados disponibles en el mercado no contienen concentraciones suficientemente elevadas de anticuerpos específicos contra un microorganismo determinado (12).

En Cuba no existe ningún preparado de inmunoglobulina que sea específico contra *P. aeruginosa* pero se ha usado el Intacglobin obteniéndose buenos resultados en un alto porcentaje de los casos tratados (8). Por lo que sería de gran utilidad contar en nuestro país con un preparado hiperinmune específico para el control de las infecciones nosocomiales en los servicios de Caumatología, Politraumatizados y Unidades de Cuidados Intensivos.

Materiales y Métodos

Obtención de la gammaglobulina

Las donaciones de plasma y suero de donantes sanos fueron suministradas por el laboratorio de Control de la Calidad del Banco de Sangre de Marianao, luego de su liberación. Por ser *Pseudomonas aeruginosa* un microorganismo ubicuo que se encuentra ampliamente diseminado en la naturaleza, la mayoría de la población sana presenta títulos de anticuerpos contra esta bacteria por haber estado en contacto con la misma sin que hayan padecido la infección debido a que este microorganismo es un patógeno oportunista que solo causa enfermedad en aquellos individuos con inmunidad deficiente.

Se desarrolló para cada lote un procedimiento de fraccionamiento alcohólico modificado por Cádiz en 1998 (8) y se determinó la concentración de proteínas por la técnica de Lowry (13).

Determinación de la concentración de IgG

A los lotes obtenidos se les determinó el título de anticuerpos IgG mediante un ELISA indirecto cualitativo (14) anti LPS de serotipo O11 por constituir este serotipo el de mayor frecuencia de aislamiento entre la población cubana (15).

Se recubrieron placas de poliestireno de 96 pozos (MaxiSorp, NUnc, Dinamarca) con 100 µL de LPS O11 a una concentración de 2 µg/mL con incubación toda la noche a 4 °C. Se añadió 100 µL de las muestras a evaluar, empleándose como control positivo un suero de paciente convaleciente de una quemadura con aislamiento del serotipo O11 y como control negativo un suero absorbido de anticuerpos anti LPS.

Las muestras cuya DO sea superior al valor de corte establecido para el ensayo (0,29) se considerarán positivas (14).

Ensayo de protección en modelos animales

De los lotes obtenidos se escogió el IV por ser el de mayor título para evaluar la protección generada por la administración pasiva de estos anticuerpos en animales.

Se realizó un ensayo preliminar en ratones Balb/c adultos para determinar vía y dosis de administración de la inmunoglobulina, así como el valor profiláctico o terapéutico de la misma.

Los animales, suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con sus correspondientes certificados de salud, fueron mantenidos antes y durante los ensayos, siguiendo las instrucciones que aparecen en la *Guía para el cuidado y uso de animales de experimentación* (16). El protocolo de experimento y las condiciones de los animales fueron sometidos a la Comisión de Ética de la Dirección de Modelos Animales del Instituto Finlay. Los animales se agruparon en cajas T3 en número de 10. Los grupos I y II recibieron 10 mg de IgG por vía intraperitoneal e intravenosa respectivamente, seguido 2 h después de un reto con 25DL50% de la cepa clínica 5FQ aislada de un paciente fibroquístico, perteneciente al serotipo O9. Los grupos III y IV se usaron para evaluar el efecto terapéutico de la gamma, aplicando primero el reto y luego la IgG, en el primer caso se aplicaron dos dosis, 30 min y dos h después de la infección experimental y en el segundo caso una dosis única 2 h posteriores al reto. El grupo V funcionó como control y solo recibió la cepa de reto. El reto en todos los casos se administró por vía intraperitoneal mezclado con 0,4 mL de mucina gástrica de cerda al 8% como factor estimulante de la virulencia.

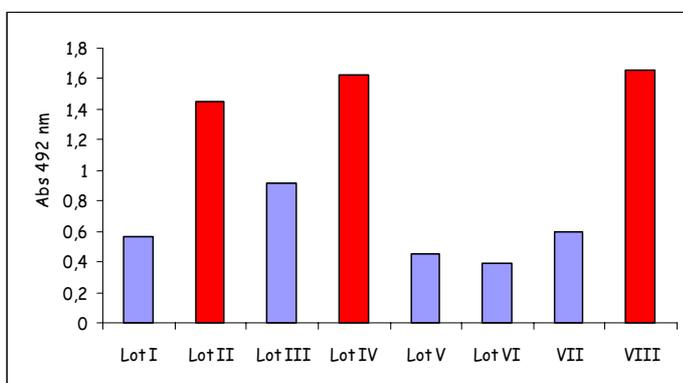


Figura 1. Títulos de anticuerpos IgG anti LPS O11 de *P. aeruginosa* determinado por ELISA.

Se realizó un segundo ensayo donde la vía de inoculación empleada fue la endovenosa y la dosis de reto fue de 400 DL50%. Los animales se agruparon en número de 30. En este ensayo se utilizó el Intacglobin como punto de referencia y un grupo control no inmunizado.

También se llevó a cabo otro experimento para determinar si la IgG anti-*Pseudomonas* era capaz de eliminar el estado de portador en los animales infectados mediante el aislamiento de bacterias en hemocultivo. Para esto los animales se infectaron con una dosis subletal de la cepa virulenta 5FQ y se extrajo sangre del plexo retroorbital a partir de las 4 h y hasta las 72 h de aplicado el reto.

Los tubos de hemocultivo se incubaron de 24-48 h a 37 °C y luego se sembró 100 µL en placas de agar Cetrimide que es un medio de diferenciación de *P. aeruginosa* por la producción de pigmentos. Se asignaron valores arbitrarios de 0 para la negatividad y 1 para la positividad.

Resultados y Discusión

Obtención de la gammaglobulina

En la Tabla 1 se muestran los resultados del fraccionamiento alcohólico de cada lote obtenido.

Tabla 1. Resultados del fraccionamiento alcohólico

Lote	Volumen inicial (mL)	Volumen final (mL)	Concentración de proteínas (mg/L)
I	485	65	9,7
II	930	79	33,45
III	760	58	27,75
IV	1250	85	32,1
V	76	35	11,2
VI	75	25	12,8
VII	90	25	19,65
VIII	42	21	19,5

Los lotes I-IV fueron obtenidos a partir de plasma sanguíneo y los lotes V-VIII a partir de suero completo. De los 8 lotes obtenidos, el II, III, IV, VIII presentaron los valores más altos de concentración de proteínas totales como se puede apreciar en Tabla 1.

Los títulos de anticuerpos específicos anti-LPS de *P. aeruginosa* se muestran en la Figura 1.

En el caso de los lotes II y VIII existe una correspondencia entre los valores de proteínas totales y el título de IgG., estos junto con el lote IV mostraron los títulos más altos de anticuerpos, lo que sirvió de criterio de selección para su evaluación en modelos animales. De estos se escogió el lote IV para los primeros estudios por contar con mayor volumen que nos permitiera reproducir los experimentos.

Ensayo de protección en modelos animales

En la Figura 2 se muestran los resultados del ensayo preliminar realizado para establecer los parámetros definitivos del experimento, tales como discernir cual era la vía de administración más ventajosa y cuantas dosis eran necesarias para lograr

protección y en la Figura 3 se plasman los niveles de protección mostrados por los anticuerpos IgG anti-LPS de *Pseudomonas*, administrados de manera pasiva por vía endovenosa a los ratones. La vía de administración de la IgG no mostró diferencias significativas, ambas confirieron un elevado nivel de protección frente al reto. Lo mismo ocurrió cuando se aplicó una o dos dosis de inmunoglobulina, los niveles de protección fueron elevados comparados con el control no protegido donde murieron más de la mitad de los animales.

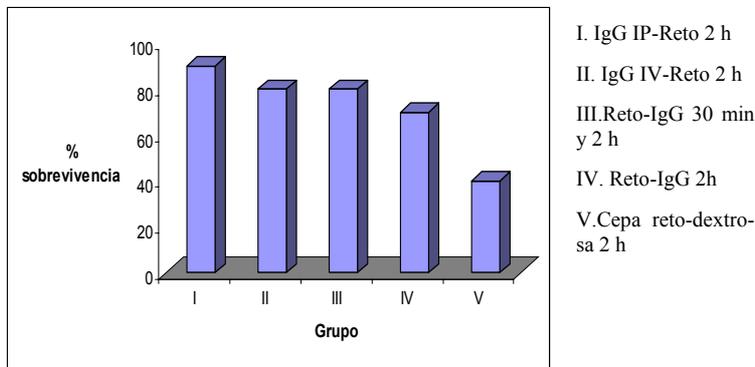


Figura 2. Sobrevivencia de los animales infectados antes o después de la aplicación de la IgG anti *Pseudomonas*.

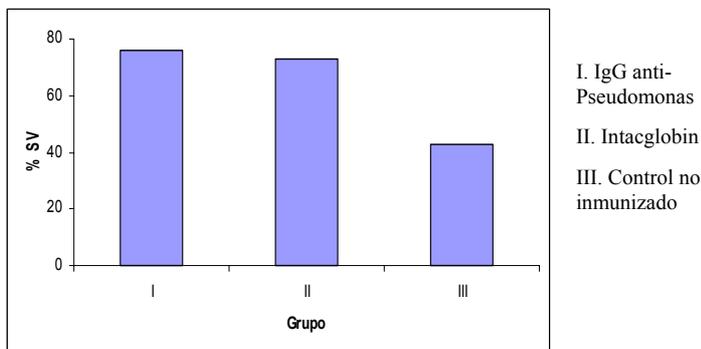


Figura 3. Sobrevivencia de los animales infectados luego de la aplicación endovenosa de la IgG.

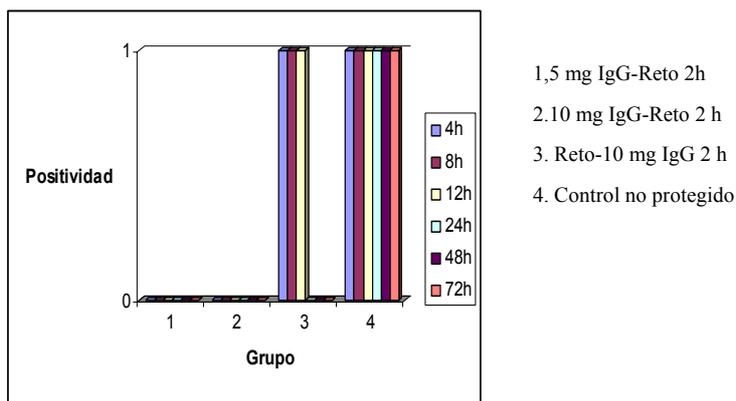


Figura 4. Dinámica de la infección en sangre de ratones protegidos e infectados con *P. aeruginosa*.

Las preparaciones de inmunoglobulinas intravenosa generalmente se realizan a partir de plasmas con alto título de anticuerpos, los cuales se obtienen por inmunización activa de individuos sanos con antígenos relevantes de la bacteria o por la

IgG anti *Pseudomonas* y el Intacglobin se aprecia que no existen diferencias en cuanto al grado de protección conferidos por ellos. El Intacglobin es un preparado de inmunoglobulinas inespecífico, con el que se han obtenido resultados positivos en las unidades de cuidados intensivos fundamentalmente en pacientes con sepsis grave por *P. aeruginosa* (17).

Como es de notar la dosis de reto en el segundo ensayo fue 16 veces superior a la aplicada en el primer ensayo. La suspensión celular de la cepa 5FQ para el reto de los animales se prepara a partir de un cultivo hasta la fase exponencial del crecimiento, se centrifuga, se elimina el medio de cultivo y la biomasa se restituye en una solución salina. A esta suspensión se le realizan diluciones seriadas para hacer conteo de viables en placa con incubación por 24 h. Al cabo de este tiempo es que se conoce la cantidad exacta de células que se inoculó en el experimento el día anterior. Generalmente, el conteo bajo las mismas condiciones da en un mismo orden logarítmico que es como ocurre el crecimiento bacteriano, pero el número de células totales no es exactamente igual, de ahí la variación en el número de células que se administran en el ensayo de reto, aunque esta diferencia no es en ningún modo significativa.

La aplicación tanto de 5 como de 10 mg de IgG por vía endovenosa logra impedir la colonización o diseminación de la bacteria por el torrente sanguíneo, como se observa en la Figura 4. A las 4 h, después de haber inoculado por vía intraperitoneal una cepa viva virulenta de *Pseudomonas*, no se observó bacteremia en un periodo de tres días. Sin embargo, cuando se produce la infección y después se aplica la inmunoglobulina de manera terapéutica, se encontraron bacterias en sangre desde las 4 hasta las 12 h, pero se demostró su total eliminación a las 24 h de ocurrida la infección, lo que muestra el valor de la gamma obtenida tanto en el tratamiento profiláctico como para erradicar la infección una vez instaurada. Para el reto se seleccionó una cepa clínica que mostró ser altamente virulenta con valores de DL 50% de $1,5 \times 10^2$ ufc. Esta cepa pertenece a un serotipo diferente al de la cepa de donde se obtuvo el LPS que sirvió para seleccionar los plasmas con altos títulos de anticuerpos. La cepa 5FQ pertenece al serotipo O9, pero al mismo serogrupo que la cepa O11, por lo que comparten determinantes antigénicos, lo que cual le confiere una alta reactividad cruzada.

recolección de sueros de personas que hayan sido infectadas (12). Las inmunoglobulinas comerciales contienen generalmente anticuerpos contra un grupo de patógenos comúnmente observados en una población donante dada, entre ellos

P. aeruginosa (8). Los resultados obtenidos con el Intacglobin permitió pensar en la posibilidad de obtener una concentración significativamente mayor de anticuerpos contra *P. aeruginosa*, lo que permitiría disminuir las cantidades de anticuerpos administrados.

La inmunoglobulina obtenida mostró una alta protección en modelos animales tanto cuando se aplica para prevenir la infección o una vez instaurada. Así mismo logra eliminar el estado de portador en individuos infectados, pero sería de gran utilidad contar en nuestro país con un preparado hiperinmune específico para el control de las infecciones nosocomiales, lo cual podría lograrse una vez obtenida una vacuna contra *P. aeruginosa* con lo cual aumentarían considerablemente los títulos específicos contra este patógeno en los individuos vacunados.

Por último, se debe tener en consideración que cada lote de Intacglobin está integrado por más de 1000 donaciones de sangre, lo cual es una muestra poblacional grande que da un título medio de la población en el momento en que se realiza el ensayo y la calidad del lote empleado, por lo que sería interesante comparar varios lotes de Intacglobin; aunque consideramos por nuestra experiencia que la mayoría mostrará resultados similares a los de este ensayo, que con una mejor selección de plasma dará resultados positivos, por lo que en estos momentos nos encontramos trabajando en coleccionar y titular un número superior de plasmas y usar como recubrimiento células enteras y proteínas de membrana externa que al ser estructuras expuestas en la bacteria y muy inmunogénicas nos permitirá obtener plasmas con títulos elevados de anticuerpos específicos.

Referencias

1. Jones AM, Webb AK. Recent advances in cross-infection in cystic fibrosis: *Burkholderia cepacia* complex, *Pseudomonas aeruginosa*, MRSA, and *Pandora spp.* J R Soc Med. 96 Suppl 2003; 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. Adewoye LO, Worobec EA. Identification and characterization of the *gluK* gene encoding a membrane associated glucose transport protein of *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 2002;53:323-330.
4. 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.

5. Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH, KOmberg A. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 97(17):9636-9641.
6. Smith EE, Buckely DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burnns JL, Kaul R, Olson MV. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103(22):8487-8492.
7. Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F, Boydd EF. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. J. Clin Microbiol 2004; 42(12):5783-5792.
8. Cádiz A., Hernández J., Joo L., Moya A. Introducción al método de fraccionamiento alcohólico empleado en Cuba para la producción de inmunoglobulinas de uso intravenoso. Vaccinonitor 1998; (7)5:2-7
9. Tanweer S, Priebe G, Pier G. A live attenuated *Pseudomonas aeruginosa* vaccine elicits outer membrane proteins specific active and passive protection against corneal infection. Infect Immun 2006;74:975-983.
10. Cripps A, Peek K, Dunkley M, Vento K, Marjasov J, McIntyre M, Sizer P. Safety and Immunogenicity of an oral inactivated whole cell *Pseudomonas aeruginosa* vaccine administered to healthy human subject. Infect Immun 2006;74:968-974.
11. Hertle R, Mrsny R, Fitzgerald D. Dual-Function vaccine for *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of chimeric Exotoxin A-Pilin Proteins. Infect Immun 2001; 69:6962-6969.
12. Moya A, Joo L., Rodríguez A., Hernández J., Hernández J., Almerares JF., Berrios D., Rodríguez Z., Cádiz A., Esnard SC. Preparado de inmunoglobulina contra LPS de *P. aeruginosa* serotipo O11. Vaccinonitor 2002;11(1).
13. Lowry, O.H. A protein measurement with the folin-phenol reagent. Biol. Chem. 1951;193:265-275.
14. Valmaseda T., Alba L., Ochoa R., Moya A., Pino Y. 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. Vaccinonitor 2004;13(3):18-25.
15. Esnard, SC. Empleo de sueros diagnósticos producidos en la República Popular China para la serotipificación de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Cubana Farm. 1997;31(2):107-112.
16. Olfert ED, Cross B.M. and McWilliam A.A Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 1. 2nd ed. Canadian Council on Animal Care; 1993.
17. Castañeda L., Castellano F., Castellano ME., Cádiz A. Utilización del Intacglobin en sepsis grave en una unidad de cuidados intensivos. Rev. Cienc. Med. 1994;3(12).

Evaluation in animals of the protective effect of an anti *Pseudomonas aeruginosa* immunoglobulin for therapeutic use

Abstract

Pseudomonas aeruginosa constitutes one of the opportunistic pathogenic agents with higher frequency of isolation in the different infectious processes; so it is recognized as a great health problem worldwide. As neither a high-effective medicine nor available vaccines exist against this bacterium, a therapy with commercial polyvalent immunoglobulins is used which combined with antibiotics help to eliminate the infection, although preparations available at the market do not contain concentrations of specific antibodies sufficiently high against a certain microorganism. In this work, evaluation of an anti *Pseudomonas aeruginosa* immunoglobulin for therapeutic use was carried out in an animal model by a challenge assay with a virulent strain. Dose and administration route as well as the prophylactic or therapeutic value of the antibodies were evaluated. This gammaglobulin turned out to be protective in animals showing a survival of about 75% compared to the non-protected control group. The carrier state can be also eliminated in infected individuals.

Keywords: Anti-*Pseudomonas* Immunoglobulin, protection, animal model.

Recibido: Diciembre de 2007 Aprobado: Abril de 2007