



**"IDENTIFICACION DE ANTIGENOS PROTEICOS
INMUNODOMINANTES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA
RECONOCIDOS POR SUEROS
DE PACIENTES INFECTADOS"**

TESIS

**QUE EN OPCION AL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA**

PRESENTA:

MARIA DEL ROCIO GALVAN GARCIA

MONTERREY, N.L. SEPTIEMBRE DE 1992

TM

Z6658

FM

1992

G3



1020071205

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

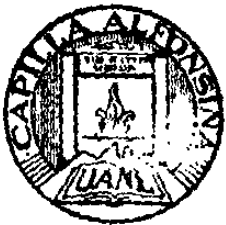
TESIS QUE EN OPCION AL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA MEDICA

PRESENTA

MARIA DEL ROCIO GALVAN GARCIA

MONTERREY, N.L. SEPTIEMBRE 1992.

TH
26658
F01
1992
G5



FONDO TESIS

24057

"IDENTIFICACION DE ANTIGENOS PROTEICOS INMUNODOMINANTES
DE Pseudomonas aeruginosa RECONOCIDOS POR
SUEROS DE PACIENTES INFECTADOS"

Aceptada por la Subdirección de Investigación y Estudios de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León el _____.

COMISION DE TESIS

N O M B R E

F I R M A

Presidente: Dra. María del Socorro Flores de C.

Secretario: M. en C. Irma A. Salinas González

Primer vocal: Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla

Segundo vocal: Dr. Mario César Salinas Carmona

Tercer vocal: M. en C. María Alicia Suárez Semour

The block contains four handwritten signatures, each written over a horizontal line. The signatures are: 1. A cursive signature for the President, Dra. María del Socorro Flores de C. 2. A cursive signature for the Secretary, M. en C. Irma A. Salinas González. 3. A cursive signature for the First Vocal, Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla. 4. A cursive signature for the Third Vocal, M. en C. María Alicia Suárez Semour.

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme alcanzar esta meta.

A mi padre, Sr. Alfonso Galván, quien no pudo disfrutar este momento.

A mi madre, Sra. Carmen García con todo cariño y respeto.

A mis hermanas, Tere, Dora y a mi sobrino Alfonso por ser parte importante de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mario César Salinas Carmona por su valiosa asesoría en la realización de este trabajo y por la ayuda incondicional que siempre me brindó.

Al Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla por el apoyo que me brindó durante mis estudios y para la realización de esta tesis.

A la M. en C. María Alicia Suárez Semour con gran cariño por su apoyo, su valiosa amistad y sus palabras de aliento.

A la Dra. María del Socorro Flores de Castañeda por brindarme su amistad.

A los profesores y al personal de los laboratorios de Microbiología, Inmunología y Bioquímica por su ayuda incondicional.

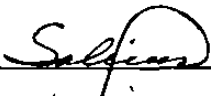
A las Lic. en Enf. Maricela García Vega y Macrina Cabello del Comité de Antibióticos y Control de Infecciones Intrahospitalarias del Hospital Universitario "Dr. José E. González" por facilitarme gentilmente los sueros de los pacientes.

Al Dr. Oliverio Welsh por su apoyo para la impresión de este trabajo.

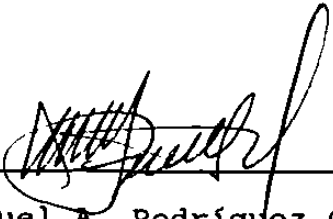
A mis amigos que siempre me apoyaron y demostraron su cariño.

Esta tesis se realizó en los Departamentos de Inmunología y de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona y el Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla y la co-asesoría de la M. en C. María Alicia Suárez Semour.

ASESORES DE TESIS



Dr. Mario C. Salinas Carmona.



Dr. Manuel A. Rodríguez Q.

CO-ASESOR:



M. en C. María Alicia Suárez Semour.

I N D I C E

	Página.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. OBJETIVOS	11
IV. MATERIALES Y METODOS	
1. Microorganismos	12
2. Muestras de sueros	12
3. Cultivo de las cepas de referencia	12
4. Obtención del sobrenadante de cultivo ...	15
5. Obtención del extracto celular	17
6. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida.	19
7. Inmunoelectrotransferencia	25
V. RESULTADOS	31
1. Crecimiento de las cepas de referen- cia de <u>P. aeruginosa</u>	31
2. Análisis de las electroforesis de los extractos celulares y sobrenadantes con SDS-PAGE.	32
3. Pesos moleculares de las proteínas identificadas.	33
4. Análisis por inmunoelectrotransferencia (Western blot) de los extractos celula- res y sobrenadantes.	34
VI. DISCUSION	36
VII. CONCLUSIONES	43
VIII. BIBLIOGRAFIA	44
IX. ANEXO DE TABLAS Y FIGURAS	48

RESUMEN

Para poder identificar proteínas inmunodominantes de Pseudomonas aeruginosa que son reconocidas por sueros de pacientes infectados se procedió a realizar este trabajo en dos etapas. La primera, cultivando dos cepas de referencia de P. aeruginosa, la PA-103 y la 7700 para obtener los antígenos exportables y los no exportables al medio de cultivo. La segunda etapa consistió en el análisis de los extractos celulares y del sobrenadante del cultivo mediante electroforesis en gel de poli-acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y finalmente la inmunoelectrotransferencia, para investigar la presencia de proteínas inmunodominantes que son reconocidas por los sueros de los pacientes infectados, en este caso se trabajó con pacientes con diagnóstico de neumonía por P. aeruginosa.

Los resultados obtenidos demostraron la existencia de 4 proteínas inmunodominantes presentes en el extracto celular de la cepa PA-103. Los pesos moleculares de estas proteínas fueron de 170, 152, 60 y 24 kDa. Asimismo, cuando se investigó el sobrenadante del cultivo se encontró que las proteínas de 138, 132, 94, 78 y 60 kDa fueron inmunodominantes en los pacientes infectados y no fueron reconocidas por los sueros de las personas sanas.

Cuando se investigó la existencia de proteínas inmunodominantes en el extracto celular de la cepa 7700, se observó que los sueros de los pacientes reconocieron las proteínas de: 155, 138,

59, 57 y 20.7 kDa. En el sobrenadante del cultivo de esta cepa sólo se encontró una proteína inmunodominante cuyo peso molecular fue de 20.7 kDa.

INTRODUCCION

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram negativo, aerobio estricto y móvil por flagelos polares. Esta bacteria es capaz de vivir en gran número de ambientes de modo que es posible encontrarla en el suelo, lugares húmedos, insectos, sobre las plantas e inclusive en el tracto alimentario de los animales y del hombre (1,2).

Esta bacteria fue aislada por primera vez por Gessard en 1882 y reconocida como patógeno por Charrin en 1896 (6), desde entonces numerosos estudios acerca de esta bacteria se han llevado a cabo.

P. aeruginosa es un patógeno oportunista que es capaz de producir enfermedad en humanos, animales, insectos y aún en plantas (2) y puede hallársele contaminando diversos materiales como los sueros, agua destilada, sondas, toallas, respiradores, incubadoras, soluciones oftálmicas, cremas para las manos, jabones, nebulizadores, otros instrumentos y materiales intrahospitalarios, de los cuales puede pasar fácilmente a un hospedero susceptible (1,2).

Alrededor de un 4 al 12% de la población normal excreta P. aeruginosa en las heces (2). Este microorganismo, reconocido como causante de infecciones nosocomiales, ataca principalmente a pacientes debilitados, quemados e inmunocomprometidos, con neoplasias de diversa naturaleza, diabéticos, con fibrosis quística, traqueostomía y úlceras corneales. De igual manera infecta a pa-

cientes con cateterización vascular, vesical y respiratoria permanentes. P. aeruginosa es uno de los microorganismos más frecuentemente aislados en pacientes que han permanecido hospitalizados por más de una semana (1,2,6,19). Estas personas pueden adquirir la bacteria a partir de su propia flora (infección endógena), o bien de fuentes exógenas, de las cuales la principal es de persona a persona, generalmente a partir de heridas o lesiones exudativas. Estas fuentes humanas contaminan sábanas, vestidos y equipos intrahospitalarios en general, a partir de ellos las bacterias pueden ser transferidas a otros pacientes por medio de las manos del personal hospitalario y de los visitantes.

La presencia de P. aeruginosa ha sido demostrada en vegetales frescos, ensaladas y otros alimentos, los cuales pueden ser responsables de la colonización del tracto gastrointestinal de muchos pacientes hospitalizados, lo cual trae mayor riesgo de infección (4).

Se estima que P. aeruginosa causa entre un 10 y 20% de las infecciones intrahospitalarias y es capaz de causar epidemias entre los pacientes hospitalizados susceptibles (6). Entre más tiempo permanezca hospitalizado un paciente, mayor será la probabilidad de adquirir la infección, especialmente si se tienen defectos en los mecanismos de defensa. Los antibióticos han sido útiles solo parcialmente en controlar la morbilidad y mortalidad asociada con infecciones por P. aeruginosa (6).

La incidencia de infecciones graves por este microorganismo oportunista en pacientes hospitalizados se ha incrementado en las

Últimas décadas. Esto se atribuye principalmente a dos razones: a) el uso indiscriminado de antibióticos, lo que facilita el desarrollo de cepas resistentes de P. aeruginosa y b) la capacidad que se tiene hoy en día de prolongar la vida, como en el caso de pacientes transplantados, debido a la terapia inmunosupresora administrada, haciéndolos susceptibles a la infección por esta bacteria (2,6).

Este patógeno oportunista que puede utilizar una amplia variedad de compuestos como fuentes de carbono, puede causar tres tipos de infecciones serias: 1) aguda y localizada, como puede ocurrir en individuos a quienes causa daño ocular afectando la córnea; 2) crónica pero localizada, como sucede en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística; 3) grave y diseminada como puede ocurrir en pacientes inmunocomprometidos o aquellos con extensas quemaduras (1,7).

Algunos de los cuadros clínicos más comunes causados por esta bacteria son neumonía, septicemia, otitis externa maligna, osteomielitis, panoftalmitis, ectima gangrenoso, celulitis, meningitis y endocarditis entre otros (1,6,9).

Se sabe que la patogenicidad de P. aeruginosa es multifactorial y en ella están involucrados tanto la bacteria como el hospedero. Existen varios factores por parte del parásito ya que cada uno de los componentes del microorganismo tiene propiedades patogénicas aunque en diferentes grados de potencia y que ejercen diferentes efectos en los mecanismos de defensa del hospedero.

Entre los principales factores de patogenicidad existen los de tipo soluble o exportable, tales como proteasas, exotoxina A, exoenzima S, fosfolipasa C y elastasa entre las más importantes (1,3). Como parte de los factores celulares o estructurales (llamados también no exportables) se encuentran los pili, polisacárido limoso, lipopolisacáridos y flagelo (1,13).

Aunque la patogenicidad de P. aeruginosa había sido atribuida al lipopolisacárido de la pared celular, estudios posteriores han demostrado que la exotoxina A es el componente más tóxico (3). En experimentos hechos en animales de laboratorio, se ha observado que la exotoxina A es 20,000 veces más tóxica que el lipopolisacárido, y que inyectada en ratones, produce neutropenia y necrosis (1,3). Asimismo inhibe la síntesis de proteínas ya que tiene actividad de una ADP-ribosil transferasa que inactiva al factor de alargamiento 2 (EF-2), siendo por esto citotóxica para un gran número de líneas celulares (3,6,12,17,19).

Otro de los factores son las proteasas, importantes enzimas extracelulares producidas por P. aeruginosa que tienen capacidad de disolver y licuar elastina, disolver fibrina y colágeno; si son inyectadas en la piel de animales de laboratorio producen lesiones hemorrágicas y necróticas (3,8,9,19). En base a esto se sabe que una cepa que produce proteasas en cantidades normales, tiene una velocidad de crecimiento mayor cuando se inoculara en piel quemada en animales de laboratorio, lo cual favorece su establecimiento en el hospedero e incrementa la velocidad de aparición de bacterias

en la sangre después del inóculo (19).

La exoenzima S es otro de los productos elaborados por P. aeruginosa que también contribuye a la patogenicidad de esta bacteria. Su actividad enzimática se asemeja mucho a la exotoxina A, aunque ambas toxinas son química y físicamente diferentes. Su presencia es común en cepas aisladas de pacientes quemados o bacterémicos; sin embargo, se ha observado que sólo cepas productoras de esta enzima son capaces de diseminarse a otros tejidos y establecer una sepsis fatal. Se ha observado que cepas mutantes en la producción de exoenzima S se diseminan más lentamente a partir del sitio de inoculación (10).

P. aeruginosa produce dos enzimas hemolíticas que pueden contribuir a la patogenicidad de este patógeno oportunista. Una de esas hemolisinas es un glicolípido resistente al calor y la otra es la fosfolipasa C (lecitinasa) que es lábil al calor (15). Si se inyecta la fosfolipasa en animales de experimentación produce necrosis hepática y abscesos de piel. Esta enzima libera fosforilcolina a partir de lecitina y puede jugar un papel significativo en la patogénesis de la neumonía por P. aeruginosa. Además, se cree que el mecanismo de patogénesis está relacionado con la destrucción del surfactante pulmonar, cuyo componente mayor es la lecitina. La fosfolipasa C causa también necrosis del tejido pulmonar y aumento de la permeabilidad vascular en ratones (2,15).

Otro factor es la elastasa, que purificada ha demostrado ser dermonecrótica y causa daños graves cuando se aplica en córneas

traumatizadas de ratón (22). Esta enzima actúa como una endopeptidasa, que tiene la capacidad de digerir proteínas humanas incluyendo elastina, colágena, fibrina, inmunoglobulina A (IgA), componentes del complemento, etc., además el potencial de degradar tejidos humanos (16,18).

P. aeruginosa produce pigmentos entre los cuales se encuentran las clorafinas, piomelanina, piorrubina y piocianina; se ha postulado que la piocianina suprime el crecimiento de otras bacterias facilitando la colonización de tejidos por P. aeruginosa. Esta sustancia puede ser ocasionalmente observada en vendajes que cubren heridas infectadas (1,3,6).

La complejidad de la estructura de este bacilo y la presencia de numerosos factores de patogenicidad representan un reto a los mecanismos de defensa del hospedero, de modo que una defensa efectiva del hospedero contra esta bacteria depende también de las funciones integradas por la barrera física de la piel, anticuerpos, sistema del complemento, células fagocíticas y linfocitos.

Como apoyo para combatir los diversos problemas graves que causa P. aeruginosa en individuos susceptibles, se han llevado a cabo diversas investigaciones que persiguen la creación de una vacuna que permita contrarrestar los efectos nocivos de la bacteria en el hospedero. En la terapéutica, se han hecho diversos trabajos para implementar el manejo de pacientes por medio de la transferencia de anticuerpos ya elaborados (23). Asimismo, continúa la búsqueda de mejores antibióticos (22) que sean capaces de

matar a estos microorganismos. No se han obtenido aún resultados totalmente satisfactorios, pero se están realizando esfuerzos a diferentes niveles de modo que en un futuro puedan implementarse esquemas de inmunización activa y pasiva o nuevos tratamientos con antibióticos más efectivos que existen actualmente.

Sin embargo y como se mencionó anteriormente se han elaborado diversos tipos de vacunas intentando con ello estimular la producción de anticuerpos protectores. Entre los intentos por lograr este objetivo se han ideado vacunas que consisten en preparaciones hexavalentes inespecíficas, o bien vacunas consistentes en células totales convenientemente tratadas, haciendo mezcla de lipopolisacáridos de diferentes inmunotipos de la bacteria, vacunas polivalentes o bien se ha recurrido a la producción de toxoides, los cuales hasta la fecha no han tenido el éxito esperado debido a sus efectos colaterales (24,25,26,29,30,31).

Partiendo del conocimiento actual de los factores de P. aeruginosa que contribuyen a la patogenicidad, se ha planteado este trabajo con el propósito de conocer específicamente la producción de anticuerpos contra los antígenos proteicos exportables y no exportables de esta bacteria en el hospedero infectado. Este estudio pretende incrementar el conocimiento de la respuesta inmune contra P. aeruginosa, sobretodo en lo que respecta a la existencia de antígenos proteicos inmunodominantes, esto es, antígenos de la bacteria que tienen relevancia en la inducción de anticuerpos. La identificación de estos antígenos puede establecer las

bases para la elaboración de un toxoide efectivo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Identificar las proteínas exportables y no exportables de Pseudomonas aeruginosa que son inmunodominantes en pacientes infectados.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Establecer las condiciones de cultivo de las cepas de referencia de Pseudomonas aeruginosa cepa 7700 y PA-103 para la inducción de la producción de proteasas, exotoxina A y otras proteínas exportables.

2. Identificar las proteínas del sobrenadante del medio de cultivo y de un extracto celular de Pseudomonas aeruginosa.

3.- Identificar mediante inmunoelectrotransferencia (Western blot), antígenos proteicos de Pseudomonas aeruginosa que son inmunodominantes en personas infectadas con la bacteria.

MATERIAL Y METODOS

1. Microorganismos.

Se usaron las cepas de Pseudomonas aeruginosa PA-103 que es productora de exotoxina A y la cepa 7700 que es productora de proteasas. Ambas fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), de Bethesda, MD. E.U.A.

2. Muestras de suero.

Los sueros con los que se trabajó provinieron de pacientes infectados con P. aeruginosa que se encontraban internados en el Hospital Universitario "Dr. José E. González", así como de individuos sanos. Se obtuvieron 5 ml de cada persona, se dividieron en alícuotas de 1 ml y se guardaron en congelación a -20 °C hasta su análisis por inmunoelectrotransferencia.

3. Cultivo de las cepas de Pseudomonas aeruginosa de referencia.

3.1 Cepa PA-103.

Para inducir la producción de exotoxina A, la cepa PA-103 se cultivó en un medio dializado de caldo de soya y tripticaseína enriquecido con 1% de glicerol y 0.05 M de glutamato monosódico (7). El medio se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 240 g de medio deshidratado de caldo de soya y tripticaseína (Merck México) en 700 ml de agua destilada y se procedió a dializar en alícuotas de 50 ml contra 8 litros de agua destilada du-

rante toda la noche a 4 °C, utilizando una membrana de diálisis con un tamaño de poro de exclusión de 10 a 14 kDa. Una vez dializado se procedió a esterilizar el dializado por autoclave y se guardó en volúmenes de 1 litro. Se distribuyeron cada 2 litros de medio ya estéril en 6 matraces Erlenmeyer de 2 litros de capacidad y se procedió a agregar el glicerol previamente esterilizado por autoclave y el glutamato monosódico esterilizado por filtración. Todos estos procedimientos se realizaron asépticamente en una campana de flujo laminar.

Una vez preparado el medio de cultivo se llevó a cabo la inoculación de la cepa PA-103. Para proceder a inocular los matraces, primero se preparó el inóculo de la siguiente forma. Se sembró la cepa PA-103 en una placa de agar sangre y se dejó crecer a 37 °C durante 18 horas, y de aquí se tomó masa celular con ayuda de un hisopo estéril para preparar una suspensión bacteriana en 10 ml de caldo de soya tripticaseína; se hicieron alícuotas de 2 ml cada una, guardándose en congelación a -20 °C. Estas sólo pueden guardarse en congelación durante dos semanas porque disminuye mucho la viabilidad de las bacterias. La densidad de la suspensión preparada es de aproximadamente 10^{10} bacterias/ml.

De las alícuotas de la suspensión bacteriana se tomaron fracciones de 0.4 ml que se agregaron a cada uno de los matraces con el medio de cultivo estéril, realizando este proceso en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Se dejaron crecer las bacterias a una temperatura de 32 °C durante 22 horas

en agitación a 130 ciclos por minuto (en un agitador Lab-Line Orbit).

Para separar el sobrenadante de la masa celular se utilizó una centrífuga refrigerada Beckman J-6B (en un rango de temperatura de 5 a 10 °C).

3.2 Cepa 7700.

Para cultivar esta cepa productora de proteasas se preparó un medio de cultivo con 0.5% de triptona, 0.25% de extracto de levadura y 0.1% de glucosa ajustándolo a un pH de 7.2 (9).

Preparación del inóculo. Para esta cepa se partió de un cultivo estático en caldo de soya y tripticaseína a 28 °C durante 16 horas.

El medio preparado para el cultivo de la cepa 7700, se dividió en matraces de Erlenmeyer de 2 litros de capacidad colocando fracciones de 200 ml en cada uno bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar. Se inocularon con 0.1 ml de la suspensión bacteriana preparada procedente del cultivo estático mencionado anteriormente.

Una vez inoculados los matraces se incubaron a 35 °C durante 23.5 horas en agitación a 130 ciclos/min (en un agitador Lab-Line Orbit). En este cultivo, por tratarse de una cepa de P. aeruginosa productora de pigmento, se observaron los cultivos de color azul intenso; para eliminar el pigmento del sobrenadante después de separada la masa celular, se dializó como se indica

mas adelante.

4. Obtención del sobrenadante del cultivo.

4.1 Cepa PA-103.

Una vez terminado el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar el contenido de los matraces, utilizando para ello frascos de 250 ml de tapón de rosca de plástico, y se utilizó una centrífuga Beckman J-6B refrigerada en un rango de temperatura de 5-10 °C a 6500 g durante 45 minutos. El sobrenadante se colectó en frascos de vidrio de 500 ml y se guardó a -20 °C hasta su utilización. La masa celular se guardó también a -20 °C.

El sobrenadante del cultivo, libre de células bacterianas, se filtró a través de un prefiltro (AP 25 millipore) empleando vacío, luego se filtró una vez más con un filtro millipore de 0.22 μm también con ayuda de vacío. Una vez filtrado se concentró por medio de un sistema de Amicón.

Concentración del sobrenadante mediante ultrafiltración. La concentración del sobrenadante se realizó por medio de un sistema de Amicón, utilizando una membrana PM10, y una presión de 22 Psi de nitrógeno a 4 °C, manteniendo siempre el reservorio en una placa de agitación magnética a intensidad media. Se dejó concentrar a un volumen de 100 ml y se terminó de concentrar por medio de evaporación en bolsas de diálisis a 4 °C . Una vez concentrado se dializó contra solución salina a 4 °C y una alícuota se utilizó para cuantificación de proteínas por medio del método de

Lowry (33), otra para análisis en geles de poliacrilamida con SDS y otra para realizar la inmunoelectrotransferencia. El resto del sobrenadante se almacenó a -20 °C.

4.2 Cepa 7700.

Una vez obtenido el cultivo se centrifugó el contenido de los matraces en frascos de plástico de 250 ml con tapa de rosca, a 6500 g en una centrifuga Beckman J-6B en un rango de temperatura de 5 a 10 °C.

El sobrenadante del cultivo se recolectó en frascos de vidrio de 500 ml y se almacenó a -20 °C hasta su concentración por sistema de Amicón. La masa celular se almacenó a -20 °C hasta que fue procesada para la obtención del extracto celular.

Una vez obtenido el sobrenadante por centrifugación se pasó por un prefiltro (AP 25 de millipore) empleando vacío y luego por un filtro millipore de 0.22 μm también con ayuda de vacío. Ya filtrado se procedió a concentrarlo mediante un equipo de ultrafiltración con sistema de Amicón de poro de exclusión de <10,000 de peso molecular (PM10).

Concentración del sobrenadante por medio de ultrafiltración. También aquí se empleó el sistema de ultrafiltración con una membrana PM10, con lo que se obtuvieron las moléculas con un peso molecular mayor a 10 kDa, mientras que se eliminaron todas aquellas con un peso molecular inferior. Se concentró de la misma forma que para el sobrenadante de la cepa PA-103 (apartado 4.1);

al concentrarlo así, se eliminó gran cantidad del pigmento, sin embargo, después de la evaporación se sometió a diálisis para eliminar la mayor parte del pigmento. Se realizó cuantificación de proteínas por el método de Lowry. Se almacenó a -20 °C hasta su análisis en geles de poliacrilamida con SDS y su utilización como antígeno para la inmunoelectrotransferencia.

5. Obtención del extracto celular.

5.1 Cepa PA-103.

Después de haber centrifugado el cultivo y separado el sobrenadante, la masa celular se colectó en tubos de plástico de 50 ml y se centrifugó a 3000 rpm (en una centrífuga Servall) durante 15 minutos. Se realizaron 4 lavados del paquete celular empleando solución salina estéril (al 0.85%), centrifugando cada vez durante 15 minutos a 5500 rpm. Una vez realizados se tomaron alícuotas de 15 ml de esta masa celular y se colocaron en un recipiente de baño de hielo para llevar a cabo la sonicación de las bacterias durante 5 minutos a intervalos de 30 segundos y a una intensidad de la punta de Titanio de 60% (Sonicador Biosonik Bronwill Scientific), tiempo en el que se observó un 90% o más de destrucción celular. Cada una de las fracciones sonicadas se colectaron en tubos de 50 ml y se mantuvieron en hielo hasta terminar.

Se centrifugó el material celular sonicado durante 15 minutos a 5500 rpm (Centrífuga Servall) y el sobrenadante obtenido se

colocó en tubos de ultracentrífuga y se llevó a ultracentrifugación a 85000 g durante una hora a 5 °C en una ultracentrífuga Beckman J-50E; se tomó el sobrenadante y se guardó en alícuotas que se liofilizaron y mantuvieron a -20 °C, determinándose previamente la cantidad de proteínas existentes por el método de Lowry. Se almacenó a -20 °C hasta su análisis en geles de poliacrilamida y como antígeno en la inmunoelectrotransferencia.

5.2 Cepa 7700.

Una vez centrifugado el cultivo bacteriano y separado el sobrenadante de la masa celular, ésta se colectó en tubos de plástico de 50 ml de capacidad y se centrifugó a 3500 rpm (centrífuga Servall) y se desechó el sobrenadante. Se realizaron cuatro lavados a la masa celular con solución salina estéril, centrifugando cada vez a 5500 rpm durante 15 minutos.

Se tomaron alícuotas de 15 ml de la masa celular y se colocaron en un recipiente estéril y en baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de las proteínas y se sometieron a sonicación a una intensidad de la punta de Titanio de 60%, durante 5 minutos a intervalos de 30 segundos, en los que se observó aproximadamente un 90% de destrucción celular; las alícuotas sonicadas siempre se mantuvieron en hielo para evitar la degradación de las proteínas bacterianas.

El material sonicado se colectó en frascos para ultracentrifuga y se centrifugó a 85000 g en una ultracentrífuga Beckman

J-50E durante 60 minutos a una temperatura de 5 °C. El sobrenadante obtenido se sometió a diálisis para eliminar el pigmento, utilizando solución salina estéril y realizándolo a 4 °C durante toda la noche (12 horas aproximadamente) haciendo cambios cada 4 horas. Se cuantificó la concentración de proteínas y se liofilizó en alícuotas, que se guardaron a -20 °C hasta su análisis en geles de poliacrilamida y como antígeno para la inmunoelectrotransferencia.

6. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida.

Para el análisis del extracto celular y del sobrenadante de las cepas PA-103 y 7700 se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes según el método de Laemmli (31).

Los geles de poliacrilamida se hicieron en placas de vidrio de 14 x 18 cm. La concentración del gel concentrador fue del 5% y para el gel de corrimiento se utilizó un gradiente de 8.75 a 18%. El detergente empleado fue el SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) y se utilizó 2-mercaptoetanol como agente reductor y se sometió a ebullición por 2 minutos en un baño de agua, tanto para la muestra como para los marcadores de peso molecular.

6.1 Preparación de soluciones y reactivos.

Las soluciones utilizadas para este tipo de electroforesis se elaboraron de la siguiente forma:

1. Buffer para gel de corrimiento (Buffer Tris-Base con pH 8.8 - 9.0)

8.3 g de Tris-Base (Sigma) en 25 ml de agua tridestilada. Ajustar el pH con HCl 5M y agregar 0.19 g de EDTA, aforar a 50 ml con agua tridestilada.

2. Buffer Tris-HCl pH 6.6 - 6.8 (1.2 M) para gel separador.

2.99 g de Tris-HCl y se disuelven en 25 ml de agua tridestilada. Se ajusta el pH con HCl 5 M y aforar a 50 ml.

3. Solución de Acrilamida al 30%.

A 29.2 g de acrilamida (Sigma) y 0.8 g de Bis-acrilamida se le agregó 70 ml de agua tridestilada y se mantuvo en agitación toda la noche a 4 °C. Se aforó a 100 ml con agua tridestilada y se filtra. Se agregó amberlita (amberlita XAD-7 de Sigma) y se mantuvo en agitación durante una hora. Posteriormente se filtró para eliminar la amberlita. Se conservó a 4 °C protegida de la luz.

4. Glicerol al 50%

11.48 ml de glicerol y 8.5 ml de agua tridestilada.

5. Solución SDS al 10% (p/v) en agua tridestilada.

6. Solución de persulfato de amonio al 10% (p/v) en agua tridestilada.

7. TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina de Sigma)

8. Buffer de muestra.

1 g de SDS, 1 ml de 2-mercaptoetanol, 5 g de sacarosa y 0.005 g de azul de bromofenol; se diluyeron en Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, y se aforó a 10 ml.

9. Buffer de corrimiento (Buffer para electrodos).

14.4 g de glicina (Sigma grado reactivo molecular) 3.02 g de Tris-Base (Sigma) y 1 g de SDS. Se aforó con agua tridestilada a un litro. Se ajustó el pH a 8.3 con HCl concentrado.

10. Reactivos para tinción con nitrato de plata.

a). Solución fijadora: 50 ml de metanol, 12 ml de ácido acético glacial, se aforó con agua tridestilada a 1000 ml.

b). Solución de lavado: 100 ml de etanol, 50 ml de ácido acético glacial. Se aforó a 500 ml con agua tridestilada.

c). Solución oxidante: 0.495 g de dicromato de potasio (0.0034M), 1 ml de ácido nítrico (0.00322 M). Se aforó a 500 ml con agua tridestilada, se mantiene protegido de la luz y a temperatura ambiente.

d). Nitrato de plata (0.012 M): Pesar 1.0192 g de nitrato de plata y aforar a 500 ml con agua tridestilada. Mantener cubierto de la luz y a temperatura ambiente.

e). Solución reveladora: Pesar 7.4 g de bicarbonato de sodio

(0.28 M), disolver en 250 ml de agua tridestilada antes de terminar la aforación agregar 0.125 ml de formol concentrado.

6.1.1 Preparación de la mezcla de geles.

Gel separador

Solución	ml de sol./gel Gel separador al 6.75%	ml de solución Gel separador al 18%
Acrilamida	2.04	4.197
Buffer Tris-Base pH 8.8-9.0	1.32	1.32
SDS al 10%	0.069	0.069
Persulfato de amonio al 5%	0.025	0.025
Glicerol al 50%	0.480	0.740
Agua tridestilada	3.060	0.645
TEMED	0.003	0.003
	—————	—————
	7 ml	7 ml

Gel concentrador al 5%

Solución	ml de solución
Acrilamida (30%)	0.4995
Buffer Tris-HCl pH 6.8	0.375
Agua tridestilada	1.980
SDS	0.030
Persulfato de amonio al 5%	0.105
TEMED	0.003
	<hr/> 3 ml

6.2 Procedimiento empleado para elaborar un gel en gradiente.

a). Preparación de las placas de vidrio. Se lavaron con etanol y se enjuagaron con agua destilada. Se dejaron secar a temperatura ambiente.

b). Se colocaron los espaciadores de 1 mm de grosor cubiertos con vaselina entre las dos placas de vidrio. Para sujetar el cassette se colocaron pinzas en la parte lateral e inferior.

c). Se preparó la mezcla con las cantidades indicadas para el gel de 8.75 y 18%. Una vez hecha, se vació simultáneamente en los reservorios correspondientes del formador de gradiente (Bio-Rad), que se colocó sobre una placa magnética para mantenerlo en agitación. Se llenó el cassette a una velocidad de 62 gotas por minuto utilizando una bomba peristáltica (LKB), finalmente se

cubrió con agua tridestilada, a una velocidad de 30 gotas por minuto.

d). Se dejó polimerizar el gel separador por 45 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se preparó la mezcla para el gel concentrador como se indicó anteriormente y se colocó un peine con carriles de 0.8 cm de ancho y de 1 mm de grosor. Se vació la mezcla preparada y se dejó polimerizar a temperatura ambiente.

e). Polimerizado el gel, se retiró el peine y se lavaron los carriles con agua tridestilada. Se guardó a 4 °C con buffer de corrimiento.

f). Se precorrió el gel a un voltaje constante de 50V durante 25 minutos. Se aplicó la muestra (sobrenadante o extracto celular) y los marcadores de peso molecular.

g). Se sometió a electroforesis a voltaje constante de 80V hasta que el colorante alcanzó el límite del gel concentrador. Posteriormente se incrementó el voltaje hasta 150V.

h). Se tiñó el gel con nitrato de plata.

6.2.1 Tinción con nitrato de plata.

Se utilizó para teñir los geles la técnica de tinción de Merril (34) que se realizó de la forma siguiente:

a) Se colocó el gel en solución fijadora por espacio de 30 minutos y en agitación suave.

b) Se efectuaron 3 lavados de 10 minutos con solución de

lavado.

c) Se sumergió el gel en dicromato de potasio con agitación suave por 5 minutos.

d) Se hicieron 4 lavados de 5 minutos cada uno, utilizando agua bidestilada.

e) Se sumergió en nitrato de plata durante 30 minutos.

f) Se reveló el gel haciendo 3 lavados rápidos hasta que aparecieron las bandas de proteínas y de los marcadores de peso molecular. Una vez que aparecieron las bandas se detuvo la reacción con ácido acético glacial.

g) Se enjuagó el gel en agua y se conservó en glicerol al 10% a 4 °C.

Para calcular los pesos moleculares de las bandas, se aplicaron marcadores de 6H y 7H (Sigma) y se graficó en papel semi-logarítmico de 2 ciclos.

7. Inmunoelectrotransferencia (Western blot).

Para la inmunoelectrotransferencia, se preparó un gel de poli-acrilamida en gradiente de 8.75 a 18% con SDS, como se indicó anteriormente. Las muestras (extracto o sobrenadante), y los marcadores de peso molecular se prepararon con buffer de muestra y se colocaron en ebullición por 2 minutos, luego se aplicaron al gel y se sometió a electroforesis en las condiciones establecidas. Una vez terminado el corrimiento electroforético se colocó el gel en buffer de transferencia y se procedió a armar el cassette de

la siguiente forma:

1. placa de sostén de acrílico
2. esponja
3. papel filtro
4. gel de poliacrilamida-SDS en gradiente 8.75-18% hacia el cátodo.
5. papel de nitrocelulosa
6. papel filtro
7. esponja
8. placa de sostén de acrílico

Antes de preparar el cassette, el papel de nitrocelulosa, el papel filtro y las esponjas fueron sumergidos en buffer de transferencia a 4 °C durante 15 minutos.

La cámara de transferencia se llenó con el buffer 2 horas antes, con la finalidad de mantenerlo frío mediante el enfriador que debe estar a 4 °C. Se colocó el cassette y se realizó la transferencia de los extractos y de los filtrados de cada cepa por separado. Se vigiló que la intensidad de la corriente no llegue a un amperio y que la temperatura del buffer y el enfriador no aumente. La transferencia se realizó durante 90 minutos, esto se repitió en cada caso.

7.1 Preparación de soluciones y reactivos para inmunoelectrotransferencia.

1. Buffer de transferencia.

Solución A: Trisma Base (0.025M) 9.06 g, Glicina (grado reactivo molecular Sigma) 43.23 g. Estos se disolvieron en dos litros de agua tridestilada.

Solución B: Metanol al 20%. Se tomaron 600 ml de metanol y se

aforaron a un litro con agua tridestilada.

Se mezclaron ambas soluciones y se obtienen 3 litros que se conservan a 4 °C.

2. Buffer salina fosfatos (PBS) pH 7.2-7.4.

Cloruro de sodio 8 g. fosfato dibásico con 12 moléculas de agua 2.9 g (o 1.2 g si es anhidro), fosfato de potasio dibásico 0.2 g y 0.2 g de cloruro de potasio. Aforar a un litro con agua tridestilada.

3. Solución bloqueadora.

Gelatina al 3% en PBS.

4. Solución diluyente para sueros y conjugado.

20 ml de gelatina al 3% en PBS más 20 ml de PBS y se agregan 40 µl de Tween 20.

5. Solución de lavado.

25 ml de gelatina al 3% que se aforaron a 250 ml con PBS y se agregaron 250 µl de Tween 20.

6. Conjugado.

Se utilizó un conjugado polivalente anti-humano unido a peroxidasa (Sigma).

7. Solución de revelado.

20 mg de 3'3-diaminobencidina (cromógeno), 40 ml de PBS pH 7.5 y 80 μ l de peróxido de hidrógeno (sustrato).

8. HCl 5N para detener la reacción del revelado.

7.1.1 Procedimiento general para la realización de la inmunoelectrotransferencia (Western blot).

a). Electroforesis de gel en gradiente de 8.75 a 18% de poliacrilamida con SDS y 2-mercaptoetanol como se explicó anteriormente.

b). Armado el cassette con el papel filtro, esponjas, papel de nitrocelulosa y gel de poliacrilamida separado electroforéticamente en las condiciones antes señaladas.

c). Colocación del cassette en la cámara de transferencia conteniendo el buffer de transferencia a 4 °C, verificando que los electrodos queden cubiertos por el buffer. Se tapó la cámara y se transfirió por espacio 90 minutos. Este procedimiento se efectuó para los extractos celulares y para los filtrados de las cepas de referencia de P. aeruginosa.

d). Una vez terminada la transferencia, se bloqueó el papel de nitrocelulosa con gelatina al 3% en PBS a una temperatura de 37 °C durante 60 minutos.

e). Se cortó el papel de nitrocelulosa ya transferido y bloqueado en tiras de 0.4 mm de ancho y se incubaron durante toda la

noche a 4 °C con el suero problema diluído 1:100 con gelatina al 1.5% y Tween 20 (1:1000). Se utilizó un volumen de 2.5 ml por tira.

d). Se realizaron 4 lavados (dos rápidos y dos de 5 minutos) con gelatina al 1.5% en PBS y Tween 20 (1:1000), para eliminar el suero problema.

e). Se agregó a cada tira conjugado polivalente anti-humano 1:1000 (Sigma), por espacio de 2 horas a temperatura ambiente y en agitación suave y constante. Se utilizaron 2.5 ml del conjugado por carril, diluído 1:1000.

f). Se realizaron 4 lavados (como en el paso d), para eliminar el conjugado.

g). Las tiras se colocaron en 40 ml de PBS pH 7.5, con 20 mg de 3'3-diaminobencidina y se agregó 80 μ l de peróxido de hidrógeno al 30% (sustrato). La reacción se detuvo con HCl 5N cuando se observó la aparición de bandas. Una vez detenida la reacción se enjuagaron las tiras con agua bidestilada, se secaron con papel filtro y se guardaron protegidas de la luz para su análisis posterior.

Por separado, una tira de papel de nitrocelulosa de 2 cm de ancho que contiene marcadores de peso molecular y antígeno se tiñó con azul de Coomasie (preparado para papel de nitrocelulosa) durante 10 minutos. Se decoloró con una mezcla de metanol y ácido acético glacial. Se secó con papel filtro y se guardó para su análisis posterior.

De igual manera, se tomó un segmento del gel antes de transferirlo, y se tiñó con nitrato de plata como se indicó anteriormente (esto se realizó con la finalidad de observar la separación electroforética de las muestras analizadas).

RESULTADOS

1. Crecimiento de las cepas de referencia de P.aeruginosa.

1.1 Cepa PA-103.

A partir de un volumen de 7.5 litros de medio de cultivo de caldo de soya y tripticaseína, del que se utilizó el dializado que fue suplementado con glutamato monosódico y glicerol, se obtuvieron 76.5 g de masa húmeda celular. Por medio del método de Lowry se determinó la cantidad de proteínas que fue de 402.5 mg en el extracto.

También se cuantificaron proteínas en el sobrenadante del cultivo y el rendimiento fue de 205 mg/ml (Tabla 1).

1.2 Cepa 7700.

Para esta cepa se inocularon 6.25 litros del medio de cultivo que se preparó a base de triptona, extracto de levadura y glucosa, la cantidad de masa húmeda obtenida fue de 73 g.

Se cuantificó el nivel de proteínas por el método de Lowry, y la cantidad de proteínas para el extracto celular fue de 211 mg. En el sobrenadante se obtuvieron 195 mg de proteína por litro de medio de cultivo (Tabla 1).

2. Análisis de las electroforesis de los extractos celulares y sobrenadantes con SDS-PAGE.

2.1 Análisis del extracto celular y del sobrenadante del medio de cultivo de la cepa PA-103 mediante SDS-PAGE.

El extracto celular de esta cepa se analizó mediante SDS-PAGE en gradiente de 8.75 al 18% con 2-mercaptoetanol y ebullición por 2 minutos. Como únicamente se analizó la presencia de las bandas proteicas se utilizó un gel con un grosor de 1 mm. Con esta técnica se observó la presencia de 27 bandas de proteínas en el extracto cuando fueron teñidas con nitrato de plata (Figura 1).

Para el sobrenadante se pudieron observar 11 bandas de proteínas también teñidas con nitrato de plata (Figura 1).

Se observó una distribución uniforme de las bandas proteicas en relación a los marcadores de peso molecular para el extracto celular, para el sobrenadante del cultivo la distribución de la mayoría de las bandas se encontró en un rango de peso molecular de 24 hasta menos de 14 kDa. El gel en gradiente brindó buena resolución, sin embargo debido al gran número de bandas en el extracto celular fue difícil discernir entre banda y banda.

2.2 Análisis del extracto celular y sobrenadante del medio de cultivo de la cepa 7700 mediante SDS-PAGE.

Por análisis con SDS-PAGE en gradiente de 8.75 al 18% se observaron 28 bandas proteicas cuando fueron teñidas con nitrato de plata. La mayor parte de las bandas se encontró entre los pesos

moleculares correspondientes a 20.1 hasta 205 kDa (Figura 2).

En el sobrenadante de cultivo de la cepa 7700 se encontró un número menor de bandas, se encontraron sólo 11 bandas, también teñidas con nitrato de plata; la banda observada con mayor intensidad en el sobrenadante fue la que correspondió a un peso molecular aproximado de 20.1 kDa; las otras bandas que se observaron con menor intensidad se encontraron uniformemente distribuidas entre el rango de los pesos moleculares altos y bajos (Figura 2).

3. Pesos moleculares de las proteínas identificadas.

Para determinar los pesos moleculares de las proteínas separadas por SDS-PAGE y de las bandas reconocidas por los sueros de pacientes infectados por P. aeruginosa, se utilizaron los siguientes marcadores: miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa (97.4 kDa), albúmina sérica bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), tripsinógeno (24 kDa), inhibidor de tripsina (58 kDa) y lactoalbúmina (14.4 kDa). Los marcadores de peso molecular utilizados correspondieron a un rango alto y bajo (6H y 7H, que se prepararon de acuerdo a las especificaciones de Sigma). Se realizó una curva de calibración en papel semilogarítmico de 2 ciclos para extrapolar los Rf de las proteínas que se separaron. Se determinaron los Rf de los marcadores (Tabla 2).

4. Análisis por Inmunoelctrotransferencia (Western blot) de los extractos celulares y sobrenadantes.

4.1 Análisis por Inmunoelctrotransferencia (Western blot) del extracto celular y del sobrenadante de la cepa de la PA-103.

Para determinar la presencia de antígenos proteicos inmunodominantes, se revelaron las proteínas del extracto celular con los sueros de los pacientes con neumonía por P. aeruginosa. Las bandas reconocidas moderadamente por los sueros de los pacientes fueron la de 152 y 60 kDa. El reconocimiento fue menor para la banda de 170 y 24 kDa. Estas 4 bandas no fueron reconocidas por los sueros de personas sanas (Figura 3).

Las proteínas de 138, 78 y 60 kDa del sobrenadante de cultivo, fueron las más reconocidas por los sueros de pacientes infectados (Tabla 3). Para las proteínas de 132.5 y 94 kDa el reconocimiento fue menor (Figura 4).

4.2 Análisis por inmunoelctrotransferencia (Western blot) del extracto celular y del sobrenadante de la cepa 7700.

El reconocimiento de bandas inmunodominantes en el extracto celular por los sueros de pacientes con neumonía por P. aeruginosa, fue moderado para las proteínas del extracto celular cuyos pesos moleculares fueron de 155, 138, 59, 57 y 20.7 kDa (Tabla 4). El reconocimiento fue similar en algunas proteínas del extracto celular de la cepa PA-103.

En el sobrenadante de cultivo de la cepa 7700 la proteína de

20.7 kDa fue reconocida por la mayoría de los sueros de los pacientes, siendo además la única proteína inmunodominante. Como se mencionó anteriormente esta proteína no fue reconocida por los sueros de personas sanas.

DISCUSION

Pseudomonas aeruginosa, importante agente causal de infecciones intrahospitalarias, sobre todo en un determinado grupo de pacientes susceptibles, ha sido ampliamente estudiado desde su descubrimiento como patógeno oportunista (1). El estudio acerca de este microorganismo, sigue incrementándose día a día, pues aunque existe una amplia variedad de antibióticos, el tratamiento de las infecciones debidas a P. aeruginosa no ha tenido el impacto deseado sobre la morbilidad y la mortalidad asociada principalmente con neumonía o septicemia, por lo que ha sido necesario desarrollar múltiples esfuerzos para producir: a) antibióticos más eficaces, b) estimular los mecanismos de defensa del hospedero ya sea mediante la transferencia pasiva de anticuerpos o por medio de vacunas que apoyen a la antibioticoterapia, cuando ya se ha reproducido el microorganismo en el hospedero y los productos tóxicos no pueden ser bloqueados por el antibiótico; los intentos más acertados parecen fundamentarse en incrementar los niveles de anticuerpos séricos para lipopolisacáridos tipo específicos y para la exotoxina A.

Sin embargo, para que estas posibilidades tengan éxito, sería conveniente partir del conocimiento más específico acerca de la relevancia que tienen para el sistema inmune del hospedero determinados productos de P. aeruginosa que pueden estar implicados en su patogenicidad.

Para determinar los antígenos inmunodominantes fue necesario cultivar un volumen importante de medio de cultivo, y aún cuando P. aeruginosa es un microorganismo fácilmente cultivable, pues inclusive puede crecer en agua destilada (6), existen diferentes condiciones de cultivo que favorecen o inhiben la expresión de determinados productos tóxicos o bien el incremento en la producción de masa celular. Como en este trabajo interesaba la producción de abundante masa celular además de que la bacteria pudiera crecer en óptimas condiciones de temperatura para producir y exportar sus proteínas al medio de cultivo. En este trabajo utilizamos antígenos de naturaleza proteica del sobrenadante y del extracto obtenido a partir de la masa celular.

Como P. aeruginosa es un organismo aerobio estricto, el mantenimiento de los cultivo en agitación favoreció la aereación para que hubiera un crecimiento importante, que se habría reducido si el cultivo se mantiene estático.

Cuando se cultivó la cepa PA-103, la masa celular obtenida se sometió a sonicación y se le determinó la concentración de proteínas, que fue de 402.5 mg en el extracto celular, que presentó un color amarillento. El sobrenadante de cultivo de esta cepa se observó también de color amarillo y el rendimiento proteico fue de 205 mg/l.

Sin embargo, cuando se cultivó la cepa 7700, se observó que ésta es altamente productora de pigmento, de modo que los culti-

vos se observaron de color azul intenso, y fue necesario someter el sobrenadante a diálisis para eliminarlo, pues de lo contrario pudiera haber interferido en la separación electroforética. Se concentró por ultrafiltración por medio de un sistema de Amicón y esto ayudo a eliminar parte del pigmento, pero se tuvo que dializar para eliminar la mayor cantidad posible.

También se obtuvo un buen rendimiento proteico en masa celular, siendo éste de 211 mg de proteínas en el extracto celular cuando se hizo la ultracentrifugación del material sonificado, se observó un color ligeramente oscuro debido también a la producción de pigmento, el cual también fue necesario eliminar por diálisis. El sobrenadante de cultivo produjo 195 mg de proteína por litro de cultivo.

Para llegar a la determinación de las bandas proteicas que se comportaron como inmunodominantes reconocidas por los sueros de los pacientes infectados, se analizaron por SDS-PAGE el extracto y el sobrenadante del cultivo de cada cepa de referencia de P. aeruginosa, para observar las bandas se utilizó la de tinción con nitrato de plata debido a que brinda una gran sensibilidad, con lo que se observaron bien las bandas proteicas. Debido a la gran cantidad de bandas, y su proximidad sobre todo en el extracto celular, se utilizaron geles en gradiente de 8.75 a 18%, los cuales proporcionaron mejor resolución.

Con el extracto celular de la cepa 7700 se observaron 28 bandas proteicas, analizadas en SDS-PAGE en gradiente de 8.75 a

18% y teñidas con nitrato de plata, que al ser transferidas a papel de nitrocelulosa, fueron reconocidas por los sueros de personas infectadas, pero únicamente resultaron inmunodominantes en forma moderada las proteínas con un peso molecular de 138, 59, 57 y 20.7 kDa, estas bandas fueron reconocidas solo por pacientes infectados, pero no por los sueros de personas sanas. Como puede apreciarse, la banda de 20.7 kDa fue reconocida por los pacientes cuando se trabajó con el extracto celular pero también con el sobrenadante de cultivo.

En lo que respecta a la cepa PA-103, al someter al extracto celular a separación por SDS-PAGE, en las mismas condiciones que para la cepa 7700, se demostró la existencia de 26 bandas de proteínas teñidas con nitrato de plata, como puede apreciarse, existe un número muy similar de bandas entre una cepa y otra.

Al transferir estas proteínas al papel de nitrocelulosa y revelarlas con los sueros de los pacientes infectados con P. aeruginosa, se pudo determinar que solo 4 proteínas resultaron moderadamente reconocidas por estos sueros, y correspondieron a 152 y 60 kDa; en proporción menor fueron reconocidas solo por los sueros de los pacientes, las proteínas de 170 y 24 kDa.

En general, con las proteínas del extracto celular, el reconocimiento fue moderado, sin embargo, cuando se transfirieron las proteínas del sobrenadante del cultivo de la cepa 7700, se observó un alto reconocimiento hacia las proteínas de 138, 78 y 60 kDa por parte de los sueros de los pacientes, y las proteínas

de 132.5 y 94 kDa resultaron inmunodominantes pero en forma ligeramente menor. Presumiblemente, hasta su demostración por el laboratorio, la proteína de 78 kDa parece ser una fosfolipasa en base a su peso molecular y al sitio de infección de donde proviene.

En resumen, con los experimentos realizados, se observó que existe similitud en el número de bandas en los extractos celulares de ambas cepas, aunque existe un número mayor en el extracto celular y sobrenadante de la cepa 7700; la zona comprendida entre 20 a 116 kDa mantiene una distribución uniforme de las bandas proteicas así como en su intensidad. Se observaron sin embargo, bandas muy intensas en un rango aproximado de 21 y 22 kDa y que al transferir a papel de nitrocelulosa fueron reconocidas por los sueros de pacientes infectados.

Con la metodología empleada se pudieron alcanzar los objetivos planteados al identificar proteínas inmunodominantes en pacientes infectados. En este trabajo se utilizaron sueros de personas con neumonía, que es una infección de tipo agudo, pero esta misma metodología podría aplicarse para la búsqueda de antígenos proteicos inmunodominantes en grupos de pacientes con infecciones crónicas, en los cuales quizá pueda presentarse una respuesta humoral diferente debido al período que pasan los antígenos de P. aeruginosa estimulando al sistema inmune.

Por otra parte, una vez realizada esta investigación y con los resultados obtenidos, podrían establecerse nuevos objetivos

de trabajo en los que se investigara la naturaleza de los antígenos inmunodominantes encontrados, en éstos y en otros grupos de pacientes con diferentes cuadros clínicos producidos por P. aeruginosa, pero además también podría investigarse si esos anticuerpos que el sistema inmune del paciente está produciendo tienen función protectora.

Aunque se ha estudiado en forma intensiva por diversos grupos de investigadores, los factores de patogenicidad que P. aeruginosa produce, no ha sido determinado completamente si los anticuerpos que esos antígenos inducen son protectores o no. Esto se debe en parte a que la P. aeruginosa causa una variedad muy grande de entidades patológicas y a la diversidad de productos bacterianos que pueden ser responsables de la patogenicidad en grado variable, dependiendo del cuadro clínico.

Sería conveniente utilizar la metodología aplicada en este trabajo a infecciones agudas localizadas, diseminadas graves y crónicas, para posteriormente analizar cuales son los antígenos que el sistema inmune detecta en mayor grado y si existe uno o varios antígenos comunes en todos los procesos. De tal forma que purificándolos pudiera elaborarse un toxoide con las proteínas o factores de P. aeruginosa relevantes en la inducción de anticuerpos y probar si tienen actividad protectora en los diferentes grupos de pacientes.

Otra utilidad que podrían brindar las investigaciones en la detección de antígenos inmunodominantes, sería la implementación

de un método diagnóstico efectivo y rápido de infecciones por P. aeruginosa, aún cuando este aspecto no figura inicialmente como objetivo de esta investigación.

CONCLUSIONES

Se identificaron 3 antígenos inmunodominantes en el extracto celular de P. aeruginosa de la cepa PA-103 cuyos pesos moleculares correspondieron a: 170, 60 y 24 kDa, con variación en la intensidad del reconocimiento. En el sobrenadante del cultivo las proteínas inmunodominantes fueron las de 138, 132.5, 94, 78, y 60 kDa.

Se identificaron 5 antígenos inmunodominantes en el extracto celular de P. aeruginosa de la cepa 7700 correspondiendo a los pesos moleculares de: 155, 138, 59, 57 y 20.7 kDa. Para el sobrenadante del cultivo únicamente fue inmunodominante la proteína de 20.7 kDa que fue reconocida por la mayoría de los pacientes.

Cuando se trabajó con el sobrenadante de los cultivo de ambas cepas, se observó que existía una mayor proporción de reconocimiento de esas proteínas por los sueros de los pacientes infectados, que cuando se trabajó con los extractos celulares.

Esta metodología puede aplicarse a pacientes que tengan otro tipo de infecciones causadas por P. aeruginosa diferentes de la neumonía, para determinación de antígenos inmunodominantes.

BIBLIOGRAFIA

1. Sabath, L.D. 1980. Pseudomonas aeruginosa the organism, disease it causes, and their treatment. Hans Huber Publishers. Switzerland.
2. Liu, P.V. 1976. Biology of Pseudomonas aeruginosa. Hosp. Pract. 1: 139-147.
3. Liu, P.V. 1974. Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 130S: S94-S102.
4. Wrigth, Ch., S. D. Kominos and R.B. Yee. 1976. Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa recovered from vegetable salads. Appl. Env. Micro. 31: 453-454.
5. Woods, D.E., M.S. Schaeffer, H.R. Rabin, D.G. Campbell and P.A. Sokol. 1986. Phenotypic comparison of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a variety of clinical sites. J. Clin. Micro. 24: 260-264.
6. Bodey, G.P., R. Bolivar, V. Fainstein and L. Jadeja. 1983. Infections caused by Pseudomonas aeruginosa. Rev. Infect. Dis. 5: 279-312.
7. Liu, V.P., S. Yoshii and H. Hsieh. 1973. Exotoxins of Pseudomonas aeruginosa. II. Concentration, purification and characterization of exotoxin A. J. Infect. Dis. 128: 514-519.
8. Cicmanec, J.F., I.A. Holder. 1979. Growth of Pseudomonas aeruginosa in normal and burned skin extract role of extracellular protease. Infect. Imm. 25: 477-483.
9. Kreger, A.S. and L. D. Gray. 1978. Purification of Pseudomonas aeruginosa proteases and microscopic characterization of pseudomonal protease-induced rabbit corneal damage. Infect. Imm. 19: 630-648.

10. Nicas, T.I., J. Bradley, J.E. Lochner and B.H. Iglewski. 1985. The role of exoenzyme S in infections with Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 152: 716-721.
11. Berk, R.S., D. Brown, I. Coutinho and D. Meyers. 1987. In vivo studies with two phospholipase C fractions from Pseudomonas aeruginosa. Infect. Imm. 55: 1728-1730.
12. Lory, S. and R. Collier. 1980. Expression of enzymatic activity by exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa. Infect. Imm. 28: 494-501.
13. Bergman, U., J. Scheffer, M. Köller, W. Schonfeld, G. Erbs, F. E. Müller and W. Koning. 1989. Inductor of inflammatory mediators (histamine and leucotriens) from rat peritoneal mast cells and human granulocytes by Pseudomonas strains from burn patients. Infect. Imm. 57: 2187-2195.
14. Pier, G.B. and D.M. Thomas. 1983. Characterization of the human immune response to a polysaccharide vaccine from Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 148: 206-213.
15. Berka, R. M. and M.L. Vasil. 1982. Phospholipase C (heat-labile hemolysine) of Pseudomonas aeruginosa: purification and preliminary characterization. J. Bact. 152: 39-245.
16. Holder, I. A. and A. N. Nelly. 1989. Pseudomonas elastase acts a virulence factor in a burned hosts by Hageman factor-dependent activation of the host kinine cascade. Infect. Imm. 57: 3345-3348.
17. Iglewski, B. 1989. Probing Pseudomonas aeruginosa, an opportunistic pathogen. 5: 303-307.
18. Morihara, K. 1964. Production of elastase and proteinase by Pseudomonas aeruginosa. J. Bact. 88: 745-757.
19. Snell, K., I. A. Holder, S. A. Leppla and C. B. Saelinger. 1978. Role of exotoxin and protease as possible virulence factors in experimental infection with Pseudomonas aeruginosa. Infect. Imm. 19: 839-845.

20. Crowe, K. E., J. A. Bass, V. M. Young and D. C. Straus. 1982. Antibody response to Pseudomonas aeruginosa exoproducts in cancer patients. J. Clin. Micro. 15: 115-122.
21. Stinson, M. W. and Ch. Hayden. 1979. Secretion of phospholipase C by Pseudomonas aeruginosa. Infec. Inmm. 25: 258-564.
22. Cryz, S. J., E. Furer and R. Germanier. 1983. Protection against Pseudomonas aeruginosa infection in a murine burn wound sepsis model by passive transfer of antitoxin A, antielastase and antilipoplysaccharide. Infect. Inmm. 39: 1072-1079.
23. Hunt, J. L. and G. F. Purdue. 1988. A. Clinical trial of IV tetravalent hiperimmune Pseudomonas globulin G in burned patients. J. Trauma. 28: 146-151.
24. Jone, R. J., J. L. Gupta and E. A. Roe. 1970. Controlled trials of and polyvalent Pseudomonas vaccine in burns. Lancet. 2: 977-983.
25. Pavloskis, O. R., D. C. Edman, S. H. Leppla, B. Wretlind, L. P. Lewis and K.E. Martin. 1981. Protection against experimental Pseudomonas aeruginosa infection in mice by active immunization with exotoxin A toxoids. Infect. Imm. 3: 681-689.
26. Jones, R. J., E. A. Roe, J. L. Lowbury, J. H. Miller and J. F. Spilsbury. 1976. A New Pseudomonas vaccine: preliminary trial of human volunteers. J. Hyg. Camb. 76: 429-439.
27. Markham, R. B. and W. G. Powderly. 1988. Exposure of mice to live Pseudomonas aeruginosa generates protective cell mediated immunity in the absence of antibody response. J. Micro. 140: 2039-2045.
28. Kent, S. E. and R. Jones. 1988. Pseudomonas vaccination in chronic ear disease. J. Laryngo. and Otology. 102: 579-581.

29. MacIntyre S., T. McVeigh and P. Owen. 1986. Immunochemical and biochemical analysis of the polyvalent Pseudomonas aeruginosa vaccine PEV. *Infect. Imm.* 51: 675-686.
30. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
31. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
32. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
33. Merril, C. R., M. L. Dunau and D. Goldman. 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 116: 201-207.

ANEXO DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Concentración de proteínas en el extracto celular y sobrenadante del cultivo de Pseudomonas aeruginosa.

Cepa	Volumen cultivado	Masa bacteriana húmeda	Proteínas (Lowry)	
			Extacto	Sobrenadante
PA-103 (ATCC)	7.5 lt.	76.5 g.	402.5mg	205mg/lt.
7700 (ATCC)	6.25 lt.	73 g.	211 mg	195mg/lt.

Tabla 2. Determinación de la movilidad relativa (Rf) de los marcadores de peso molecular en el papel teñido con azul de Coomasie.

Marcador	Migración (mm)	Rf	PM
Miosina	15	0.1773	205 000
β -Galactosidasa	19	0.2245	116 000
Fosforilasa	25	0.2955	97 400
Albúmina Sérica Bovina	36	0.4255	66 000
Gliceraldehído 3-fosfato Deshidrogenasa	41	0.4855	36 000
Anhidrasa Carbónica	49	0.5791	29 000
Tripsinógeno	51	0.6028	24 000
Inhibidor de Tripsina	58	0.6855	20 100
Lactoalbúmina	68	0.8120	14 200
Azul de Bromofenol	84		

Tabla 3. Identificación por Inmunolectrotransferencia de las proteínas inmunodominantes del extracto celular y del sobrenadante del cultivo de *P. aeruginosa* PA-103 (ATCC) reconocidas por sueros de pacientes infectados.

Peso molecular aproximado (kDa)	Extracto celular	Sobrenadante del cultivo
170	33% (3/10)	—
152	40% (4/10)	—
138	—	85.7% (6/7)
132.5	—	71.4% (5/7)
94	—	71.4% (5/7)
78	—	85.7% (6/7)
60	40% (4/10)	85.7% (6/7)
24	33% (3/10)	—

Tabla 4. Identificación por inmunolectrotransferencia de las proteínas inmunodominantes del extracto celular y del sobrenadante del cultivo de P. aeruginosa 7700 (ATCC) reconocidas por sueros de pacientes infectados.

Peso molecular aproximado (kDa)	Extracto celular	Sobrenadante del cultivo
155	40% (4/10)	—
138	40% (4/10)	—
59	40% (4/10)	—
57	40% (4/10)	—
20.7	40% (4/10)	85.7% (6/7)

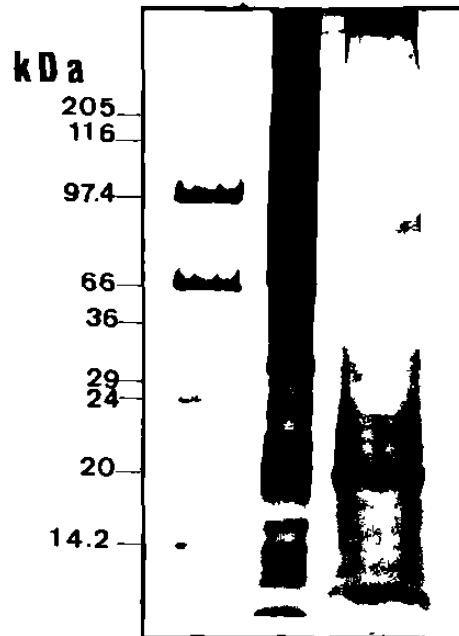


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS y 2-mercaptoetanol, en gradiente de 8.75 a 18% del extracto celular y del sobrenadante del cultivo de la cepa de *P. aeruginosa* PA-103. Carril A: Marcadores de peso molecular. Carril B: Extracto celular. Carril C: Sobrenadante del cultivo. Tinción con nitrato de plata.

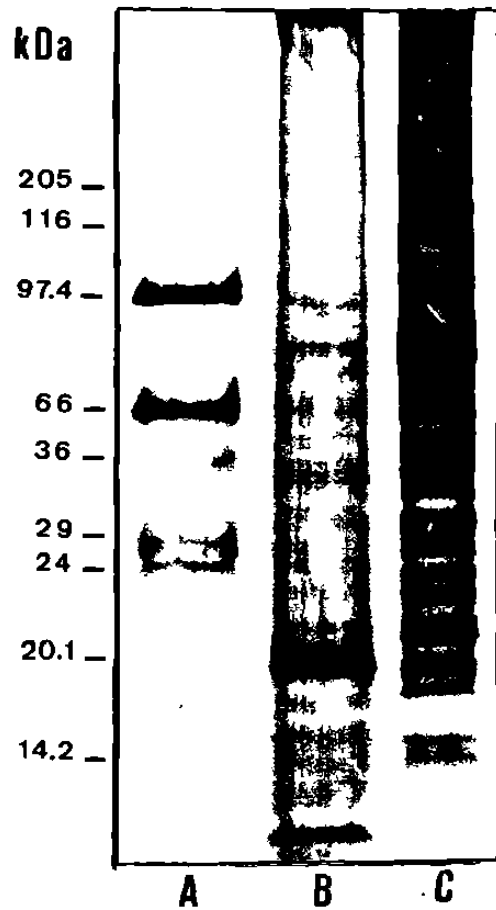


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con SDS y 2-mercaptoetanol, en gradiente de 8.75 a 18% del extracto celular y del sobrenadante del cultivo de la cepa 7700 de p.aeruginosa. Carril A: Marcadores de peso molecular. Carril B: Sobrenadante del cultivo. Carril C: Extracto celular. Tinción con nitrato de plata.

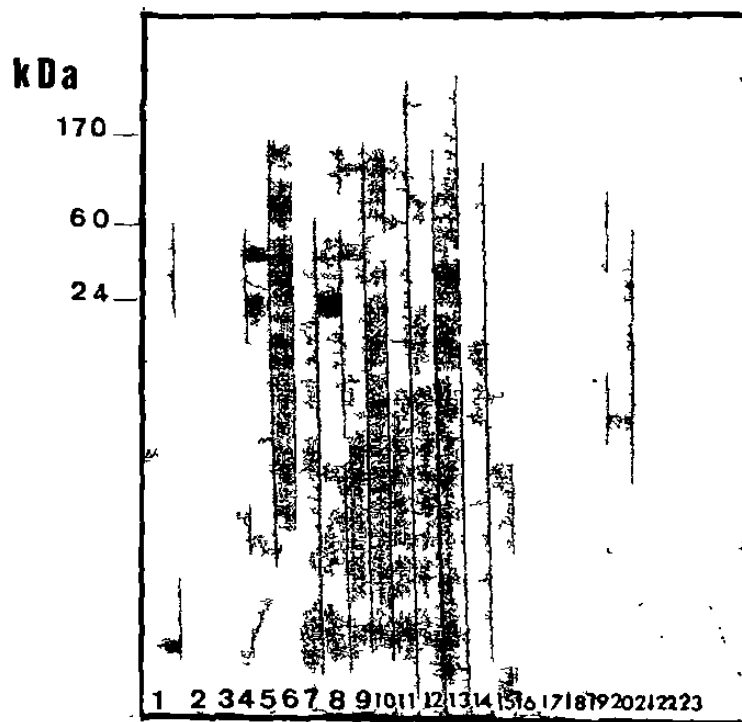


Figura 3. Inmunoelectrotransferencia de las proteínas del extracto celular de *P. aeruginosa* cepa PA-103 revelada con sueros de pacientes infectados. Carril 1: control positivo. Carriles 2 al 11: pacientes infectados. Carriles 12 al 21: sueros de personas sanas.

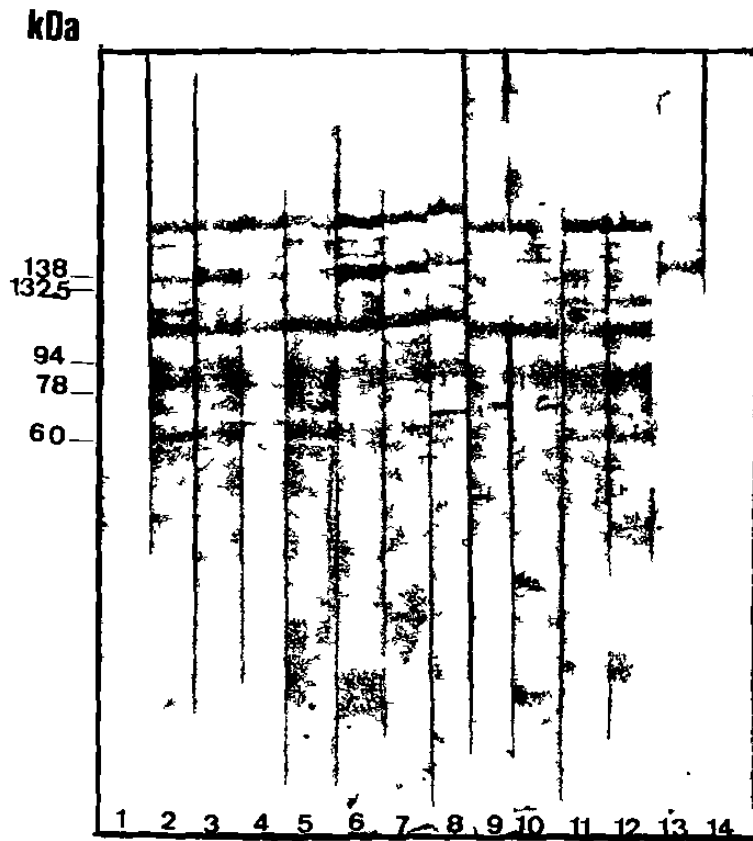


Figura 4. Inmunoelectrotransferencia de las proteínas del sobrenadante del cultivo de *P. aeruginosa* cepa PA-103 revelada con sueros de pacientes infectados. Carril 1: control positivo. Carriles 2 al 8: sueros de pacientes infectados. Carriles 9 al 13: sueros de personas sanas.

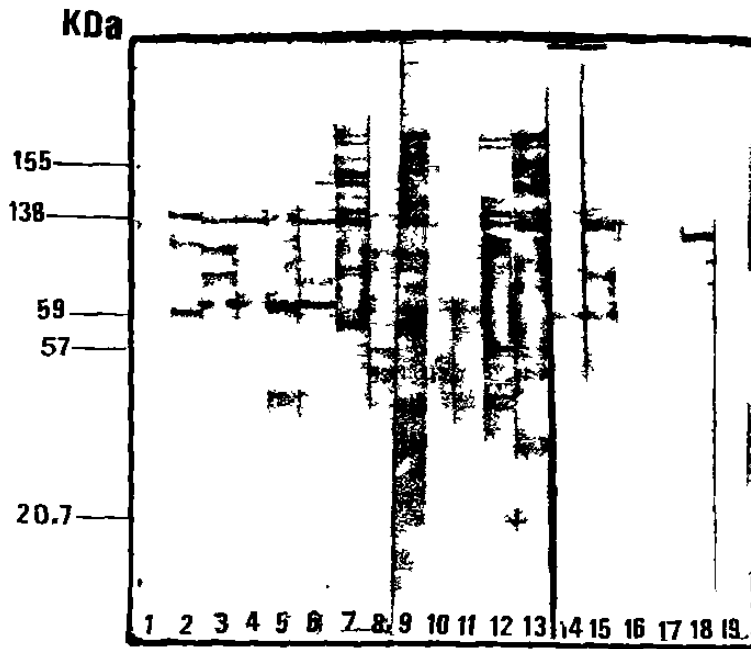


Figura 5. Inmunoelctrotransferencia de las proteínas del extracto del cultivo de *P. aeruginosa* de la cepa 7700 revelado con los sueros de pacientes infectados. Carril 1: Control positivo. Carriles 2 al 11: sueros de pacientes infectados. Carriles del 12 al 18: sueros de personas sanas.

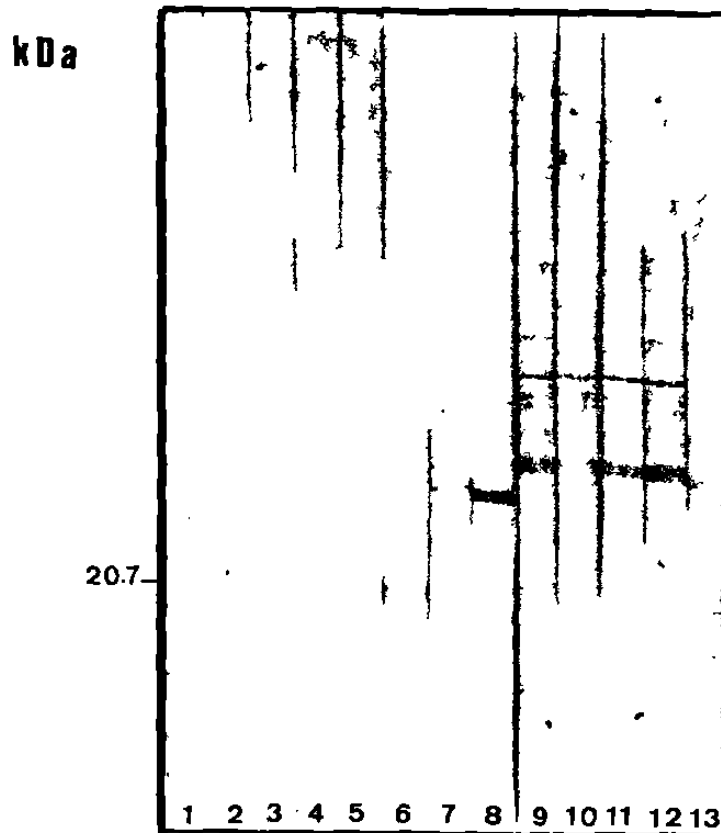


Figura 6. Inmunoelectrotransferencia de las proteínas del sobrenadante del cultivo de la cepa de P. aeruginosa 7700 reveladas con sueros de pacientes infectados. Carril 1: control positivo. Carriles 2 al 8: pacientes infectados. Carriles 9 al 12: sueros de personas sanas.

