

# Consideraciones sobre el empleo de antisueros somáticos en la clasificación por serotipos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Aniel Moya, Adriana Callicó, Bárbara Cedré.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805.

La Lisa. Ciudad de La Habana. Cuba. AP 16017. CP 11600.

Correo electrónico: [amoya@finlay.edu.cu](mailto:amoya@finlay.edu.cu)

El lipopolisacárido (LPS) de bacterias gramnegativas se emplea en el desarrollo de candidatos vacunales, como antígeno expuesto en la preparación o formando parte de esta para aumentar su poder inmunogénico. Sin embargo, esta estructura química de la membrana externa puede ser también utilizada para clasificar bacterias. Según el LPS, presente en la membrana externa bacteriana, *Pseudomonas aeruginosa* se puede clasificar en 20 tipos somáticos diferentes, clasificación muy útil para estudios epidemiológicos. *P. aeruginosa* expone sus LPS en la membrana de forma estable, pero ocurren cambios en el fenotipo del LPS bacteriano durante la infección, sucesos que dificultan su clasificación. En estos momentos, los estudios que se desarrollan en el Instituto Finlay necesitan del empleo de tecnologías modernas de clasificación y del diagnóstico molecular para poder establecer patrones más precisos de expresión de los LPS por métodos que junto a los ya existentes permitan diferenciar cepas bacterianas de la misma especie en cualquier tipo de infección.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, serotipificación, lipopolisacárido, banda A y B del lipopolisacárido.

## Introducción

Las técnicas de tipificación son herramientas útiles para los estudios epidemiológicos. En la actualidad, para lograr una mejor caracterización de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se describen varios métodos, entre los que se encuentran: la clasificación por biotipos, serotipos, antibióticos, piocinotipos bacterianos, el análisis de los plásmidos, así como los estudios del ácido desoxirribonucleico (ADN) cromosómico por electroforesis de campo pulsado (PFGE), el análisis del polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) y por la amplificación de los segmentos repetitivos del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (REP-RCP) (1, 2).

En la serotipificación de cepas de *P. aeruginosa*, el lipopolisacárido (LPS) constituye el antígeno de membrana externa más utilizado (2, 3). Esta molécula es la base para los estudios epidemiológicos de clasificación de este microorganismo. Según la estructura de esos antígenos y su frecuencia de aparición en determinados ambientes, la serotipificación permite la selección de inmunógenos lipopolisacáridos (2).

En el tema de *P. aeruginosa* y el desarrollo de nuevas vacunas (4), los estudios del LPS se dirigen de manera primordial al entendimiento de los factores relevantes en las etapas iniciales de la colonización por este microorganismo (5), así como a los mecanismos de evasión a las defensas del hospedero y a los eventos químicos que ocurren durante su síntesis (2).

Esta bacteria produce dos tipos de LPS característicos de la especie según la naturaleza del antígeno O de esta estructura antigénica (bandas de LPS A y B) y el antígeno O de la banda A es químicamente similar en todas las cepas de *P. aeruginosa* (6,7).

En ocasiones, luego del aislamiento de *P. aeruginosa* de su hospedero (8), los estudios de serotipificación se dificultan por los cambios fenotípicos y la aparición de cepas poliaglutinables, sobre todo en los aislamientos obtenidos de infecciones pulmonares de pacientes con fibrosis quística (FQ) (9).

Los cambios descritos anteriormente ponen en duda la utilidad de la serotipificación como una herramienta útil para los estudios epidemiológicos, aunque la principal causa de esta problemática no radica en la sensibilidad de la técnica, sino en la expresión de diferentes fenotipos bacterianos durante la infección (9), situación que puede enmascarar el resultado buscado.

En este artículo se analizan algunas características que dificultan la clasificación de las cepas de *P. aeruginosa* con el empleo de antisueros somáticos específicos. Profundizar en esta problemática contribuirá al mejor conocimiento de este microorganismo, permitirá también hacer una mejor interpretación del sistema de clasificación por serotipos y se podrá demostrar la potencialidad del mismo para el desarrollo de nuevas vacunas.

## Sistema Internacional de Clasificación Antigénica (IATS)

Este sistema de la clasificación de cepas de *P. aeruginosa* se utiliza universalmente y basa la estructura química del LPS presente en la membrana externa de esta especie (2).

Debido al elevado número de denominaciones creadas para los antígenos O del LPS, desde comienzos del pasado siglo, surgen debates sobre la inclusión de los antígenos O en los esquemas de clasificación de *P. aeruginosa* y en un intento por establecer una serotipificación estandarizada, Lanyi y Bergan, recomendaron que los antígenos debían designarse con el esquema más amplio de reconocimiento de los anticuerpos propuestos por Habs (10).

Liu, et al., prefirieron el esquema de clasificación denominado como "The International Antigenic Typing Scheme" (IATS), sistema muy ventajoso y que designa los antígenos O por numeración continua e incluye 10 serogrupos similares al esquema original de Lanyi y Bergan, método que utiliza la denominación por letras (a, b, c). Aunque también existe el esquema de clasificación de *P. aeruginosa*, según Homma (11); en estos momentos el esquema de la IATS es el más utilizado para la clasificación de cepas, ocupando después del RFLP, el segundo lugar en especificidad, hecho que queda demostrado en el estudio multicéntrico realizado en 1994 y que incluye la comparación de varios métodos de tipificación (2).

Si bien la posibilidad de clasificar cepas de *P. aeruginosa* se describe desde 1957 (10), no es hasta 1983 que se publican los primeros resultados del sistema que agrupa las cepas en 17 serotipos diferentes, sistema que establece la existencia de al menos 17 antígenos somáticos termoestables, detectados por anticuerpos específicos (6). A partir de los resultados obtenidos se desarrollan nuevos métodos de clasificación serológica basados en el antígeno O de los LPS, utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales más específicos contra los 17 antígenos somáticos de *P. aeruginosa* (12).

Al emplear el sistema de la IATS, cerca del 10% de los aislamientos clínicos son no-tipables, hecho que condujo al desarrollo de un nuevo esquema que incluía 3 serotipos más de *P. aeruginosa* (6) y que pretendía cubrir todas las formas posibles de LPS presentes en este microorganismo.

El Laboratorio de Microbiología del Instituto Finlay emplea estos antígenos somáticos para la obtención de antisueros específicos útiles para la clasificación serológica de cepas aisladas de infecciones pulmonares de casos con FQ, así como en la identificación de cepas obtenidas de pacientes quemados (12, 14). El análisis de las cepas mucoides provenientes de pacientes con FQ mostró que los mayores porcentajes correspondían a cepas poliaglutinables. Esos aislamientos presentan una pobre o variable expresión del LPS bacteriano de la banda B, situación que precisa del perfeccionamiento de los métodos de serotipificación empleados.

Sin embargo, la disponibilidad de los antisueros específicos permite la serotipificación de las cepas de *P. aeruginosa* y reduce la necesidad de recurrir a cultivos de referencia internacionales para homologar así los resultados.

### Obtención de antisueros para el diagnóstico

El Instituto Finlay produce antisueros policlonales específicos en conejo para la serotipificación de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de infecciones hospitalarias (14). Para su obtención se inmunizan conejos con células completas inactivadas y posteriormente, se evalúan frente a las cepas patrones internacionales serotipo específicas, siguiendo la metodología de aglutinación descrita por Lanyi (15). Las reacciones cruzadas se eliminaron por absorción con cepas patrones heterólogas y se logra obtener un producto útil para la serotipificación de este microorganismo.

A partir de 1988, se incorpora en Cuba la serotipificación de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de casos clínicos y muestras ambientales (16). Al inicio se emplearon sueros diagnósticos elaborados en la República Checa, capaces de reconocer los 12 tipos somáticos del esquema de Habs (10). Sin embargo, debido a la aparición de cepas poliaglutinables o no tipables, este esquema no permitía la clasificación de todos los serotipos. El interés de hacer estudios más completos condujo a la incorporación de antisueros producidos en China, estos mostraron un mayor espectro diagnóstico para los nuevos aislamientos de las cepas de *P. aeruginosa* circulantes en Cuba (6).

Esnard publica en 1997 los resultados obtenidos en la tipificación de 355 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras clínicas y ambientales durante el período comprendido entre 1988 a 1989, remitidas por los centros provinciales de Higiene y Epidemiología de las diferentes regiones de Cuba (17). En su trabajo aplica la técnica de aglutinación en lámina y un panel con 20 sueros diagnosticadores, producidos en el Instituto de Productos Biológicos de Chengdu (Ministerio de Salud Pública, República Popular China) (6). Este panel de antisueros permitió reconocer los 17 antígenos somáticos de la IATS y los 3 nuevos antígenos somáticos reportados (6). Se pudo tipificar el 97% de las cepas de *P. aeruginosa*, se evidenció la factibilidad de estos antisueros y, por primera vez en Cuba se demostró la prevalencia del serotipo O11, así como la circulación de nuevos tipos somáticos O18 (1%), O19 (5%) y O20 (3%) (17).

El esquema de los 20 antisueros contra los antígenos somáticos, además de su empleo en Cuba (Laboratorio de *Pseudomonas*, Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología), desde 1987 se utiliza en los laboratorios regionales y hospitales de la República Popular China. Posteriormente, laboratorios seleccionados de países como: Estados Unidos, Gran Bretaña, Australia, Canadá, y Pakistán, lo incluyen como complemento de su validación. A partir de ese momento, el esquema de los 20 antisueros somáticos posibilita una mejor clasificación de las cepas de *Pseudomonas* y mantiene aún su vigencia a pesar de

disponer actualmente de métodos moleculares de clasificación más potentes y novedosos (18, 19).

### **Empleo de la serotipificación en nuestras investigaciones**

El LPS de *P. aeruginosa* constituye un antígeno de interés para el desarrollo de inmunógenos contra este microorganismo y aunque, esta molécula no ofrece una protección heteróloga permite seleccionar los serotipos más frecuentes y generar vacunas con efectos inhibitorios sobre la colonización bacteriana. Tal es el caso de una vacuna que combina 8 LPS de distintos serotipos con la exotoxina A, estudios que se encuentran en un ensayo clínico Fase III y muestran resultados interesantes respecto al tipo de inmunidad que generan (20).

En Cuba, además de los trabajos de búsqueda de antígenos vacunales, la serotipificación se emplea para la clasificación de cepas aisladas de casos con FQ y en el diagnóstico de infección pulmonar por *P. aeruginosa* (14). Este aporte, junto con los estudios de susceptibilidad antimicrobiana contribuyen al estudio epidemiológico de las infecciones en casos con FQ, entidad clínica hereditaria autosómica recesiva de elevada mortalidad, que se presenta en edades tempranas de la vida y provoca infecciones pulmonares bacterianas recurrentes, entre las que *P. aeruginosa* es uno de los agentes etiológicos más frecuente (21).

En el Instituto Finlay, el análisis de muestras de suero humano normal contra LPS de 10 serotipos distintos de *P. aeruginosa*, mostró al serotipo O11 como uno de los más frecuentes (22, 23), resultado que coincide con el de Esnard. Disponer de toda esta información permite trabajar en la obtención de antígenos que incluyan esta estructura y en la generación de vacunas de subunidades. Debido a la accesibilidad de los LPS y las proteínas de membrana externa en la superficie bacteriana, estas estructuras constituyen moléculas blanco para los estudios de vacunas que realiza esta Institución. Además, para crear nuevos candidatos vacunales contra *P. aeruginosa* se investiga la búsqueda de antígenos más conservados e inmunogénicos (24).

En otro estudio de clasificación de cepas de *P. aeruginosa*, aisladas de pacientes quemados, no se observó la presencia del serotipo O11, identificándose como más frecuentes a los serotipos O4 y O5, aunque los tipos O1, O6 y O13 mostraron porcentajes bajos. Se consideró que la acción de los anticuerpos específicos contra el LPS tipo O11, observados en la población, podría haber sido la causa del no aislamiento de ese serotipo en los pacientes quemados infectados (12). Los anticuerpos específicos contra el LPS bacteriano desempeñan un importante papel en las infecciones por *P. aeruginosa* (25).

Al utilizar sueros serotipo específicos para la clasificación de cepas aisladas de casos con FQ e infectados con *P. aeruginosa*, así como en aislamientos de infecciones

nosocomiales y pacientes quemados, los serotipos prevalentes fueron: O1, O4, O6, O9 y O11 (14). El trabajo clasificó 14 aislamientos de pacientes con FQ y entre ellos predominó el serotipo O9 (85%). Se reconocieron también porcentajes bajos de otros serotipos y hubo cepas poliaglutinables en los casos de FQ; algo común en las infecciones pulmonares debido a la presencia de cepas mucoides formadoras de biopelículas (26). Los microorganismos que aglutinaron con más de un suero se consideraron "poliaglutinables" y por tanto "no tipables", terminología también aplicada a las cepas que no aglutinaron frente a ningún suero.

### **Efecto del fenotipo bacteriano en la serotipificación**

Cuando las cepas no pueden clasificarse por el esquema de la IATS, es difícil obtener un resultado certero, situación que se presenta con frecuencia en las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con infección pulmonar crónica. En estos microorganismos se observa una pérdida del antígeno O del LPS y una elevada producción de alginato (27).

*P. aeruginosa* puede sufrir cambios de su fenotipo, según el ambiente en el cual desarrolle su infección y si este cambio involucra los LPS que componen su membrana externa, es imposible dar una correcta clasificación por serotipificación de la cepa aislada y hay que recurrir a otras técnicas como el análisis del polimorfismo de fragmentos de ADN (RFLP), herramienta muy empleada hoy día en la epidemiología molecular (18) y que basa su caracterización en el análisis comparativo del genoma de las bacterias analizadas con patrones de migración de genes determinados. Igual ocurre cuando se emplean inmunoglobulinas para controlar infecciones por *P. aeruginosa* (28), donde la gran limitante del empleo de inmunoglobulinas serotipo específico es la variabilidad de la molécula de LPS, que puede incluso determinar el grado de reconocimiento de los anticuerpos antiLPS específicos cuando esta bacteria cambia de fenotipo liso a rugoso y no expone de forma adecuada los antígenos O-sacarídicos del LPS hacia los que el anticuerpo empleado tiene especificidad.

### **Fenotipo Liso y rugoso**

El término liso o rugoso se emplea con frecuencia para describir al fenotipo bacteriano. La unión del antígeno O con el núcleo forma al fenotipo liso, mientras que la pérdida de la región O sacarídica del LPS, describe al rugoso (7). La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* aislada de pacientes con FQ tienen un fenotipo rugoso o semirrugoso, mientras que casi todas las obtenidas de casos quemados infectados son del fenotipo normal salvaje (liso).

El LPS es una molécula compleja y está formada por tres regiones: la O polisacarídica (antígeno O), región central oligosacarídica (Core) y el lípido A, responsable de la actividad endotóxica de los LPS (29).

El lípido A “como componente hidrofóbico”, asegura el anclaje del LPS en la estructura de la membrana externa, mientras que el núcleo une al lípido A con la región O-polisacáridica (porción más expuesta del LPS) y en contacto con el medio extracelular (7). El Lípido A tiene el mayor efecto biológico, induciendo la aparición de inmunomoduladores en el hospedero y cuando está en exceso puede, por su efecto activador, conducir al shock séptico y la muerte (7).

El LPS de *P. aeruginosa* es la arquitectura polisacáridica más estudiada. Según las estructuras de sus antígenos O, desde 1960 se realizan intentos para correlacionar la inmunoespecificidad de este microorganismo (7). La estructura más conservada del LPS (el lípido A), muestra similitud con cepas de la familia Enterobacteriaceae.

La región del core oligosacáridico está compuesta por: D-glucosa, L-rhamnosa, 2-amino-2-deoxy-D-galactosa, L-glycero-D-manno-heptosa (Hep), ácido 3-deoxi-D-mannosilico (Kdo), L-alanina y fosfato (30).

La parte más variable del LPS es la región O polisacáridica (antígeno O), estructura que determina el serogrupo o subgrupo y cuya composición se conoce y analiza en *Pseudomonas* desde la década del 70 (7). El estudio de los monosacáridos de este antígeno reveló la presencia de xylosa, glucosa, rhamnosa, glucosamina, 2,4-diamino-2, 4, 6-trideoxy-D-glucosa y ácido L-galactosaminurónico y como carácter diferenciador se encuentra la baja frecuencia de monosacáridos neutros que la componen (D-glucosa, L-rhamnosa, D-xylosa, D-ribosa), estructuras que la hacen diferente al resto de las bacterias entéricas (7).

Múltiples trabajos describen el poder inmunogénico del LPS al interactuar con el sistema inmune del hospedero (30). Cuando el LPS bacteriano entra en contacto con el tejido del hospedero, usualmente se une por la proteína fijadora de LPS, que se transfiere al receptor CD14 en los macrófagos, induciendo así la secreción de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa, la interleuquina-1(IL-1), Il-6, Il-8, y la Il-10 (citocinas conocidas como marcadores de inflamación). Estos mediadores potencian la reacción inmune del hospedero hacia la infección bacteriana (7). La parte O sacarídica del LPS de *P. aeruginosa* presenta gran variabilidad y al no estar presente la molécula completa del LPS, este microorganismo puede escapar de algunos de estos mediadores y continuar su infección.

En las infecciones pulmonares crónicas de pacientes con FQ se observa la pérdida completa o parcial del antígeno O (fenotipo rugoso). Esos cambios en las propiedades de la superficie bacteriana ocasionan problemas para los estudios epidemiológicos y la tipificación de las cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de casos con FQ. Se conoce que las modificaciones en el LPS se deben a la presencia o ausencia de uno de los tipos de región O sacarídica del LPS (A o B), que *P. aeruginosa* expresa en su membrana externa (7);

donde la banda A es menos inmunogénica. Además, la pérdida de la banda B del antígeno O le confiere resistencia a algunos antimicrobianos (aminoglucósidos) (29), permitiéndoles también evadir las defensas del hospedero.

### **Banda A y B de la región antigénica O del LPS**

*P. aeruginosa* produce dos formas de antígeno O, conocidas también como banda A (homopolímero) y banda B (heteropolímero); ambas estructuras son antigénica y químicamente diferentes. La banda A de *P. aeruginosa* está compuesta por residuos de D-rhamnosa (D-Rha), dispuestos como unidades repetitivas de trisacáridos. Esta banda es un componente común en todos los serotipos de *P. aeruginosa* notificados (7) y al ser evaluadas con sueros serotificadores, se les atribuye la poliaglutinación presente en las cepas heterólogas (30). La estructura del polisacárido D-rhamniano está compuesta por alrededor de 70 residuos D-Rha y es mucho más corta que la banda B del antígeno O.

Cada unidad repetitiva de la banda B, puede ser di o pentasacáridica y su extensión está determinada por el estadio de crecimiento y por la temperatura (31). La banda A está presente en todas las cepas de *P. aeruginosa* de manera estable; mientras que, en ocasiones, la banda B es diferente.

Estudios realizados en animales indican que, mientras los anticuerpos específicos a la banda B del LPS protegen a ratones neutropénicos contra el reto usando cepas con LPS fenotipo liso, los anticuerpos específicos contra la banda A no tienen el mismo efecto (32).

Durante su clasificación se han identificado cepas de *P. aeruginosa* no aglutinables frente a los antisueros disponibles para la serotipificación. En estos momentos se conoce mejor esta actividad y la presencia de cepas no aglutinables pudiera atribuirse a la ausencia del LPS tipo B, estructura responsable de la seroespecificidad de este microorganismo. Quiere decir que la serotipificación de *P. aeruginosa* se basa en el reconocimiento de la banda B del LPS y es diferente en cada uno de los serotipos notificados (7). La banda B varía de un serotipo a otro debido a la composición de los azúcares que conforman su estructura, de ahí la diversidad de reconocimiento. Al no estar presente la banda B, el método de serotipificación no tiene ningún valor diagnóstico, pues no permite la diferenciación entre los mismos.

Esta característica junto a la formación de biopelículas constituye la causa principal del fracaso de la serotipificación como herramienta diagnóstica. Ambas podrían constituir las formas de evadir el papel de algunos efectores de la respuesta inmune del hospedero y al no tenerse en cuenta la clasificación por los métodos tradicionales, se pueden obtener resultados contradictorios.

La transformación de *Pseudomonas* en cepas mucoides, por la síntesis de alginato, la convierten en un microorganismo no tipable por los métodos de tipificación tradicionales. Esta

realidad representa una limitación para los estudios epidemiológicos y conduce al desarrollo de métodos moleculares, técnicas mucho más completas por incluir características contenidas en el genoma de este microorganismo.

Las investigaciones actuales se dirigen a dilucidar los mecanismos moleculares de la expresión del LPS tipo B durante las infecciones, evaluando qué genes están vinculados con la expresión o inhibición de su producción. Se sabe que los cambios en el fenotipo del LPS afectan las propiedades de adhesión y su influencia en la formación de la biopelícula (27).

*P. aeruginosa* puede expresar cambios en sus factores de virulencia. Los cambios fenotípicos se observan con frecuencia en las infecciones pulmonares de los casos con FQ. La transformación más dramática es la conversión de la forma no mucóide al fenotipo mucóide, alteración que se presenta cuando *P. aeruginosa* se establece en los pulmones de los pacientes con FQ y se correlaciona con una pobre función pulmonar. Además de la producción de alginato, dentro de los pulmones se inicia un crecimiento de *P. aeruginosa* en forma de microcolonias, formación que recibe el nombre de biopelícula. En esta estructura, formada por células embebidas dentro de la matriz del alginato (33), las células dejan de producir de forma completa o parcial la banda B del antígeno O del LPS; aunque mantienen la producción de la banda A. Tales cambios son problemáticos para estudios epidemiológicos de serotipificación, específicamente en los pacientes con FQ.

#### **Síntesis del LPS en *P. aeruginosa***

La conservación de los genes para la síntesis de la banda A se ha determinado para todos los serotipos de *P. aeruginosa* que define la IATS (7,30). La banda A y B, se sintetizan por mecanismos independientes. La heterogeneidad de la región O del LPS está influenciada por el ambiente. Las elevadas temperaturas de crecimiento disminuyen el tamaño de las cadenas O sacarídicas (31), apareciendo un aumento en la producción del fenotipo rugoso o semirrugoso. Igual ocurre con altos niveles de NaCl, MgCl<sub>2</sub>, glicerol y sacarosa, los bajos valores de pH y de fosfato. Esta influencia es modesta cuando se miden los cambios que ellas provocan sobre la banda A del LPS, cuya expresión en la membrana externa bacteriana es más estable (31).

*Pseudomonas aeruginosa* produce al mismo tiempo dos bandas de LPS, aunque la existencia de la banda A en otras bacterias gramnegativas no ha sido muy estudiada, se conoce que el azúcar D-rhamnano está contenido en los LPS bacterianos de *P. syringae* pv. Morsprunorum C28, *P. syringae* pv. cerasi 435, *B. cepacia*, y *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* (7). Los genes involucrados en la síntesis del LPS (banda A y B) para *Pseudomonas aeruginosa* son bien conocidos y se detallan en un trabajo

publicado por el grupo de Lam en 1999 (7). Este grupo estudia como ocurre la síntesis del LPS de *P. aeruginosa* desde el punto de vista molecular y señala el efecto de los fagos sobre la síntesis del LPS de este patógeno. Cada vez más se conoce la relación que existe entre los fagos y las bacterias; y sobre su influencia en la evolución. Muchos factores de virulencia son codificados por profagos o han tenido un origen de fago (34). Esto hace que en bacterias como *P. aeruginosa*, algunos genes como el Wzy (34), por su origen evolutivo, son de interés para el análisis de la virulencia bacteriana. La cuestión es conocer qué papel desempeñan los genes que participan en la síntesis del LPS; los que pueden, junto con otros factores fisiológicos, dar lugar a futuras investigaciones del tema. En trabajos recientes se señala la posibilidad que los genes de fagos ejerzan su influencia en los cambios de la producción del LPS, banda B, hacia otro serotipo, provocando en el hospedero un cambio en cuanto a la expresión (35) y dificultan las técnicas de serotipificación bacteriana. Se describe que el fago D3 contiene genes capaces de convertir el serotipo bacteriano 05 de *P. aeruginosa* en serotipo O16 (34, 35). Además de hacer difícil la serotipificación bacteriana, podría representar una plataforma ventajosa para generar cepas que expresen diferentes serotipos al ser manipuladas genéticamente para el desarrollo de vacunas multivalentes contra este patógeno (34).

La secuencia completa de los cluster de todos los genes para los LPS pertenecientes a los serotipos definidos por la IATS se ha publicado y es posible, teniendo la secuencia de primers (cebadores), emplear el PCR para amplificar los genes de los LPS de cualquier serotipo. Contar con esta herramienta posibilitaría emplear métodos basados en PCR para definir el serotipo bacteriano, independientemente de si el fenotipo es liso o rugoso, si la cepa es mucóide o no; solo aislando el DNA cromosómico será posible determinarlo (36).

Los estudios epidemiológicos y de resistencia a los antimicrobianos realizados en los pacientes de riesgo necesitan con urgencia del empleo de tecnologías modernas de clasificación y del diagnóstico de los agentes etiológicos de las enfermedades infecciosas para poder establecer así los patrones epidemiológicos más precisos. En estos momentos los métodos convencionales basados en la serotipificación no son muy exitosos en los estudios epidemiológicos de cepas multirresistentes. Los cambios ocurridos en el espectro de los agentes infecciosos, las epidemias intrahospitalarias y los pacientes inmunocomprometidos han forzado el empleo de nuevas estrategias moleculares como el RFLP en los estudios epidemiológicos que complementen o sustituyan los métodos tradicionales utilizados para *P. aeruginosa* (37).

## Referencias

1. Martínez P, Espinal P, Mattar S. Epidemiología Molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a beta-lactámicos en el Hospital de San Jerónimo de Montería. *Infection* 2007;11(1):6-15.
2. Speert DP, Campbell M, Puterman ML, Govan J, Doherty C, Hoiby N et al. A multicenter comparison of methods for typing strains of *Pseudomonas aeruginosa* predominantly from patients with cystic fibrosis. *The Journal of Infectious Diseases* 1994; 169:134-142.
3. Daniels C, Griffiths C, Cowles B, Lam JS. *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen chain length is determined before ligation to lipid A core. *Environmental Microbiology* 2002; 4(12):883-97.
4. Holder IA. *Pseudomonas* immunotherapy: a historical overview. *Vaccine* 2004; 22: 831-839.
5. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Sliker MG, Terheggen-Lagro SWJ, 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(8):689-93.
6. Liu PV, Wang SP. Three new major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28(5):922-55.
7. Rocchetta HL, Burrows LL, and Lam JS. Genetics of O-Antigen Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1999; 63(3):523-553.
8. Salazar D, González A, Palma M, Sara et al. Susceptibilidad antimicrobiana y serotipaje de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes VIH/SIDA. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 2002; 54(2):142-146.
9. Nguyen D, Singh PK. Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proceeding of the National Academy of Science* 2006; 103(22):8487-92.
10. Habs I., Untersuchungen ueber die O-Antigene von *Pseudomonas aeruginosa*. *Z. Hyg. Infekt.-Kr.* 1957;144:218-228.
11. Strickland MA, Gaston MA, Pitt TL. Comparison of Polyclonal Rabbit Antisera with Monoclonal Antibodies for Serological Typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 1988; 26(4): 768-769.
12. Lam JS, MacDonald LA, Lam MYC, Duchesne LGM and Southam GG. Production and characterization of monoclonal antibodies against serotype strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 1987; 55:1051-1057.
13. Moya A, Berrios D, Almenares JF, Ibáñez LN, Hernández J, Joó L, Rodríguez A et al. Serotipificación y susceptibilidad antibacteriana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes quemados infectados. *Vaccinmonitor* 2003; 12(2):13-18.
14. Callicó A, Cedré B, Sifontes S, Torres V, Pino Y, Callís AH, Esnard SC. Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *VacciMonitor* 2004; 13(3):1-9.
15. Lanyi B, Bergan T. Serological characterization of *Pseudomonas aeruginosa*. En: Bergan T, Norris JR, eds. *Methods in microbiology*. London: Academic Press; 1978:94-168.
16. Esnard SC. Caracterización de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en infecciones nosocomiales. *Bol Epidemiol INHEM*. 1989; 12:7-12.
17. Esnard SC. Empleo de sueros diagnósticos producidos en la República Popular China para la serotipificación de *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Cubana de Farmacia* 1997; 31(2):107-112
18. Hortal M y Camou T. Epidemiología molecular de *Streptococcus pneumoniae*. *Revista Chilena de infectología* 2001; 18(1):22-25.
19. Pirnay JP, Vos DD, Duinslaeger L, Reper P, Vandenvelde C, Cornelis P and Vanderkelen A. Quantitation of *Pseudomonas aeruginosa* wound biopsy samples: from bacterial culture to rapid 'real-time' polymerase chain reaction. *Critical Care* 2000; 4:255-261.
20. Zuercher A W, Imboden M A, Jampen S, Bosse D, Ulrich M, Chtioui H, Lauterburg B H and Lang A B. Cellular immunity in healthy volunteers treated with an octavalent conjugate *Pseudomonas aeruginosa* vaccine. *Clinical Experimental Immunology* 2006; 143(1):132-138.
21. Yu H, Nasr S Z, and Deretic V. Innate Lung Defenses and Compromised *Pseudomonas aeruginosa* Clearance in the Malnourished Mouse Model of Respiratory Infections in Cystic Fibrosis. *Infection and Immunity* 2000; 68(4):2142-2147.
22. Hernández J, Alfonso J, Almenares J F, Moya A, Pérez JL., Esnard SC, Cádiz A, Sierra G. Reconocimiento de antígenos lipopolisacáridicos de *Pseudomonas aeruginosa* por sueros humanos. *VacciMonitor* 2004; 13(1):14-20.
23. Moya A, Joó L, Rodríguez A, Hernández J, Hernández J, Almenares JF, Berrios D, et al. Immunoglobulin preparation against LPS of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11. *VacciMonitor* 2002; 11(1):11-17.
24. Moya A, Callicó A, Cedré B, Camacho F, Simón A, Almenares J, et al. Evaluación de la respuesta de anticuerpos hacia antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*. *VacciMonitor* 2007; 16(1): 5-11.
25. Brauner A, Cryz SJ, Granstrom M, Hanson HS, Lofstrand L, et al. Immunoglobulin G antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and exotoxin A in patients with Cystic Fibrosis or Bacteremia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 1993; 430-436.
26. Kirisits MJ, Prost L, Starkey M, and Parsek MR. Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71(8):4809-4821.
27. Lee B, Haagsen JAJ, Ciofu O, Andersen JB, Høiby N, and Molin S. Heterogeneity of Biofilms Formed by Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic

- Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43(10): 5247–5255.
28. Cross AS, Opal SM, Bhattacharjee AK, Donta ST, Peduzzi PN, Fürer E, et al. Immunotherapy of sepsis: flawed concept or faulty implementation? *Vaccine* 1999; 17:13-21.
  29. Bystrova OV, Lindner B, Moll H, Kocharova N A, Knirel Y A, Zahringer U, and Pier GB. Full Structure of the Lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* Immunitytype 5. *Biochemistry (Mosc)*. 2004; 69(2): 170–175.
  30. Stanislavsky ES, Lam JS. *Pseudomonas aeruginosa* antigens as potential vaccines. *FEMS Microbiology Reviews* 1997; 21(3): 243-77.
  31. Makin SA, and Beveridge TJ. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ceases to express serotype-specific lipopolysaccharide at 45 °C. *Journal of Bacteriology* 1996; 178:3350–3352.
  32. Hatano K, Goldberg JB, and Pier GB. Biologic activities of antibodies to the neutral-polysaccharide component of the *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide are blocked by O side chains and mucoid exopolysaccharide (alginate). *Infection and Immunity* 1995; 63:21–26.
  33. Mikkelsen H, Duck Z, Lilley KS, and Welch M. Interrelationships between Colonies, Biofilms, and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 2007; 189(6): 2411–2416.
  34. Kaluzny K Abeyrathne PD, and Lam JS. Coexistence of Two Distinct Versions of O-Antigen Polymerase, Wzy-Alpha and Wzy-Beta, in *Pseudomonas aeruginosa* Serogroup O2 and Their Contributions to Cell Surface Diversity. *Journal of Bacteriology* 2007; 189(11): 4141–4152.
  35. Newton GJ, Daniels C, Burrows LL, Kropinski AM, Clarke AJ and Lam JS. Three-component-mediated serotype conversion in *Pseudomonas aeruginosa* by bacteriophage D3. *Molecular Microbiology* 2001; 39(5): 1237-1247.
  36. Raymond CK, Sims EH, Kas A, Spencer DH, Kuttyavin TV, Ivey RG, et al. Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2002; 184(13):3614-22.
  37. Giske CG, Libisch B, Colinson C, Scoulica E, Pagani L, Fuzi M et al. Establishing Clonal Relationships by Multilocus Sequence Typing between VIM-1-like Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* from Four European Countries. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44(12): 4309-4315.

## Considerations about somatic antisera uses in classifying *Pseudomonas aeruginosa* strains by serotypes

### Abstract

Lipopolysaccharides (LPS) of gramnegative bacteria are used for developing vaccine candidates as a complete exposed antigen in the preparation or as essential part of vaccines to improve its immunogenic power. Nevertheless, this outer membrane structure can also be used in bacterial classification according to the LPS chemical structure in outer membrane structure. Twenty different LPS have been reported as somatic antigens useful in *P. aeruginosa* strains classification in epidemiological studies. Current studies of Finlay Institute need the introduction of up-dated classification technologies and molecular diagnosis tools to establish more accurate epidemiological standards to improve the reports about the presence of new strains at the infection site.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, Serotyping assay, Lipopolysaccharides, LPS A and B bands.

*Recibido: Marzo de 2007*

*Aprobado: Julio de 2007*