

**TITULOS DE ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES
CONTRA LA FRACCION LIPOPOLISACARIDA (LPS)
DE LA ENDOTOXINA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA
EN PACIENTES CON CULTIVOS POSITIVOS
A ESTE GERMEN**

**HEMAGGLUTINATIVE ANTIBODY TITERS VS
LIPOPOLISACHARIDE FRACTION OF PSEUDOMONAS
AERUGINOSA ENDOTOXINE IN PATIENTS WITH POSITIVE
CULTURE TO THIS GERM.**

*A. Villalobos de Roldán**
*Y. González de Pirela***
*M. Urbina López**

RESUMEN

Se estudiaron 45 pacientes, a quienes se les aisló *Pseudomonas aeruginosa* en diversas muestras clínicas, sin evaluarse en la mayoría de ellos su asociación con contaminación, colonización o infección clínicamente significativa. A todos ellos se les determinó los títulos de anticuerpos vs lipopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue obtenido a partir de la cepa aislada a cada uno de ellos, observándose que

Recibido 21-05-92

Received 21-05-92

Aceptado 21-10-92

Accepted 21-10-92

- * Profesora Titular – Cátedra de Microbiología. Escuela de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo – Venezuela.
- ** Prof. Asociada - Cátedra de Microbiología e Inmunología General. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo - Venezuela.

el 51.11% mostraron títulos por debajo de 1:80 en la primera muestra, de éstos 19 (82.7%) elevaron sus títulos en la segunda muestra, mientras que los 4 restantes (17.3%), mantuvieron estables sus títulos en dicha muestra. En el 48.89% encontramos títulos por encima de 1:80 en la primera muestra. De éstos 6 (27.2%) bajaron sus títulos en la segunda muestra, 14 (27.2%) los elevaron y 2 (9.10%) los mantuvieron estables. Sólo encontramos 4 pacientes (8.89%) a quienes no fue posible detectar anticuerpos en ninguna de las 2 muestras estudiadas y en todos ellos la cepa fue aislada de orina.

PALABRAS CLAVES: Pseudomonas. Anticuerpos hemaglutinantes. Fracción polisacárida.

ABSTRACT

45 patients were studied, *Pseudomonas aeruginosa* of several clinical samples were isolated without evaluation in the majority of them of its association with contamination, colonization or infection clinically significant. Antibody titers were determined in all of them vs lipopolisaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* which was obtained from the isolated strain on each one of them, observing that 51.11% showed titers under 1:80 on first, from this 19 (82.7%) elevated its titers in the sample. At the 48.88% we found titers above 1:80 in the first sample. From these 6 (27.2%) descended its titers in the second sample, 14 (27.2%) were elevated and 2 (9.10%) supported stable. We only found 4 patients (8.89%) in whom was impossible to detect antibodies on any of the two samples and on all of them the strain was isolated from urine.

KEY WORDS: Pseudomonas. Hemaglutinative antibody. Lipopolisaccharide fraction

INTRODUCCION

En los últimos años, se han incrementado los esfuerzos para conocer mejor los aspectos epidemiológicos y serológicos de las infecciones

causadas por *Pseudomonas aeruginosa*,^{3, 4, 5, 10, 11, 13, 17, 18, 26, 27, 30, 32, 35, 36, 38, 40, 41, 42, 43, 44} sobre todo si tomamos en cuenta la alta incidencia de ellas en el ambiente hospitalario.^{1, 2, 9, 11, 12, 16, 19, 29, 31, 34, 35, 37, 39}

Por todos es conocido que este microorganismo produce una endotoxina, que está formada por un complejo proteico-lipopolisacárido, es decir, está formada por dos fracciones: una proteica (OEP) y una lipopolisacárida (LPS), constituyendo la primera un antígeno común protector contra infecciones causadas por cualquier serotipo, mientras que la segunda, solamente protege en infecciones ocasionadas por el mismo serotipo.^{6, 21, 22, 23, 33}

Hoy en día una de las técnicas más utilizadas para determinar y cuantificar los anticuerpos dirigidos contra cualquiera de las dos fracciones de la endotoxina, es la hemaglutinación pasiva.

Debido a que ya en nuestro medio se han realizado estudios para conocer la frecuencia y títulos de anticuerpos hemaglutinantes dirigidos contra la fracción lipopolisacárida de *Pseudomonas aeruginosa* en la población normal,¹⁴ se quiso determinar las variaciones de éstos en pacientes a quienes se les aisló esta bacteria, a partir de diversas muestras clínicas.

MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron 45 pacientes, a quienes se les determinó la presencia y títulos de anticuerpos dirigidos contra la fracción lipopolisacárida (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa*, siguiendo la siguiente metodología:

A todos los 45 pacientes se les tomó dos muestras de sangre por venipuntura, colectándose éstas en tubos sin anticoagulante. Los sueros obtenidos fueron guardados a -20°C hasta el momento de ser procesados. De las dos muestras, una se tomó el mismo día en que la Sección de Bacteriología del Hospital reportó el aislamiento del germen, otra, 7-10 días después de la primera.

En todas las muestras de suero se determinó la presencia y títulos de anticuerpos dirigidos contra la fracción lipopolisacárida (LPS) de la endotoxina de *Pseudomonas aeruginosa*, siguiéndole la técnica de

hemaglutinación en tubos,^{8, 14, 15, 24, 25, 28} utilizando como antígeno el LPS obtenido por nosotros a partir de la cepa aislada a cada paciente.

A partir del suero inactivado por calentamiento a 56°C por 30 minutos, se realizaron diluciones crecientes del mismo con módulo 2X, comenzando con una dilución 1:10 hasta una dilución 1:2560, en un volumen total de 0.5 ml. Luego se le adicionó 0.05 ml de la suspensión al 2% de glóbulos rojos sensibilizados con el LPS y se incubaron a 37°C durante 30 minutos en baño de María. Al cabo de este tiempo, se centrifugaron a 1500 rpm durante tres minutos. El criterio de lectura fue el siguiente:

positivos, aquellos tubos donde se apreció una aglutinación completa (++++ ó +++) con una capa de glóbulos rojos y un sobrenadante claro; y

negativos, aquéllos donde el líquido quedó claro con los glóbulos rojos en el fondo del tubo formando un botón compacto.

La lectura del título se hizo tomando como tal, el recíproco de la mayor dilución del suero que fue capaz de dar aglutinación franca.

RESULTADOS

En la Tabla N° 1, aparecen los diferentes tipos de muestras clínicas a partir de las cuales fue aislada *Pseudomonas aeruginosa* en los 45 pacientes objeto de este estudio, observándose que en el mayor número y por tanto en el mayor porcentaje, ésta fue aislada a partir de heridas con un 33.34% y orinas con un 20%, siguiéndole en orden de frecuencia: secreción de úlceras con un 11.12%, abscesos con un 13.33%, gleras 6.67%, escaras 4.44%, exudado faríngeo, líquido peritoneal, esputo, secreción uretral y vaginal con un 2.22% cada una.

En la Tabla N° 2, se muestra la distribución de los títulos de anticuerpos vs la fracción lipopolisacárida de *Pseudomonas aeruginosa* en dos muestras seriadas de suero de 45 pacientes, a quienes se les aisló dicho germen; en ella observamos que en la primera muestra, 4

de ellos (8.89%) mostraron títulos por debajo de 1:10; 3 (6.67%) 1:40; 16 (35.56%) 1:80; 14 (31.11%) 1:160; 6 (13.33%) 1:320 y 2 (4.44%) 1:640. En la segunda muestra, 4 (8.89%) mostraron títulos por debajo de 1:10; 2 (4.44%) 1:80; 16 (35.56%) 1:160; 17 (37.78%) 1:320 y 6 (13.33%) 1:640.

En la Tabla N° 3, se muestran los títulos de anticuerpos hemaglutinantes vs la fracción lipopolisacárida de *Pseudomonas aeruginosa* en dos muestras de suero de 45 pacientes a quienes se les aisló este microorganismo. En ella podemos observar, que 23 de los

TABLA N° 1
Pseudomonas aeruginosa
SITIOS DE AISLAMIENTO. ANALISIS PORCENTUAL
Maracaibo 1980-1989

TIPO DE MUESTRA	Nº	%
Heridas	15	33.34
Orinas	9	20.00
Secreción Ulceras	5	11.12
Abscesos	6	13.33
Gleras	3	6.67
Escaras	2	4.44
Exudado Faríngeo	1	2.22
Líquido Peritoneal	1	2.22
Espujo	1	2.22
Secreción Uretral	1	2.22
Secreción Vaginal	1	2.22
TOTALES:	45	100.00

FUENTE: Hospital Central "Dr. Urquinaona".

pacientes estudiados, mostraron títulos por debajo de 1:80 en la primera muestra y de éstos 4, eran menores de 1:10. De estos 23 pacientes, 19 elevaron sus títulos en la segunda muestra, mientras que los 4 restantes mantuvieron estables sus títulos.

En los 22 pacientes restantes, se observaron títulos por encima de 1:80 en la primera muestra, de éstos, 14 los elevaron en la segunda muestra, 6 los bajaron y 2 los mantuvieron estables.

Los 4 pacientes con títulos inferiores a 10 en la primera muestra, los conservaron iguales en la segunda.

TABLA N° 2
Pseudomonas aeruginosa
DISTRIBUCION DE TITULOS DE ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES
vs LA FRACCION LPS, EN DOS MUESTRAS SERIADAS DE
PACIENTES CON CULTIVOS POSITIVOS A ESTE GERMEN
ANALISIS PORCENTUAL

Maracaibo 1980-1989

RECIPROCO DEL TITULO		MUESTRAS					
		PRIMERA		SEGUNDA		TOTAL	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
< 10	4	8.89	4	8.89	8	8.89	
10	-	-	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	-	-	
40	3	6.67	-	-	3	3.33	
80	16	35.56	2	4.44	18	20.00	
160	14	31.11	16	35.56	30	33.33	
320	6	13.33	17	37.78	23	25.56	
640	2	4.44	6	13.33	8	8.89	
TOTALES:	45	100.00	45	100.00	90	100.00	

FUENTE: Hospital Central "Dr. Urquinaona".

TABLA Nº 3
Pseudomonas aeruginosa
TITULOS DE ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES vs LA FRACCION
LPS, EN MUESTRAS SERIADAS DE CUARENTA Y CINCO
PACIENTES CON CULTIVO POSITIVO A ESTE GERMEN
Maracaibo 1980 - 1989

PACIENTE	RECIPROCO DEL TITULO	
	1a. MUESTRA	2a. MUESTRA
1	160	160
2	160	640
3	320	160
4	< 10	< 10
5	160	320
6	80	160
7	80	160
8	80	160
9	< 10	< 10
10	80	320
11	320	160
12	640	320
13	40	160
14	160	160
15	160	320
16	80	160
17	80	160
18	160	320
19	160	320
20	320	640
21	80	160
22	80	160
23	< 10	< 10
24	80	160
25	160	640
26	80	320
27	160	320
28	320	160
29	40	80
30	80	320
31	80	320
32	640	320
33	80	320
34	< 10	< 10
35	80	160
36	320	640
37	160	320
38	160	320
39	80	160
40	80	320
41	320	640
42	40	80
43	160	320
44	160	320
45	160	640

FUENTE: Hospital Central "Dr. Urquinaona".

DISCUSION

Dada la frecuencia con que se presentan las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* en nuestro medio, sobre todo en pacientes hospitalizados, al auge que hoy en día han tomado las pruebas serológicas como ayuda diagnóstica en ciertas entidades clínicas, y a que ya en nuestro medio se habían determinado la frecuencia y títulos de anticuerpos hemaglutinantes dirigidos contra la fracción lipopolisacárida de *Pseudomonas aeruginosa* en población normal,¹⁴ nos decidimos a estudiar este mismo aspecto en un grupo de pacientes a quienes se les aisló, aun cuando en la mayoría de ellos no se evaluó su asociación con contaminación, colonización o infección clínicamente significativa.

Al comparar nuestros resultados con los de Fuenmayor-Corvaia y cols,¹⁴ encontrados en nuestra población normal, observamos que en las primeras muestras, el 51.11% mostró títulos por debajo de 1:80, lo que coincide con los encontrados por dichos autores en la población por ellos estudiada, de estos pacientes 19 (82.7%) elevaron sus títulos en la segunda muestra, mientras que los 4 restantes (17.3%) mantuvieron estables sus títulos en dicha muestra. En el 48.89% encontramos títulos por encima de 1:80 en la primera muestra de estos 6 (27.2%) bajaron sus títulos en la segunda muestra, 14 (27.2%) los elevaron y 2 (9.10%) los mantuvieron estables.

El haber encontrado títulos mayores de 1:80 en la primera muestra, nos hace pensar en que el paciente pudiera haber tenido en semanas anteriores una infección clínica o subclínica que no fue reportada en la historia clínica y que en este caso, la respuesta observada fue de tipo anamnésica, o bien que el paciente tuviera 1 ó más semanas con la infección, por tanto la muestra fue tomada tardíamente.

En cuatro de los casos estudiados (8.89%) no fue posible detectar anticuerpos en ninguna de las muestras analizadas, al investigar la procedencia del aislamiento de las cepas nos encontramos que todos ellos correspondían a bacteriurias significativas, por lo que suponemos que esta falta de respuesta inmune podría ser debida a

infecciones del tracto urinario bajo; estos hallazgos son similares a los encontrados por Crowder y cols⁷ y por Gutiérrez y cols,²⁰ quienes sólo encontraron títulos significativamente elevados en aquellos casos de infección urinaria con afectación renal (pielonefritis), por lo que nosotros, al igual que ellos nos atrevemos a decir que la utilización de esta técnica inmunoserológica constituye un método diagnóstico indirecto que permite establecer con bastante exactitud la localización de la infección urinaria, lo cual sería de especial interés en los casos en que por otros métodos analíticos o radiológicos no podemos establecer dicha localización.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AYLIFFE, C.; LOWBURY, A.; HAMILTON, J.; SMALL, J.; ASHEHOV, E.; PARKER, M. Hospital Infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Neurosurgery. **Lancet.** 2: 365-368, 1965.
2. BENNETT, J. Nosocomial Infections due to *Pseudomonas*. **J. Infect. Dis.** 130: 54-57, 1974.
3. BERGAN, T. Epidemiological Markers for *Pseudomonas aeruginosa* 1-Serogrouping Pyocine Typing and their Inter Relations. **Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B**, 81: 70-80, 1973.
4. BERGAN, T.; HORBY, N. Epidemiological Markers for *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B**. 83: 553-560, 1975.
5. BERGAN, T.; GYLLEMBERG, H. Epidemiological Markers for *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B**. 83: 257-274, 1975.
6. CHESTER, L.; GRAG, G.; WILKINSON, S. Further Studies of the Chemical Composition of the Lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochem. J.** 126: 395-398, 1972.
7. CROWDER, J.; WHITE, A. A Serological Response in Human *Pseudomonas* Infection. **J. Lab. Clin. Med.** 75: 128-136, 1970.
8. DIAZ, F.; NETER, E. *Pseudomonas aeruginosa*: Serogroups and Antibody Response in Patients with Neoplastic Diseases. **Amer. J. Med. Sci.** 259: 340-345, 1970.
9. DREWETT, S.; PAYNE, J.; TUKE, W.; VERDON, P. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Infection from a Special Case Nursery. **Lancet.** 1: 946-948, 1972.
10. FARMER III, J.; HERMAN, L. Epidemiological Finger-printing of *Pseudomonas aeruginosa* by Production of and Sensitivity to Pyocin and Bacteriophage. **Appl. Microbiol.** 18: 760-764, 1969.

11. FIERER, J.; TAYLOR, P.; GEZON, H. *Pseudomonas aeruginosa* Epidemic Traced to Delivery-Room Resuscitators. **New Eng. J. Med.** 276: 991-996, 1967.
12. FINLAND, M.; JONES, W.; BARNES, M. Occurrence of serious Bacterial Infections since Introduction of Antibacterial Agents. **J.A.M.A.**, 170: 2188-2190, 1959.
13. FISHER, M. Development of Immunotherapy for Infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Infect. Dis.** 130: S149-S151, 1974.
14. 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. **Rev. Fac. Med. (Maracaibo)** 9: 42-47, 1977.
15. GAINER, S.; LANDY, M. Prevalence of Antibody to *Pseudomonas* in Normal Human Sera. **J. Bacteriol.** 69: 628-633, 1955.
16. GARDNER, P.; GRIFFING, A.; SHARTZ, M.; KUNZ, L. Nonfermentative Gram-negative Bacilli of Nosocomial Interest. **Amer. J. Med.** 48: 735-749, 1970.
17. GILLIES, R.; GOVAN, J. Typing of *Pseudomonas pyocinea* by Pyocine Production. **J. Pathol. Bacteriol.** 91: 339-345, 1966.
18. GRABER, Ch.; LATTA, A.; VOGEL, E.; BRAME, R. Bacteriophage Grouping of *Pseudomonas aeruginosa* with Special Emphasis on Lysotypes occurring in Infected Burns. **Amer. J. Clin. Pathol.** 37: 54-62, 1962.
19. GRIEBLE, H.; ROSEMARY, F.; BIRD, T.; TOIGO, A.; GRIFFITH, L. Fine-Particle Humidifiers. Source of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in a Respiratory-Disease Unit. **New Eng. J. Med.** 282: 531-535, 1970.
20. GUTIERREZ, M.; SORIANO, F.; HERNANDO, L.; ALES, M.; JIMENEZ, F. Valor Clínico de la Determinación de Anticuerpos Homólogos Antibacterianos en el Diagnóstico de Localización y en el Pronóstico de Infecciones Urinarias. En: REIMEIN, A.; ARIAS, J.; CATELL, A.; CIFUENTES, W.; HERNANDO, L.; KUNIN, L.; LOPEZ, C.; O' GRADY, E.; RECASENS, F.; SENECA, E.; NAVANETTE, H. eds. **Aspectos Inmunológicos**. Barcelona-España, Salvat, 1974, p. 45-51.
21. HOMMA, J. Recent Investigation on *Pseudomonas aeruginosa*. **Jap. J. Exp. Med.** 41: 387-400, 1971.
22. HOMMA, J. *Pseudomonas aeruginosa* Infection and its trend in the Future. **Jap. J. Bacteriol.** 27: 629-640, 1972.
23. HOMMA, J.; ABE, C.; OKADA, K.; TANAMOTO, K.; HIRAO, Y. The Biological Properties of the Protein Moiety of Endotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. **Animal Plant and Microbial Toxins.** 1: 499-508, 1976.
24. LANDY, M. On Hemmagglutination Procedures utilizing Isolated Polysaccharide and Protein Antigens. **Amer. J. Pub. Health.** 44: 1059-1064, 1954.
25. LANDY, M.; LAMB, E. Estimation of Vi Antibody employing Erythrocytes treated with Purified Vi Antigen. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 82: 593-598, 1953.

26. LUGO, L.; VILLALOBOS, A. Presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en Materiales y Ambientes del Hospital Universitario de Maracaibo. *Rev. Fac. Med. Maracaibo*, 9 (1-4): 35-40, 1977.
27. MUSHIN, R.; TAGG, J. Pyocine typing as an Epidemiological Marker in *Pseudomonas aeruginosa* in Cattle. *J. Hyg. (London)* 69: 171-174, 1971.
28. NETER, E.; WETHPHAL, O.; LUDERITZ, O.; GORZYNSKI, E. The Bacterial Hemagglutination Test for the Demonstration of Antibodies to Enterobacteriaceae. *Ann. Acad. Sci.* 66: 141, 1956.
29. PASETTO, D.; PECHMANN, C.; SCRASSOLO, A.; BRUNO, B. Nursery out-break of Severe Diarrhoeae due to Multiple Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2: 38-40, 1972.
30. PAZ, E.; VILLALOBOS, A.; LUGO, L.; VILLASMIL, M. Pyocinotipia de *Pseudomonas aeruginosa* en un Hospital General de la localidad. *Kasmera*, 5: 229-249, 1976.
31. PRUITT, B. Infections caused by *Pseudomonas* Species in Patients with Burns and in other Surgical Patients. *J. Infect. Dis.* 130: S8-S13, 1974.
32. ROSE, H.; BABCOCK, J.; HECJMAN, M. Subtyping of Pyocin Type 1 *Pseudomonas aeruginosa* One Year of Experience. *App. Microbiol.* 22: 475, 1975.
33. SADOFF, J. Cell Wall Structures of *Pseudomonas aeruginosa* with Immunologic Significance: A Brief Review. *J. Infect. Dis.* 130: S61-S64, 1974.
34. SCHIMPF, S.; GREENE, W.; YOUNG, V.; WIERMCK, P. Significance of *Pseudomonas aeruginosa* in the Patient with Leukemia or Lymphoma. *J. Infect. Dis.* 130: S24-S31, 1974.
35. SUTTER, V.; HAST, V. Sources of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Burns: Study of Wound and Rectal Culture with Phage Typing. *Ann Surg.* 163: 587-602, 1966.
36. SUTTER, V.; VALERIE, H.; FENNELL, J. A Standardized System for Phage Typing *Pseudomonas aeruginosa*. *Health Lab. Sci.* 2: 7-16, 1965.
37. TAPPER, M.; ARMSTRONG, D. Bacteremia due to *Pseudomonas aeruginosa* Complicating Neoplastic Disease. A Progress Report. *J. Infect. Dis.* 130: S14-S23, 1974.
38. THOMAS, E.; JONES, L.; SIMAO, E.; SOLE-VERMIN, C.; FARMER III, J. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in a General Hospital: A Four Year Study. *J. Clin. Microbiol.* 2: 397-402, 1975.
39. TINNE, J.; GORDON, A.; BRAIN, W.; MACKEV, W. Cross-Infection by *Pseudomonas aeruginosa* as a Hazard of Intensive Surgery. *Brit. Med. J.* 4: 313-315, 1967.
40. VILLALOBOS, A.; VILLALOBOS-ROLDAN, A. La Pyocinotipia de *Pseudomonas aeruginosa* en Nuestro Medio. *Rev. Fac. Med. (Maracaibo)*, 6: 97-107, 1973.
41. VILLALOBOS, A.; VILLALOBOS-ROLDAN, A.; VILLASMIL, M.; URBINA-HERNANDEZ, M.; FUENMAYOR-CORVAIA, I.; PAZ, E.; SERRANO,

B.; LLERAS-TORRES, A. *Pseudomonas aeruginosa*. Aspectos Bacteriológicos y Serológicos. *Rev. Fac. Med. (Maracaibo)*, 9: 71-90, 1977.

42. YOUNG, L. Role of Antibody in Infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 130: S111-S118, 1974.

43. YOUNG, L.; YU, B.; ARMSTRONG, D. Agar-Gel Precipitating Antibody in *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Infect. Imm.* 2: 495-503, 1970.

44. ZIERD, Ch.; SCHMIDT, P.: Disociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 87: 1003-1010, 1964.