

ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES CONTRA LAS ENZIMAS ELASTASA Y PROTEASA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN POBLACION NORMAL DE MARACAIBO

*Auramarina Villalobos de Roldán**
*Alfredo Villalobos Castellano**
*Maricela Urbina de Hernández**
*Lía Angarita***

RESUMEN

Se estudiaron 311 sujetos de ambos sexos, aparentemente sanos, a quienes se les determinó el título de anticuerpos dirigidos contra las enzimas elastasa y proteasa de *Pseudomonas aeruginosa*, siguiendo la técnica de hemaglutinación pasiva en microtitulación, encontrándose que todos ellos (100%) mostraron títulos por debajo de 1:80.

INTRODUCCION

Dada la alta incidencia de infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* sobre todo aquellas adquiridas dentro de los hospitales, las cuales día a día constituyen un problema de vital importancia (1,2,3,4,5,6,8,9,15,16,19,20,21), se han venido implementando una serie de estudios que nos permitan subsanar la complejidad cada

* Cátedra de Microbiología. Facultad de Medicina. L.U.Z.

** Unidad de Genética Médica. L.U.Z.

vez mayor que representa el control, prevención y tratamiento de este tipo de infecciones, por lo que se ha venido incrementando la investigación de la respuesta inmune, mediante diversas técnicas que nos permitan poner en evidencia en el suero de los pacientes, diferentes tipos de anticuerpos dirigidos contra los determinantes antigénicos que posee este germen en su estructura (7,23,24).

Por todos es conocido que este micro-organismo posee dos componentes en su pared celular, uno de naturaleza lipopolisacárida (LPS) y otro de naturaleza proteica (OEP) (3,17), pero además de estos dos componentes este micro-organismo produce enzimas elastasa y proteasa, las cuales juegan un papel muy importante en la patogénesis de las infecciones debidas a ellas (11,12,13,14,25). Además se ha demostrado que estas enzimas son también antigénicas y que por lo tanto son capaces de estimular una respuesta de anticuerpos en aquellos individuos infectados por cepas productoras de estas enzimas (11,12,13,14,25). pero para darle un valor diagnóstico a la determinación de estos anticuerpos, es necesario establecer previamente los valores normales encontrados en una población, ya que es ampliamente conocido la variación de los títulos con la edad, área geográfica de residencia de los individuos, etc.

Con este trabajo hemos querido aportar una contribución más en lo referente a la respuesta inmune en este tipo de infecciones, determinando previamente la frecuencia y títulos de anticuerpos hemaglutinantes dirigidos contra las enzimas elastasa y proteasa producidas por algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, en la población normal de Maracaibo, para así poder obtener conclusiones sobre si los títulos encontrados en un individuo infectado en un momento dado, sirven como una prueba más de ayuda diagnóstica en las infecciones causadas por éste micro-organismo.

MATERIALES Y METODOS

Se practicó un muestreo convencional en 311 sujetos de ambos sexos, aparentemente sanos, provenientes de estudiantes, personal docente, administrativo y obrero de la Facultad de Medicina de L.U.Z., Unidad Sanitaria de Maracaibo, Maternidad Castillo Plaza y Centros Materno Infantiles de la localidad.

Las edades oscilaron entre 0 y 75 y más años. Todos residentes en la ciudad de Maracaibo. En el momento de la toma de la muestra se les llenó una encuesta donde se interrogaron los siguientes datos: nombre, edad, sexo, procedencia y antecedentes de infecciones recientes.

Todos los recién nacidos fueron de edad gestacional y peso adecuado y no hubo en ellos antecedentes maternos de infecciones agudas y/o crónicas.

En los niños de 0 días, las muestras fueron tomadas de sangre del cordón, en el resto del grupo en estudio, las muestras fueron tomadas por venipuntura, coleccionándolas en tubos sin anticoagulantes. Los sueros obtenidos fueron guardados a - 20° C hasta el momento de ser procesados.

En todas las muestras de suero se determinó el título de anticuerpos dirigidos contra las enzimas elastasa y proteasa de *Pseudomonas aeruginosa*, siguiéndole la técnica de hemaglutinación pasiva por microtitulación, según las recomendaciones de Tomiyama y cols. (22).

Reactivos utilizados: El equipo o "Kit" comercial con los reactivos utilizados para la prueba de hemaglutinación fue obtenido por cortesía de los doctores J. Yuzuru Homma y Tetsuo Tomiyama del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Tokyo-Japón y el cual consta del siguiente material:

Células sensibilizadas: Consisten en glóbulos rojos de carnero tanicados y sensibilizados con elastasa y/o proteasa respectivamente.

Células no sensibilizadas: Consisten en glóbulos rojos de carnero tanicados.

Diluyente: Está constituido por amortiguador fosfato salino M/15, pH: 7,2 y el cual contiene 0,8% de suero normal de conejo, 2% de estroma de carnero y 1% de estroma bovino. Estos estromas actúan como agentes absorbentes de anticuerpos heterófilos en el suero del paciente, contra los eritrocitos de carnero.

Preparación de los sueros: Los sueros fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos, luego fueron diluidos 1:10, agregando 0,45 ml. del diluyente y 0,05 del suero. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante una noche, con la finalidad de efectuar la absorción.

Prueba de hemaglutinación: Se emplearon placas de microtitulación con hoyos en "U" donde se hicieron diluciones seriadas al doble de cada suero, comenzando con una dilución 1 = 80 hasta 1:5120, de acuerdo al protocolo que se presenta en la Tabla N° 1. Posteriormente las placas se incubaron a temperatura ambiente durante la noche, reportándose como título, el recíproco de la dilución hasta donde se observó aglutinación franca.

TABLA N° 1
PROTOCOLO PARA LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION

Hoyito N°	Diluyente (ml.)	Suero diluido al 1:10 (ml.)	Dilución del suero	Células sensibilizadas (ml.)	Células no sensibilizadas (ml.)	Dilución final del suero
1	0,0 5	0,025	1: 20		0,025	Control
2	0,025	0,025	1: 40	0,025		1: 80
3	0,025	0,025	1: 80	0,025		1: 160
4	0,025	0,025	1: 160	0,025		1: 320
5	0,025	0,025	1: 320	0,025		1: 640
6	0,025	0,025	1: 640	0,025		1: 1280
7	0,025	0,025	1: 1280	0,025		1: 2560
8	0,025	0,025	1: 2560	0,025		1: 5120

RESULTADOS

En la Tabla N° 1 se presenta el protocolo seguido para la prueba de hemaglutinación.

En el Cuadro N° 2 se presenta la distribución del número de muestras por edad y sexo.

CUADRO N° 2
NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS POR EDAD Y SEXO
MARACAIBO 1977-78

Edad	Número de Muestras		Total
	Varones	Hembras	
0 días	2	2	4
24 horas	—	1	1
36 horas	1	—	1
48 horas	1	1	2
96 horas	—	1	1
1 mes	1	—	1
4 meses	—	1	1
5 meses	1	—	1
6 meses	2	1	3
7 meses	—	1	1
8 meses	1	2	3
9 meses	1	—	1
11 meses	—	1	1
1 año	6	5	11
2 años	7	4	11
3 años	3	5	8
4 años	1	2	3
5 años	3	4	7
6 años	5	5	10
7 años	1	3	4
8 años	2	3	5
9 años	3	2	5
10 años	3	1	4
11 años	2	3	5
12 años	4	3	7
13 años	3	1	4
14 años	2	1	3

sigue...

CUADRO N° 2

NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS POR EDAD Y SEXO
MARACAIBO 1977-78

Edad	Número de Muestras		Total
	Varones	Hembras	
15 años	5	1	6
16 años	2	1	3
17 años	2	2	4
18 años	1	2	3
19 años	1	3	4
20 años	1	10	11
21 años	—	13	13
22 años	1	14	15
23 años	2	3	5
24 años	2	3	5
25 años	1	4	5
26 años	1	2	3
27 años	1	2	3
28 años	1	2	3
29 años	1	1	2
30 años	1	6	7
31 años	2	6	8
32 años	1	8	9
33 años	1	2	3
34 años	1	1	2
35 años	2	1	3
36 años	1	3	4
37 años	1	4	5
38 años	2	2	4
39 años	2	1	33
40 años	2	2	4
41 años	2	1	3
42 años	2	2	4

sigue...

CUADRO N° 2
 NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS POR EDAD Y SEXO
 MARACAIBO 1977-78

Edad	Número de Muestras		Total
	Varones	Hembras	
43 años	1	1	2
44 años	—	1	1
45 años	2	2	4
46 años	2	2	4
47 años	1	1	2
48 años	2	—	2
49 años	1	—	1
50 años	1	3	4
51 años	—	3	3
52 años	1	—	1
53 años	—	1	1
54 años	—	2	2
55 años	—	1	1
56 años	1	1	2
57 años	1	—	1
58 años	—	—	—
59 años	1	—	1
60 años	—	1	1
61 años	—	—	—
62 años	1	1	2
63 años	1	—	1
64 años	—	1	1
65 años	2	1	3
66 años	1	—	1
67 años	1	1	2
68 años	—	1	1

sigue...

CUADRO N° 2

NUMERO DE MUESTRAS ESTUDIADAS POR EDAD Y SEXO
MARACAIBO 1977-78

Edad	Número de Muestras		Total
	Varones	Hembras	
69 años	1	1	2
70 años	1	—	1
71 años	1	1	2
72 años	—	1	1
73 años	—	1	1
74 años	1	1	2
75 y + años	3	3	6
TOTAL:	124	187	311

F. de I.: Unidad Sanitaria de Maracaibo. Maternidad Castillo Plaza. Maracaibo. Centros Materno-Infantiles. Maracaibo. Facultad de Medicina. L.U.Z.

Dado que el número de muestras procesadas fue muy grande y por dificultarse en consecuencia el análisis de distribución, decidimos reunir las por grupos etáreos y sexo, lo cual se muestra en el Cuadro N° 3, donde además se hace el análisis porcentual de la última fila. En él podemos observar que en los varones, el mayor número y por tanto el mayor porcentaje (13,71%), se observó en el grupo de 1-4 años, siguiéndole en orden de frecuencia los de 5-9 y 10-14 años, con un 11,29% cada uno. En cuanto a las hembras el mayor porcentaje (22,99%) se observó en el grupo de 20-24 años, siguiéndole en orden de frecuencia el de 30-34 años con un 12,29%, 5-9 con un 0,09% y el de 1-4 con un 8,56%. En líneas generales el mayor porcentaje de muestras estudiadas estuvo comprendido en los grupos de 20-24 años con un 15,76%, siguiéndole en orden de frecuencia el de 1-4 con un 10,61% y el de 5-9 con un 9,97%.

En el Cuadro N° 4 presentamos los títulos de anticuerpos observados por los 311 pacientes estudiados tanto para elastasa como para proteasa, observándose que todos ellos (100%) mostraron títulos por debajo de 1:80.

CUADRO N° 3
DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS
POR GRUPOS ETARIOS Y SEXO
MARACAIBO 1977-78

Grupos Etarios	Muestras				Total %	
	Varones	%	Hembras	%		
— 1 año	10	8,07	11	5,88	21	6,75
1 - 4 años	17	13,71	16	8,56	33	19,61
5 - 9 años	14	11,29	17	9,09	31	9,97
10 - 14 años	14	11,29	9	4,82	23	7,39
15 - 19 años	11	8,87	9	4,82	20	6,43
20 - 24 años	6	4,84	43	22,99	49	15,76
25 - 29 años	5	4,03	11	5,88	16	5,15
30 - 34 años	6	4,84	23	12,29	29	9,32
35 - 39 años	8	6,45	11	5,88	19	6,11
40 - 44 años	7	5,65	7	3,75	14	4,50
45 - 49 años	8	6,45	5	2,67	13	4,18
50 - 54 años	2	1,61	9	4,82	11	3,54
55 - 59 años	3	2,42	2	1,07	5	1,61
60 - 64 años	2	1,61	3	1,60	5	1,61
65 - 69 años	5	4,03	4	2,14	9	2,89
70 - 74 años	3	2,42	4	2,14	7	2,25
75 y + años	3	2,42	3	1,60	6	1,93
TOTAL	124	100,00	187	100,00	311	100,00

F. de I.: Unidad Sanitaria de Maracaibo. Maternidad Castillo Plaza. Maracaibo. Centros Materno-Infantiles. Maracaibo. Facultad de Medicina L.U.Z.

CUADRO N° 4
PSEUDOMONAS AERUGINOSA
TITULOS DE ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES VS. ELASTASA
Y PROTEASA EN 311 SUJETOS APARENTEMENTE SANOS
MARACAIBO 1980 - 1983

Anticuerpos Vs.	Reciproco del Título	Numero de Muestras	Porcentaje
Elastasa	1: 80	311	100,00
Prote	1: 80	311	100,00

F. de I.: Unidad Sanitaria de Maracaibo. Maternidad Castillo Plaza. Maracaibo. Centros Materno-Infantiles. Maracaibo. Facultad de Medicina. L.U.Z.

DISCUSION

Debido al auge que día a día toman las pruebas serológicas como ayuda diagnóstica en ciertas entidades clínicas y al hecho de que ya en nuestro medio se han venido realizando estudios sobre la respuesta de anticuerpos a diferentes antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*, quisimos aportar una contribución más a estos estudios, determinando la frecuencia y títulos de anticuerpos hemaglutinantes dirigidos contra las enzimas elastasa y proteasa producidas por algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en la población normal de Maracaibo, a fin de obtener conclusiones sobre si los títulos encontrados en un individuo infectado por este micro-organismo en un momento dado, sirven como una prueba más de ayuda diagnóstica, en tales casos, sobre todo si tomamos en cuenta la frecuencia cada vez más alta de infecciones causadas por este germen.

Este tipo de investigación debe ser apoyada por una buena selección de la muestra, incluyendo solamente aquellos individuos que no habían sufrido infecciones recientes por el germen investigado, criterio seguido por nosotros en este trabajo.

Consideramos que nuestros resultados son similares a los de Hiromatsu y cols. (10), es decir que el 100% de las muestras presentaron títulos por debajo de 1:80, sólo que a diferencia de ellos, nosotros no observamos diferencia de los títulos con respecto a la edad.

La técnica utilizada en este trabajo en un método sencillo para la determinación y cuantificación de anticuerpos, así como de gran especificidad, fácil de realizar y sobre todo permite el procesamiento de gran número de muestras en corto tiempo.

Pensamos que con el conocimiento de estos resultados, estamos en capacidad de valorar mejor esta prueba en el diagnóstico de las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* en nuestro medio, sobre todo si tomamos en cuenta que no sólo contamos con otra prueba que nos ayuda en el diagnóstico de infecciones causadas por este germen, sino que nos permite conocer si la cepa infectante es productora o no de estas enzimas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 AYLIFFE, G., LOWBURY, E., HAMILTON, J., SMALL, J., ASHEHOV, E.: PARKER, M.: Hospital infection with *Pseudomonas aeruginosa* in neurosurgery. *The Lancet*. 2: 365-368, 1965.
- 2 BENNETT, J.: Nosocomial infections due to *Pseudomonas*. *The Journal Infection Diseases*. 130:24-S7, 1974.
- 3 CHESTER, I., GRAG, G., WILKINSON, S.: Further studies of the chemical composition of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*. 126:398, 1972.

- 4 DREWETT, S., PAYNE, J., TUKE, W., VERDON, P.: Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* infection from a special case nursery. *The Lancet*. 1:946-948, 1972.
- 5 FOERER, K.; TAYLOR, P., GEZON, H.: *Pseudomonas aeruginosa* epidemic traced to delivery-room resuscitators. *New England Journal of Medicine*. 276:991-996, 1967.
- 6 FINLAND, M., JONES, W., BARNES, M.: Occurrence of serious bacterial infections since introduction of antibacterial agents, *The Journal of the American Medical Association*. 170: 2188-2190, 1959.
- 7 FUENMAYOR-CORVAIA, I., VILLALOBOS-ROLDAN, A., LLERAS-TORRES, A., VILLALOBOS, A.: Anticuerpos hemaglutinantes para la fracción lipopolisacárida de *Pseudomonas aeruginosa*. Frecuencia y títulos en población normal de Maracaibo. *Revista de la Facultad de Medicina*. 9:42-47, 1977.
- 8 GARDNER, P., GRIFFING, A., SHARTZ, M., KUNZ, L.: Nonfermentative Gram-negative bacilli of nosocomial interest. *The American Journal of Medicine*. 48:735-749, 1970.
- 9 GRIEBLE, H. ROSEMARY, E., BIRD, T., TOIGO, A., GRIFFITH, L.: Fine-particle humidifiers. Source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a respiratory-disease unit. *New England Journal of Medicine*. 282:531-535, 1970.
- 10 HISOMATSU, K., YASUSHI, K., TADAFREMI, N., TOSHIO, T.: OEP, Protease and elastase antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in healthy children and in patients with *Pseudomonas* infections. Proceeding of the 11th meeting, of the Japan *Pseudomonas aeruginosa* Society. Tokyo-Japan, 1977, pp. 5.
- 11 KAWAHARAJO, K., ABE, Ch., HOMMA, Y., YAWANO, M., GOTOH, E., TAMAKA, N., MORIHARA, K.: Corneal ulcers caused by Proteasa and elastasa from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Japanese Journal Experimental Medicine*. 44:435-442, 1974.
- 12 KAWAHARAJO, K., HOMMA, Y., AOYAMA, Y., MORIHARA, K.: In vivo studies on protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. *The Japanese Journal Experimental Medicine*. 45:89-100, 1975.
- 13 KAWAHARAJO, K., HOMMA Y., AOYAMA, Y., OKADA, K., MORIHARA, K.: Effects of proteasa and elastasa from *Pseudomonas aeruginosa* on skin. *The Japanese Journal Experimental Medicine*. 45:79-88, 1975.
- 14 MORIHARA, K.: Production of elastase and protease by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 88:745-757, 1964.
- 15 PASETTO, D., PECHMANN, C., SCRASSOLO, A., BRUNO, B.: Nursery out-break of severs diarrhoeae due to multiple strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet*. 2:38-40, 1972.
- 16 PRUITT, B.: Infections caused by *Pseudomonas* species in patient with burns and in other surgical patients. *The Journal Infections Diseases*. 130:S8-S13, 1974.
- 17 SADOFF, J.: Cell wall structures of *Pseudomonas aeruginosa* with immunologic significance: A brief review. *The Journal Infections Diseases*. 130:S61-S64, 1974.
- 18 SCHIMPF, S., GREENE, W., YOUNG, V., WIERMCK, P.: Significance of *Pseudomonas aeruginosa* in the patient with leukemia or lymphoma. *The Journal Infections Diseases*. 130:S24-S31, 1974.
- 19 SUTTER, V., HURST, V.: Sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in burns: Study of wound and rectal cultures with phage typing. *Annals of Surgery*. 163:587-602, 1966.
- 20 TAPPER, M., ARMSTRONG, D.: Bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* complicating neoplastic disease: A progress report. *The Journal Infections Diseases*. 130:S14-S23, 1974.
- 21 TINNE, J., GORDON, A., BRAIN, W., MACKEY, W.: Cross-infection by *Pseudomonas aeruginosa* as a hazard of intensive surgery. *British Medical Journal*. 4:313-315, 1967.

22 TOMIYAMA T., HOMMA, Y., ABE, CH., YOICHI, M.: Pasive hemagglutination reaction using formalinized shepp erithrocytes treated with tannin and coated with protein moiety of the endotoxin (OEP) of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Japanese Journal of Experimental Medicine*. 43:185-189, 1973.

23 VILLALOBOS, A., VILLALOBOS-ROLDAN, A., ANGARITA, L.: Anticuerpos hemaglutinantes contra la fracción protéica (OEP) de la endotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*. Frecuencia y títulos en población normal de Maracaibo. *Kasmera*. 9:22-27, 1981.

24 VILLALOBOS-ROLDAN, A., VILLALOBOS, A., ANGARITA, L., VILLASMIL, D., CASTAÑEDA, S.: Títulos de anticuerpos hemaglutinantes contra la fracción protéica (OEP) de la endotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con cultivos positivos a este germen. *Kasmera*. 9:29-47, 1981.

25 WRETLIND, B., HEDEN, L., SJOBERG, L., WADSTROM, T.: Production of enzymes and toxins by hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to serotype and phage-typing patern. *The Journal Medical Microbiology*. 6:91-98, 1973.