

TESIS EN OPCIÓN AL TÍTULO DE

MASTER
EN
BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

Título: Ensayo de obtención de un Preparado de Inmunoglobulinas anti *Pseudomonas aeruginosa* y eficacia en ratón Balb/c.

Autor: Lic. Juan F. Almenares Verdecia

Tutores: Dr. Juan Ayala Serrano
MSc. Aniel Moya Torres

Asesor: Lic. Armando Cádiz Lahenz

RESUMEN.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista ubicado entre los tres primeros agentes causantes de sepsis en los diferentes servicios de alto riesgo. No existe un fármaco totalmente efectivo ni vacuna disponible, por lo cual es de suma importancia contar con un preparado que solo o combinado contribuya a eliminar la infección causada por este germen. En este sentido el presente trabajo estuvo dirigido a obtener y evaluar en ratones Balb/c un preparado de inmunoglobulinas anti *Pseudomonas aeruginosa*. Se demostró que los sueros de donantes de Bancos de Sangre reconocieron, a través de un Dot blot, el LPS de *Pseudomonas aeruginosa* serotipo O11 (91 de 104 muestras de sueros analizados). Mediante el fraccionamiento alcohólico de Cohn se obtuvo una inmunoglobulina de pureza electroforética aceptable y rendimiento de **6,525 g/L**, cuya actividad biológica se comprobó en un Western blot al enfrentarlo al antígeno lipopolisacárido. Se observó un 91,66 % de supervivencia en los ratones retados con elevadas dosis del microorganismo y tratados con el preparado de inmunoglobulinas, lo que evidencia su efecto protector *in vivo* contra *Pseudomonas aeruginosa*. Se demostró experimentalmente la existencia de reacciones cruzadas de varios serotipos con el O11, así como la posibilidad de aprovechar éstas en la inmunoterapia.

ABSTRACT.

Pseudomonas aeruginosa is a opportunist pathogen located among the first three causing agents of sepsis in the different services of high risk. It doesn't exist a completely effective medication neither available vaccine, reason why it is of supreme importance to have a preparation that alone or cocktail contributes to eliminate the infection caused by this germ. In this sense the present work was directed to obtain and to evaluate in mice Balb/c a preparation of immunoglobulins against *Pseudomonas aeruginosa*. It was demonstrated that the serums of donors of Banks of Blood recognized, through a Dot blot, the LPS of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 (91 of 104 samples of analyzed serums). By means of the alcoholic division of Cohn it was obtained an immunoglobulin of electrophoretic purity acceptable and yield of **6,525 g/L** whose biological activity was proven in a Western blot when facing it to the antigen lipopolisaccharidic. 91,66% of survival was observed in the mice challenged with high dose of the microorganism and treaties with the immunoglobulinas preparation, what evidences its protective effect in alive against *Pseudomonas aeruginosa*. It was demonstrated the existence of crossed reactions of several serotypes experimentally with the O11, as well as the possibility to take advantage of these in the immunotherapy.

INDICE.

	Páginas
RESUMEN.	
INTRODUCCIÓN.	
OBJETIVOS.	
I- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	
I.1- Aspectos generales sobre la Biología de <i>P. aeruginosa</i> .	1
I.2- Componentes antigénicas de <i>P. aeruginosa</i> .	2
I. 2.1- Estructura del LPS.	3
I.3- Patogenicidad	4
I. 4- La respuesta inmune frente a <i>P. aeruginosa</i> .	7
I.5- Estrategias terapéuticas contra <i>P. aeruginosa</i> .	8
I.5.1-Antibioticoterapia.	8
I.5.2- Vacunas contra <i>P. aeruginosa</i> .	11
I.5.3- Inmunoglobulinas y <i>P. aeruginosa</i> .	12
I.6- Métodos de purificación de inmunoglobulinas intravenosas (IGIV).	14
I.6.1- Fraccionamiento alcohólico de plasma empleado en Cuba para la obtención de IgG.	15
II- MATERIALES Y MÉTODOS.	
II.1- Muestras de suero de donantes.	18
II. 2- Ensayo de reconocimiento del LPS por sueros donantes (Dot Blot).	18
II.3- ELISA para la detección de anticuerpos anti LPS de <i>P. aeruginosa</i> .	18
II.4- Fraccionamiento alcohólico.	19
II.5- Inmunodifusión Radial Simple.	20
II.6-Electroforesis en gel de poliacrilamida. (SDS – PAGE) para muestras de inmunoglobulinas.	20
II.7-Inmunotransferencia (WESTERN BLOTT).	21
II.8 Ensayo de evaluación del preparado de inmunoglobulinas.	21
II. 8.1- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	21
II.8.2- Animales	21
II.8.3- Intacglobín.	22
II.8.4- Preparado de Inmunoglobulinas.	22
II.8.5- Dosis Letal Mínima.	23
II.8.5.1- Preparación del inóculo.	23
II.8.5.2- Determinación de la Dosis Letal mínima.	23
II.8.6- Determinación de la capacidad protectora del preparado de inmunoglobulinas.	23

II.8.7- Ensayo de inhibición de la actividad protectora del preparado de inmunoglobulinas.	24
II.9- Análisis estadístico.	24
III- RESULTADOS y DISCUSIÓN.	25
IV- CONCLUSIONES.	36
V- RECOMENDACIONES.	37
VI- BIBLIOGRAFÍA	

INTRODUCCION.

En la actualidad las infecciones causadas por la bacterias Gram negativas se han incrementado en relación con aquellas causadas por las bacterias Gram positivas, jugando un papel importante en las infecciones nosocomiales, causando severas complicaciones que en gran número de casos provocan la muerte de los individuos que la padecen.

De particular interés es *P. aeruginosa*, patógeno oportunista que en los últimos treinta años ha aumentado su frecuencia como agente etiológico de diversas infecciones en animales y humanas, definida por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) como patógeno nosocomial primario. Contrariamente a lo que parece, diariamente estamos en contacto con *P. aeruginosa* ya que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, encontrándose en bajas cantidades en nuestros alimentos, así como en los artículos de limpieza y otros que solemos interactuar frecuentemente.

P. aeruginosa no solo tiene un papel importante como agente de infección nosocomial, también puede causar infección en individuos de la comunidad, de ahí que se han aislado de esputo de personas con neumonía extrahospitalaria, sinusitis e infecciones del tracto urinario y otitis.

Al igual que la mayoría de los patógenos bacterianos, la virulencia de *P. aeruginosa* es multifactorial y es producto de la interacción de muchas variables que involucran tanto a la bacteria como al hospedero. Estas interacciones contribuyen sin lugar a dudas al amplio espectro que presentan las enfermedad es causada por este bacilo en los pacientes infectados.

La patogenicidad de esta bacteria se ha asociado con numerosos factores de virulencia, algunos son parte estructural de la célula y otros son sintetizados por ella y excretado al tejido circundante; donde se desarrolla la infección, entre los que se pueden mencionar las exotoxina A y S, el flagelo, enzimas hidrolíticas, que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. El lipopolisacárido (LPS) es el principal partícipe de virulencia de esta especie bacteriana, al cual se le ha atribuido propiedades biológicas como pirogenesis, actividad antitumoral, inductor de la producción de interferón, además de ser altamente inmunogénico en hombres y animales.

Una vez establecida la infección por *P. aeruginosa* es muy difícil de tratar, ya que esta bacteria manifiesta elevados índices de resistencia a numerosos agentes antimicrobianos utilizados en la práctica clínica y a un gran número de desinfectantes.

Dado que en la actualidad no existe fármaco 100 % efectivo, ni vacuna disponible contra este patógeno oportunista, se hace necesario contar con un preparado inmunológico que solo o en combinación con antibióticos contribuya a eliminar de manera eficiente las infecciones causadas directa o indirectamente por bacteria.

Para ello se ha hecho necesario un estudio del comportamiento de las cepas de *P. aeruginosa* circulantes, teniendo en cuenta los serotipos más frecuentes, los niveles de resistencia a los antibióticos mayormente empleados, así como un análisis de reconocimiento de los antígenos más importantes de la bacteria por parte del sistema inmune de pacientes de alto riesgo y la población sana, estos antecedentes nos permitieron formular la siguiente hipótesis de trabajo

“Es posible obtener un preparado de inmunoglobulinas anti LPS de *P. aeruginosa* que contribuya de manera efectiva al tratamiento de la infección causada por esta bacteria en ratones Balb/c. “

A partir de esta hipótesis, el presente trabajo tuvo como objetivo general:

- Obtener un Preparado de Inmunoglobulinas anti *P. aeruginosa* y evaluar su efectividad en ratones Balb/c.

Del objetivo general se derivan los siguientes objetivos específicos:

- Obtención de un Preparado de Inmunoglobulina anti *P. aeruginosa* serotipo O11 mediante el método de Fraccionamiento Alcohólico.
- Evaluación la capacidad protectora del Preparado de Inmunoglobulinas en ratones Balb/c retados.
- Evaluación la existencia de reacciones cruzadas y sus posibles beneficios para la inmunoterapia.

I- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

I.1- Aspectos generales sobre la Biología de *Pseudomonas aeruginosa*.

El Género *Pseudomonas* perteneciente a la familia *Pseudomonaceae*, es sin duda el más importante del amplio y heterogéneo grupo de bacilos no fermentadores (BNF), el cual se caracteriza por incluir bacilos Gram negativos, asporógenos, rectos o ligeramente curvos. ^(1, 2, 3, 4) (Figura 1)

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, aeróbica, no formadora de esporas, móvil debido a la presencia de flagelos polares y positiva a las pruebas de oxidasa y catalasa. Esta bacteria se considera como un microorganismo patógeno oportunista, capaz de desarrollar procesos infecciosos en pacientes inmunocomprometidos o que tienen alteraciones en sus mecanismos homeostáticos. ^(5, 6, 7, 8, 9)

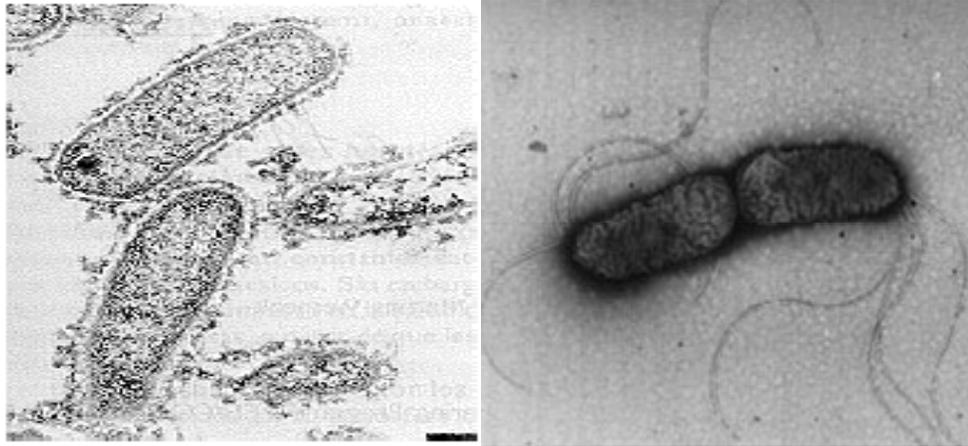
P. aeruginosa se considera un patógeno global, pues se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza dado su alto grado de adaptabilidad fisiológica. Por esta razón constituye uno de los patógenos nosocomiales más frecuentes y es reconocido como un serio problema de salud a escala mundial ^(10, 11, 12, 13) su aislamiento puede ser realizado a partir de muestras clínicas, aceite, plantas y animales. Contrario a lo que parece, todos estamos en contacto diariamente con *P. aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en los alimentos y en algunos artículos de limpieza. ⁽¹⁴⁾ De hecho, entre el 2 y el 8 % de los aislamientos de *P. aeruginosa* se obtienen a partir de las heces de personas sanas, lo que muestra que nuestro contacto con esta bacteria es cotidiano y representa solo una amenaza para nuestra salud en condiciones especiales.

P. aeruginosa es capaz de permanecer por tiempos prolongados en líquidos y superficies, como antisépticos, alimentos parenterales, equipos de inhaloterapia, fluidos de diálisis, grifos de agua, etc. ⁽¹⁵⁾

En contraste, es excepcional encontrarla como parte de la microflora normal de individuos sanos, en quienes se ha aislado de 0-6,6 % en axilas, tracto respiratorio y faringe, y de 2,6-24 % en heces ^(4, 16, 17).

Pseudomonas llega a las instituciones hospitalarias a través del agua del grifo, por los desagües, en suministros líquidos diversos e, incluso, con los ramos de flores. ⁽¹⁸⁾ Por ello, los hospitales han sido considerados como uno de los principales reservorios de esta bacteria, contribuyendo a su diseminación ambiental y persistencia. ⁽¹⁹⁾

El personal de la salud también ha sido implicado como reservorio y vector de brotes. ^(20, 21) Un ejemplo es la transmisión de *Pseudomonas* a través de sus manos que se ha postulado como un mecanismo frecuente. Se destaca por su elevada frecuencia de aislamiento y severidad en cuadros



a)

b)

Figura 1: *Pseudomonas aeruginosa*. a) Microfotografía electrónica de Transmisión. b) Microscopio óptico

clínicos producidos a pacientes inmunocomprometidos, y ⁽²²⁾ por otra parte es una causa común de infección del tracto urinario, sobre todo en pacientes sometidos a manipulación urológica, con uropatía obstructiva que han recibido antibióticos de amplio espectro. ^(23, 24)

Estructura de la pared celular: Su pared celular es más delgada, pero más compleja que la del resto de los Gram (-). El peptidoglicano se dispone en una sola capa, pero por fuera de ella se encuentra una segunda membrana denominada membrana externa. La membrana externa es una membrana asimétrica, porque si bien la monocapa interna está formada por fosfolípidos, la monocapa exterior está formada por un tipo especial de lípido, denominado lipopolisacárido (LPS).. Entre la membrana externa y la membrana celular se crea un compartimento virtual, llamado espacio periplásmico. El espacio periplásmico es una matriz que incluye al péptidoglicano, enzimas, proteínas transportadoras de nutrientes y sustancias de secreción. La membrana externa contiene numerosas proteínas, siendo las porinas las más abundantes; se denominan así, porque forman poros que comunican el exterior con el espacio periplásmico. Las porinas constituyen poros de difusión inespecíficos que permiten el paso de sustancias hidrofílicas y menores de 700 Dalton (aminoácidos o disacáridos); las porinas más conocidas en *P. aeruginosa* son OmpC y OmpF. En condiciones de alta osmolaridad o temperatura (como las que se encuentran en el ser humano), se sintetiza preferentemente OmpC, porina de poro pequeño, mientras que en condiciones de baja osmolaridad y baja temperatura (medio ambiente), se sintetiza la porina OmpF, que tiene un poro de mayor diámetro. Otra proteína abundante en la membrana externa, es OmpA. Esta última, no es una porina, sino que es el receptor del pili F que participa en el proceso de conjugación. ^(6, 9, 25)

I.2- Componentes antigénicas de *P. aeruginosa*.

P. aeruginosa es considerada un complejo antigénico, ya que la mayoría de sus componentes posee actividad inmunogénica ^(26, 27, 28). Entre estos componentes figuran flagelos, Pili, LPS, proteínas de membrana externa, polisacárido extracelular mucoide, enzimas y toxinas como la elastasas alcalinas, hemolisinas, fosfolipasas, exotoxina A, etc., ^(29, 30, 31)

Flagelos: Los flagelos son apéndices filamentosos, helicoidales, que se emplean en la movilidad bacteriana y permiten la invasión del hospedero. Las bacterias se desplazan rotando los flagelos, como una hélice. Están presentes sólo en los bacilos, y su estructura consta un cuerpo basal y un gancho, embebidos en la envoltura celular, y un filamento externo de 20 nm de diámetro resultante del ensamblaje de miles de monómeros de una proteína llamada flagelina, que se dispone como un cilindro

de 5–10 μm de longitud. Los flagelos se observan al microscopio óptico de campo claro, solamente si las bacterias se preparan con tinciones que aumenten su grosor. La posición de los flagelos puede ser peritrica, rodeando toda la bacteria; monotrica o lofotrica, si poseen un flagelo o un haz de flagelos en un polo, respectivamente; o anfotricas si poseen un haz de flagelos en cada polo. Los flagelos son excelentes inmunógenos y se denominan antígenos H. (7, 19, 24)

Fimbrias: Las fimbrias, también llamadas pili, es la principal estructura proteica de varias bacterias patógenas, incluyendo *P. aeruginosa*. Son microfibrillas parecidas a pelos, que rodean en número de 100-200 a algunas bacterias Gram (-). Miden 3-7 μm de diámetro, por lo que se observan sólo al microscopio electrónico. Están constituidas por el ensamblaje de miles de monómeros de una proteína estructural llamada pilina, que se dispone en cilindros rígidos o flexibles y por unas pocas copias de una proteína apical con propiedades de adhesina. Las fimbrias son responsables de la adherencia específica de las bacterias a los tejidos del hospedero, explicando su especificidad. Entre los ejemplos más conocidos destacan las fimbrias tipo 1 o pilis comunes, que se adhieren a residuos de manosa y que aparecen en un gran número de Enterobacteriaceas y las fimbrias P, que se encuentran en los clones uropatógenos y pielonefritogénicos de *E. coli* y cuyo receptor es gal-gal. Dada su importancia, numerosas bacterias fimbriadas han desarrollado mecanismos que le permiten la variación de fases y variación antigénica de las fimbrias, con el objeto de evadir la respuesta inmune humoral del hospedero. (7, 8, 29)

Lipopolisacárido (LPS): Constituye una endotoxina, que se libera cuando la bacteria se divide o muere. Es un potente estimulador de los macrófagos, lo que causa la activa liberación de citoquinas, responsables de las manifestaciones clínicas de las infecciones por *P. aeruginosa* y que varían desde una fiebre hasta el shock séptico. (7, 19, 24)

I. 2.1- Estructura del LPS :

El LPS es una molécula anfipática conformada por tres regiones diferentes unidas covalentemente: el lípido A, el core y la cadena lateral O.

Las cadenas laterales O se extienden alrededor de las membranas y representan el mayor determinante inmunogénico del LPS, que reacciona directamente con los anticuerpos específicos. Su estructura protege a la célula de la fagocitosis y la muerte, pero tiene el inconveniente de que activa la vía alternativa del complemento, independientemente de las IgM y de las IgG. (32, 33, 34) El core está formado por cadenas de 25 o más unidades de azúcares repetidas. Es un oligosacárido de 4 a 5 azúcares, algunos infrecuentes como las

heptosas y un azúcar de 8 carbonos, denominado ceto-deoxioctanoico (KDO) y azúcares cargados, aminohexosas, aminopentosas, ácidos hexaminurónicos, los cuales están compuestos por una variedad de sustituyentes, como aminoácidos y grupos fosforil, glicerol, lactol, formil, y acetil. Es el eslabón de unión entre la cadena lateral O y el lípido A. ^(25, 26) La diversidad de estas estructuras son generadas por diferencias en las secuencias naturales y tipos de enlaces de los residuos monosacáridos en las unidades repetitivas. La variación del contenido de azúcar de esta estructura contribuye a aumentar la variedad antigénica de esta bacteria. En el laboratorio permite la clasificación de importantes grupos bacterianos como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, uropatógenos y enteropatógenos. ^(25, 32, 34)

El lípido A es un complejo de azúcares, fosfatos, ácidos grasos y forma una bicapa con los fosfolípidos de la membrana. Es el responsable además de la toxicidad del LPS, constituye una eficaz barrera en la membrana externa, y juega un importante papel estructural, ya que su viscosidad regula el paso de sustancias a través de la membrana. ^(23, 24) La producción de anticuerpos contra este lípido ocurre de manera natural en el suero normal de humanos y de muchas especies animales, con excepción de ratas y conejillos de indias; estos anticuerpos también aparecen en el paciente después de una infección por *Pseudomonas aeruginosa*. ^(8, 9, 29)

Figura 2

I.3- Patogenicidad

Las especies de mayor importancia en patología médica son *P. aeruginosa*, *P. mallei* y *P. pseudomallei*. ^(7, 18) Se plantea que las infecciones por *Pseudomonas* representan el 5% de las Infecciones Nosocomiales. Es la especie que más se ha aislado y se asocia con la contaminación de fuentes comunes como agua, antisépticos y equipos médicos. ^(7, 35)

Otras especies de *Pseudomonas*, como *P. cepacia*, *P. fluorescen*, *P. putida*, *P. acidovorans*, *P. testosteroni*, *P. stutzeri*, *P. putrefaciens*, *P. alcaligenes* y *P. pseudoalcaligenes*, raras veces producen infecciones semejantes, epidemiológica y clínicamente, a las causadas por *P. aeruginosa*. ^(7, 35)

P. aeruginosa es la segunda causa más común de infecciones en la UCI. ⁽³⁶⁾ La mayoría de los brotes de neumonía por este germen y neumonía relacionadas a ventilación mecánica, están asociados a la estancia en estas unidades, ⁽³⁷⁾ en un menor porcentaje se asocian con bacteriemias relacionadas a procedimientos endoscópicos; y en un número reducido con infecciones quirúrgicas. ^(38, 39) Se estima que la neumonía nosocomial es una complicación de entre 0.5 y 2% del total de las hospitalizaciones (Fig. 3). ^(8, 56)

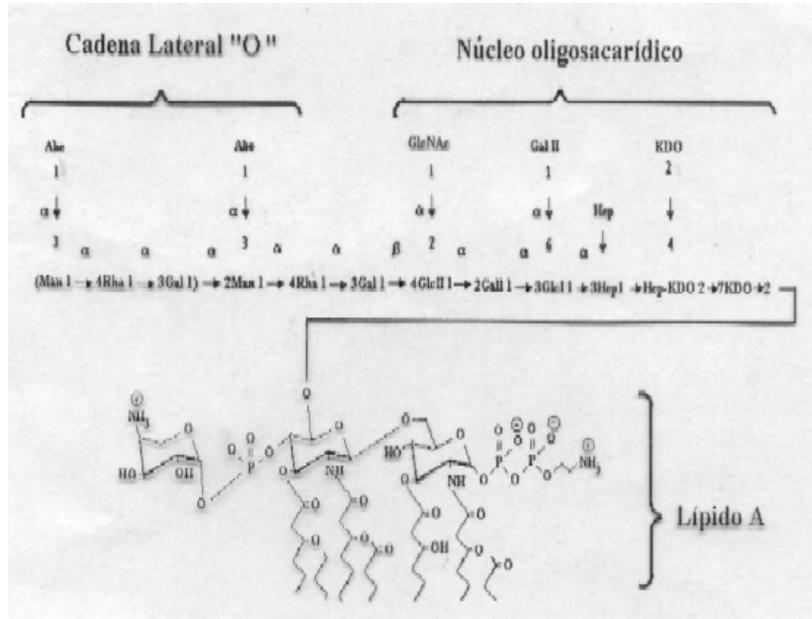


Figura 2: Estructura del LPS de *Pseudomonas aeruginosa*.



Figura 3. Neumonía nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa* consolidación en el lóbulo medio derecho.

P. aeruginosa probablemente coloniza al hospedero a través de heridas abiertas, úlceras en miembros inferiores, y en virtud de la ingestión de alimentos contaminados como lechugas y vegetales crudos. La epidemiología de *P. aeruginosa* refleja prevalencia en muchos ambientes por el hecho de que puede sobrevivir con un mínimo de requerimientos nutricionales. ^(6, 40)

La patogenicidad de *P. aeruginosa* es compleja y pudiera ser entendida en términos de su capacidad para evadir los mecanismos normales de defensas del hospedero. ⁽⁴¹⁾ Esta habilidad incluye la ruptura de la integridad de barreras físicas como la piel y membranas mucosas, en casos de quemaduras, o la evasión de mecanismos de defensas, como en el caso del empleo de catéteres intravenosos, catéteres urinarios o tubos endotraqueales, ⁽⁴²⁾ los cuales constituyen un reservorio de infecciones crónicas.

En otras situaciones puede existir un fallo en la respuesta inmune del hospedero, por ejemplo neutropenia, hipogamaglobulinemia, deficiencia del complemento, o estados inmunosupresivos asociados a enfermedades iatrogénicas asociadas a la quimioterapia u otras enfermedades tales como el SIDA. La patogénesis es multifactorial y está relacionada tanto con factores del hospedero como a factores del microorganismo. ^(43, 44)

Otros factores de virulencia expresados por el microorganismo son importantes en la patogénesis, como las Proteínas de Membrana Externa y la Exotoxina A, así como proteasas extracelulares, ^(8, 45) las cuales están asociadas con la virulencia en conjunción con otros factores relacionados con la respuesta inflamatoria del hospedero. Entre ellos la producción de enzimas proteolíticas y elastasas. ⁽⁴⁶⁾ Estas proteasas pueden degradar inmunoglobulinas, convirtiéndolas en no funcionales y pueden también estar involucradas en la destrucción del tejido conectivo soporte, provocando fibrosis crónica, característica de enfermedades en estadios terminales. Se ha demostrado que las condiciones ambientales como la tensión de O₂, la disponibilidad de hierro y la presencia de antibióticos, son factores que modulan la síntesis y la función de estos factores de virulencia bacterianos. ^(47, 48, 49) El tracto respiratorio además de su función en el transporte de oxígeno, posee una importante función en la defensa inmunológica. ^(38, 39) *P. aeruginosa* produce la infección pulmonar crónica más severa y se asocia a un deterioro progresivo de la función respiratoria

La infección por *P. aeruginosa* en el tracto respiratorio se puede dividir en tres momentos:

- 1)- Ataque bacteriano y colonización
- 2)- Invasión local.

3)- Diseminación y enfermedad sistémica.

En el primer momento, el cual es responsable de la adherencia al epitelio del tracto respiratorio. ⁽⁴⁹⁾son importantes ciertas estructuras de la bacteria como el pili, LPS – core – cadena lateral O y el flagelo. La fibronectina protege las células epiteliales del ataque, pero aparentemente ésta se pierde como resultado de enfermedades u otros factores.

El segundo momento se vincula a estructuras asociadas con la bacteria como el flagelo ^(38, 39) pero también con aquellos del hospedero. Un mecanismo importante para la bacteria es la descamación de las células epiteliales infectadas, a través de los mecanismos de aclaramiento; el microorganismo invade la célula siguiendo la descamación de células portadoras. Varios investigadores sostienen que la lesión genética responsable de una de las variantes genéticas más comunes de F. Q. es la DF 508 la cual está asociada con la expresión de receptores que facilitan la penetración del microorganismo. Ha sido descrita ampliamente la estrecha relación entre *P aeruginosa* y los pacientes con fibrosis quística (FQ) quienes de manera característica presentan procesos infecciosos crónicos por esta bacteria, que finalmente conducen a la muerte del paciente, debido a las complicaciones derivadas de la infección bacteriana y a una respuesta exacerbada de los mecanismos de defensa del huésped. ⁽³⁶⁾ Su aparición por primera vez en las secreciones bronquiales es suficiente para la indicación de antibiótico terapia, aunque no se encuentren indicadores de exacerbación. Si no es erradicada a los tres meses se considerará paciente colonizado. En general se indica una quinolona por vía oral y colistina nebulizada. En la inmensa mayoría de los pacientes la infección es iniciada por cepas no mucoides y la transición a la variante mucoide se relaciona con el incremento de anticuerpos anti-*Pseudomonas*. La producción de alginatos exclusiva de F. Q. genera la presencia de formas mucoides de *P. aeruginosa*. Con la evolución, la mayoría será de este tipo. Suelen desaparecer en el periodo postratamiento, aunque habitualmente reaparecen luego. ⁽³⁶⁾

En el caso de la relación de *P aeruginosa* con el paciente fibroquístico, la bacteria posee receptores que interaccionan de manera específica con la proteína *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR) y es capaz de adaptarse a las condiciones del tracto respiratorio de estos pacientes. Estas condiciones seleccionan a los clones bacterianos más eficientes en términos de adaptación frente a este medio ambiente agresivo. La figura 4 representa los factores de virulencia incluidos en la interacción hospedero bacteria en Fibrosis Quística. ⁽³⁶⁾ Como respuesta a las condiciones del tracto respiratorio de los pacientes con FQ, *P aeruginosa* produce una gran cantidad de alginato lo que

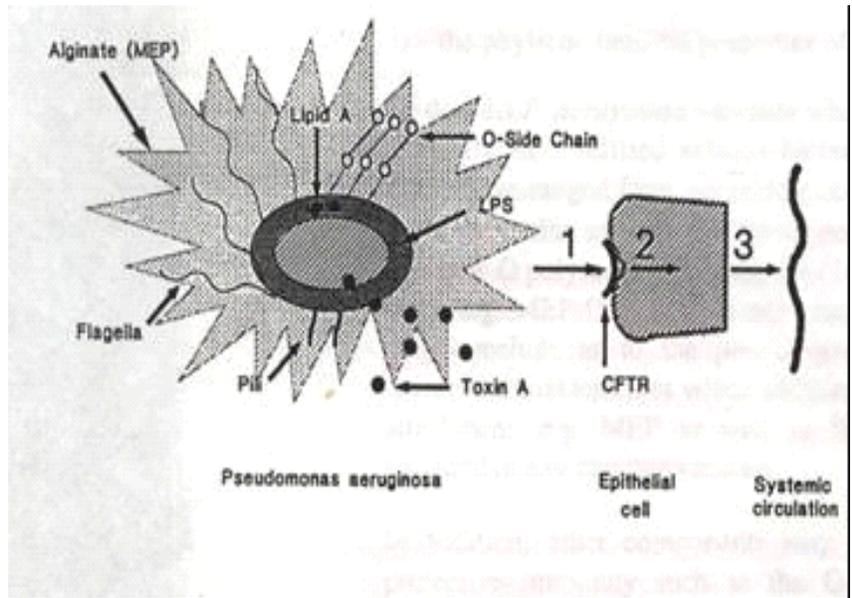


Figura 4 Representación de factores de virulencia incluidos en la interacción hospedero bacteria, ilustrando el papel del flagelo, Pili y LPS en el ataque bacteriano (1) Papel del gen CFTR y el flagelo en invasión local (2) papel de la toxina A y MEP en infecciones crónicas y enfermedades sistémicas. (3)

conduce a la presentación del fenotipo bacteriano mucoso, característico de las cepas asociadas a FQ. Adicionalmente, el microorganismo cambia su perfil de proteínas de membrana, pierde flagelos convirtiéndose en inmóvil, modula la síntesis del liposacárido

bacteriano (LPS), crece formando biopelículas o microcolonias y modifica su velocidad de crecimiento celular, entre otras adaptaciones. (4, 37, 45, 50)

I. 4- La respuesta inmune frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

El papel principal del sistema inmune es proteger al huésped contra los microorganismos patógenos. La defensa frente a bacterias extracelulares como *P. aeruginosa*, está mediada por la inmunidad natural y adquirida. No obstante, esta bacteria ha desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir ante las defensas inmunes. (51)

Las lesiones tisulares y las enfermedades que se producen pueden ser por la respuesta del huésped frente a la infección, más que por el propio microorganismo. Por tanto la inmunidad como otros mecanismos homeostáticos es necesaria para la supervivencia del huésped, pero también puede perjudicarlo. Así, diversos mecanismos que atacan la infección por *P. aeruginosa* también contribuyen a su patogenia. (51, 52)

Esta bacteria es capaz de replicarse fuera de la célula, en la circulación de los tejidos conectivos extracelulares y en diferentes espacios tisulares, como las vías aéreas. *P. aeruginosa* induce mecanismos inmunes que provocan procesos inflamatorios y destruyen tejidos en el lugar de la infección. Específicamente, el LPS presente en su pared celular, es una endotoxina que causa la liberación de citoquinas responsables de estos efectos. (51, 52)

Un mecanismo fundamental de inmunidad natural es la fagocitosis por neutrófilos, monocitos y macrófagos tisulares. La resistencia de las bacterias, la fagocitosis y la digestión dentro de los macrófagos son determinantes en su virulencia y patogenicidad. (53)

Las bacterias son organismos complejos que contienen gran número de antígenos químicamente muy diferentes. Éstos se agrupan principalmente en dos categorías de antígenos bacterianos: los antígenos proteicos y los polisacáridos, que se diferencian a su vez por la respuesta inmune que desencadenan. Los antígenos proteicos son considerados células Timo dependientes, que requieren linfocitos T cooperadores para el inicio de la respuesta humoral y la inmunidad mediada por células, mientras que la respuesta contra lipopolisacáridos es Timo independiente. (24)

P. aeruginosa puede producir efectos dañinos en células del sistema inmune con función fagocítica, evadiendo las defensas del organismo. En particular los macrófagos pueden ser dañados por la exotoxina A, y leucocitos por sustancias mucoides (Leucocidin), produciendo leucopenia.

Como se ha planteado, el LPS de la bacteria, puede estimular la producción de citoquinas por los macrófagos y otras células del endotelio vascular, entre ellas el Factor de Necrosis Tumoral α (FNT α), la interleuquina uno (IL-1) y la interleuquina seis (IL-6). (48, 52, 53)

El LPS de *P. aeruginosa* puede inducir la producción en cantidades elevadas de citoquinas proinflamatorias, entre ellas el FNT α , responsables de las manifestaciones clínico-patológicas del shock séptico o endotóxico. Esta es la consecuencia patológica más grave inducida por este germen, al liberarse el FNT. El síndrome se caracteriza por colapso circulatorio y coagulación intravascular diseminada, la que resulta mortal. (6, 54, 55)

Por otro lado, la presencia del LPS en la pared celular de *P. aeruginosa* puede provocar una respuesta inmune de tipo humoral y es la principal respuesta protectora frente a esta bacteria. Los polisacáridos que forman parte de su pared son antígenos timo independientes y capaces de estimular directamente a las células B, dando lugar a una fuerte respuesta de IgM. (55, 56, 57)

Los anticuerpos IgG pueden desempeñar funciones efectoras, favoreciendo los procesos de opsonización bacteriana para aumentar la fagocitosis mediante su unión a los receptores FC en los monocitos, macrófagos y neutrófilos, lo que constituye una vía de eliminación de la bacteria.

También los anticuerpos IgM e IgG activan el complemento generando C3b e iC3b que se unen a los receptores del complemento de tipo 1 y 3 respectivamente y promueven la fagocitosis. Por otro lado, estos isotipos de anticuerpos también pueden provocar la activación de la vía clásica del complemento, hasta la formación del complejo lítico microbicida, así como, la liberación de productos derivados que median la inflamación aguda. (8, 24, 58)

I.5 Estrategias terapéuticas contra *P. aeruginosa*.

I.5.1-Antibioticoterapia

La terapéutica de las infecciones generalizadas por *P. aeruginosa* constituye un problema, dada la facilidad con que este germen adquiere resistencia frente a diversos antibióticos que al principio resultaban activos. Entre los aminoglucósidos potencialmente eficaces cabe citar la gentamicina, la tobramicina, la netilmicina y la amikacina. Para ejercer su acción, los aminoglucósidos tienen que penetrar en el interior de las bacterias;

esto ocurre por un proceso activo puesto que estos antibióticos son compuestos catiónicos, hidrófilos, que pasan con dificultad las membranas por difusión pasiva. Para que el acceso del antibiótico se produzca, éste se une a puntos de la membrana celular por simple enlace iónico. A continuación, por procesos dependientes de energía, atraviesa la membrana celular y alcanza el citoplasma bacteriano (fase I) y posteriormente el ribosoma (fase II); estas dos fases de penetración dependientes de energía no se producen en condiciones anaerobias. Algunos cationes divalentes, como el Mg^{2+} y el Ca^{2+} , la hiperosmolaridad y el pH ácido reducen la acción bactericida de los aminoglucósidos por inhibir su paso a través de la membrana celular. Una vez en el interior de las bacterias, todos los aminoglucósidos inhiben la síntesis de proteínas⁽⁵⁹⁾.

La introducción de la amikacina, que soporta mejor la inactivación enzimática, constituyó otro paso adelante en la terapéutica de estas infecciones.⁽⁶⁰⁾

Los antibióticos betalactámicos, como ureidopenicilinas, (azlocilina, piperacilina) cefalosporinas de tercera generación “antipseudomónicas”, (ceftazidima, cefoperazona cefsulodina,) imipenem y monolactámicos (aztreonam), tienen actividad contra *P. aeruginosa* muy superior a la de la carbenicilina, que era el antibiótico de referencia.

Estos compuestos inhiben la síntesis y reparación de la pared bacteriana. La actividad de los betalactámicos se debe principalmente a la inhibición que producen a partir de la reacción de transpeptidación en la fase 4 de la biosíntesis de la mureína. La estructura de estos antibióticos, en su anillo betalactámico, es similar a la del dipéptido D-ala-D-ala que es el sustrato natural reconocido por las transpeptidasas en la reacción de entrecruzamiento de la mureína. Al contrario que ocurre con el sustrato natural, los betalactámicos se unen a la transglucolasa formando un enlace covalente con una serina de su centro activo, lo que produce la inactivación irreversible de la enzima⁽⁵⁹⁾..

Imipenem está dotado de gran actividad contra *Pseudomonas*, por lo que desempeña un papel importante en el tratamiento de las infecciones por estos microorganismos. Se utiliza a dosis de 1,5-4 g/día repartido en 3-4 tomas por vía intravenosa. En los casos graves es obligada la asociación de los betalactámicos citados a un aminoglucósido, preferentemente amikacina, en busca de una sinergia sospechada, pero sólo demostrada para algunas combinaciones⁽⁶¹⁾..

Otro grupo de fármacos muy eficaces frente a *Pseudomonas* son las fluoroquinolonas (ciprofloxacino, norfloxacino y ofloxacino), este grupo de quimioterápicos producen un efecto bactericida. Penetran en la bacteria a través de las porinas, no afectándoles la integridad de la pared celular. Una vez dentro de la célula actúan inhibiendo una enzima que prepara el ADN para la transcripción, la ADN-girasa (por

ello se las denomina «inhibidores de la girasa»). Esta enzima está compuesta de cuatro subunidades (dos subunidades A y dos B) y es la responsable del enrollamiento de las bandas de ADN⁽⁵⁹⁾..

Estos fármacos ofrecen la ventaja de poder emplearse tanto por vía oral como intravenosa. Ello permite su uso vía oral para pacientes afectados de fibrosis quística, cuyas vías respiratorias están crónicamente colonizadas por *P. aeruginosa*. Sin embargo, las 4-fluoroquinolonas no se aconsejan en pediatría por la posibilidad de que inhiban el desarrollo de los cartílagos de crecimiento.

La dificultad que se manifiesta en las infecciones por *P. aeruginosa* con los antibióticos se ilustra más dramáticamente en los pacientes que padecen fibrosis quística..

Debido a la inefectiva penetración de componentes del sistema inmune a través de la cápsula viscosa, la bacteria es capaz de evadir el sistema inmune. Si el sistema inmune de los pacientes fibroquísticos funcionara normalmente, una estrategia factible sería la vacunación activa para prevenir infecciones por este germen⁽⁶²⁾..

La *P. aeruginosa*, es un patógeno importante que predomina en pacientes que presentan afectación en el sistema fagocítico mononuclear, esto incluye pacientes neutropénicos bajo tratamiento con inmunosupresores. Las infecciones en estas personas suelen tener un curso rápido y dramático, por lo que se hace inefectivo establecer una inmunidad endógena a través de vacunación activa. Debido al estado de inmunosupresión de estos pacientes que no tienen capacidad para elevar una respuesta inmune efectiva por si mismo, se plantea que la inmunoterapia pasiva representa una alternativa apropiada para el tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria.

En los últimos años se han llevado a cabo múltiples esfuerzos dirigidos a desarrollar una inmunoterapia en ellos con fines tanto profilácticos como terapéuticos, de forma coadyuvante con los antibióticos. Se han utilizado diferentes vacunas a partir de componentes bacterianos con resultados dispares⁽⁶³⁾..

Finalmente, constituye una acción profiláctica o terapéutica la disminución de la intensidad y duración de la granulopenia mediante transfusión de granulocitos (de eficacia limitada) o administración de factores estimulantes de colonias de granulocitos o de granulocitos y monocitos. Cabe destacar que con estas sustancias se han llegado a curar otras infecciones pseudomónicas crónicas, como osteomielitis.

Por otro lado, el tratamiento más difundido para la neumonía por *P. aeruginosa* es la combinación de un antibiótico betalactámico con un aminoglucósido o una fluoroquinolona. Las combinaciones que se utilizan con mayor frecuencia son: ticarcilina/tobramicina y piperacilina/tobramicina^(64,65)..

Otras especies de *Pseudomonas* menos habituales que *P. aeruginosa*, como *P. cepacia*, *P. fluorescens* y *P. putida*, son también sensibles a los betalactámicos mencionados (Ej. ceftazidima y aztreonam).

La terapéutica quirúrgica puede ser imprescindible en las endocarditis que no ceden con el tratamiento médico, en las osteomielitis y en otras circunstancias ⁽⁶¹⁾..

I.5.2- Vacunas contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Desde los años sesenta, varias instituciones científicas del mundo han desarrollado y evaluado proyectos experimentales dirigidos a la obtención de una vacuna contra *P. aeruginosa*. Se han descrito varios preparados vacunales polivalentes; no obstante, ninguno ha sido efectivo contra esta bacteria. En la actualidad, la mortalidad a causa de bacteriemia por Bacilos Gram negativos ha sobrepasado el 40 %, que conlleva en la mayoría de los casos, al síndrome séptico. Se ha tenido éxito con vacunas polivalentes en la prevención de la infección en quemados; sobre todo, si a la vez se administra suero hiperinmune de personas sanas vacunadas con el mismo preparado. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos protectores aglutinantes, en enfermos de leucemia y FQ inmunizados no ha sido tan eficaz. En neoplasias, los resultados son igualmente contradictorios. ^(66, 67, 68, 69) Lang y col (2004) ⁽⁶²⁾ desarrollaron una vacuna conjugada, consistente en el acoplamiento del lipopolisacárido de ocho serotipos de *P. aeruginosa* (1, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 16) con la toxina A de la bacteria. Esta mostró una reducción significativa en la incidencia de infección crónica por el germen en el grupo que fue inmunizado con respecto al grupo no inmunizado (control)

El más prometedor de estos proyectos consistió en el desarrollo de dos vacunas basadas en el lipopolisacárido (LPS) como antígeno. Pseudogen™, una preparación de vacuna heptavalente, y PEV-01 una vacuna 16-valente. Ambas vacunas estimularon la inducción de anticuerpos eficazmente contra todos los serotipos O que contuviera la vacuna, conllevando a una reducción de mortalidad por *P. aeruginosa* en pacientes quemados. ⁽⁷⁰⁾

Han sido utilizadas un número de pruebas clínicas empleando el O –polisacárido, como candidato vacunal, obteniéndose resultados variables con el tipo y calidad de las preparaciones. ⁽⁷⁰⁾

La primera vacuna de células completas redujo la mortalidad en pacientes quemados en comparación con los controles, pero no fue hasta la vacuna de LPS heptavalente que fueron acometidos los estudios a gran escala en diferentes grupos de pacientes. La vacuna confirió poca o ninguna protección a los pacientes de cáncer contra *P. aeruginosa* y fue incapaz de proteger a pacientes en cuidados intensivos y de FQ. ⁽⁷⁰⁾

Otras vacunas basadas en el LPS como antígeno, mostraron resultados alentadores en pacientes quemados, aunque esto ha sido cuestionado en base al pobre diseño del estudio. Una vacuna octovalente de polisacárido O conjugada con toxina A (**Aerugen Berna**) fue segura en voluntarios con anticuerpos funcionales anti LPS y anti toxina A con posterioridad a la inmunización ^(71, 72)

Estudios recientes indicaron que el potencial de algunos antígenos de *P. aeruginosa* llama la atención hacia un nuevo candidato vacunal. El core del LPS es un ligando para el enlace de *P. aeruginosa* a las vías aéreas y a las células del epitelio ocular de los animales. Sin embargo, la heterogeneidad existente en el core marca la diferencia entre los serotipos.

No hay en la actualidad ninguna vacuna aceptada contra *P. aeruginosa* disponible para el uso en la clínica que haya mostrado eficacia en los ensayos clínicos en los pacientes. ⁽⁷³⁾

Las investigaciones durante la última década se han dirigido hacia el desarrollo de una vacuna contra *P. aeruginosa* basada en el avance del conocimiento de las proteínas de la membrana externa (OPRs). Una vacuna sustentada en OPRs puede tener varias ventajas ya que estas proteínas son muy conservadas e inducen una respuesta inmune con posible protección cruzada contra los 17 serotipos conocidos de *P. aeruginosa*, las OPRs pueden producirse por la tecnología de DNA recombinante libre de contaminaciones por LPS y los genes duplicados de OPRs serían aplicables para la inmunización con ADN desnudo o podrían ser transferidos a vectores especiales no patógenos como *Salmonella fatiga*, de manera que induzca una respuesta inmune mucosal. ⁽⁶¹⁾ La eficacia de OPRs como candidato vacunal fue mostrada por varios grupos de investigación en varios modelos de animales.

Estudios *in vivo e in vitro* muestran que los anticuerpos flagelínicos fueron protectivos administrados de forma pasiva o como inmunógenos en animales comprometidos. ^(74, 75)

No obstante, quedan todavía una serie de problemas pendientes para el desarrollo de una vacuna efectiva, como la corta duración de la respuesta de anticuerpos, la alta incidencia de reacciones adversas (fiebre, dolor e induración en el lugar de la inyección) y la falta de producción de anticuerpos secretores. De forma paralela a las vacunas, se ha desarrollado la inmunoterapia pasiva, es decir, la administración de inmunoglobulinas anti-*Pseudomonas aeruginosa* ⁽⁶¹⁾

I.5.3- Inmunoglobulinas y *Pseudomonas aeruginosa*.

Inmunoglobulina es la porción del plasma que contiene los anticuerpos, es decir glucoproteínas producidas por el sistema inmune, específicamente por las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B. Estas moléculas proteicas portan actividad de anticuerpos específicos en la protección contra infecciones, actuando como inhibidores de adherencia de la toxina o del germen a sus células blanco; neutralizando las toxinas o

virus, y activando sistemas de destrucción de los gérmenes, como lo son el sistema del complemento y la fagocitosis. ⁽⁷⁶⁾

Los anticuerpos del suero migran en la fracción Gamma, por lo que se les denomina gammaglobulinas, las que están compuestas de un 82 – 96 % de polipéptidos y de un 4 – 18 % de carbohidratos. Presentan en su composición cuatro cadenas polipeptídicas estructurales, dos pesadas (H) y dos ligeras (L) unidas entre si por enlaces disulfuros (S-S). La molécula posee dos regiones, la región Fab que es la de unión al antígeno y la región Fc, fragmento cristalizante, muy relacionado con la activación y amplificación de la respuesta inmune, ⁽⁷⁷⁾ es más lábil a pH ácido que la región Fab. La región Fc es esencial para la fagocitosis y para la fijación del complemento por los inmunocomplejos producidos. ⁽⁷⁸⁾

Existen cinco clases de inmunoglobulinas designadas IgA, IgD, IgE, IgG e IgM de ellas la IgG es la más importante debido a la cantidad de procesos en los cuales está involucrada y por la alta proporción en que es producida luego del estímulo antigénico.

Los valores de referencia de las inmunoglobulinas, en individuos normales, oscilan entre 0,7 y 1,7 g/dL, estando distribuidas de la siguiente manera: IgG 85%, IgA 12% e IgM menos del 3%. Las inmunoglobulinas D y E se encuentran a muy bajas concentraciones en condiciones normales. ⁽⁷¹⁾

La Inmunoglobulina de suero inmune es un producto de amplio espectro, que contiene anticuerpos opsonicos y neutralizantes contra una gran variedad de patógenos bacterianos, como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Streptococcus A, B, G y D*, *Staphylococcus epidermidis* y *Klebsiella pneumoniae* en una concentración por lo menos tres veces superior al plasma. ^(41, 66, 71, 78, 79, 80, 81)

Las inmunoglobulinas poliespecíficas en pacientes con sepsis pueden ejercer su acción

Por la actividad específica contra los antígenos, inactivación de toxinas, estimulación de leucocitos y actividad bactericida del suero, interferencia con el efecto de las citoquinas, prevención de una activación excesiva del complemento y como antagonistas de citoquinas ^(82, 83, 84, 85)

Se ha demostrado que pacientes fibroquísticos con bajos niveles de gammaglobulinas presentan mejores estados clínicos que los pacientes con niveles de inmunoglobulina G normales o elevados. Se ha observado que los niveles de inmunoglobulina se correlacionan con la severidad de la enfermedad pulmonar. Un aumento progresivo de los niveles de inmunoglobulina G y A son indicio del resultado de la estimulación antigénica crónica producto a una colonización bacteriana. Los sueros obtenidos de pacientes con infección crónica por *P. aeruginosa* se han caracterizado por los niveles elevados de IgG₂ e IgG₃. ^(83, 84, 86)

Tabla 1 Características de las IgG Humanas.

Clase	Subclas.	Conc.x suero mg/mL	Fijación complemento	Transferencia placentaria	Vida media	Peso molec. x 10 ³	% de carboh.
IgA	IgA ₁	3	-	-	6	160	7 – 11
	IgA ₂	0.5	-	-	6	160	7 – 11
IgD	-	0.03	-	-	3	184	9 – 14
IgE	-	0.0002	-	-	2	188	12
IgG	IgG ₁	9	++	+	21	146	2 – 3
	IgG ₂	3	+	+	20	146	2 – 3
	IgG ₃	1	+++	+	7	170	2 – 3
	IgG ₄	0.5	-	+	21	146	2 - 3
IgM	-	1.5	++	-	10	970	12

El efecto antitoxina de los preparados de IgG enriquecidos con IgM; como el Pentaglobín (**6 g/L IgM, 6 g/L IgA, 38 g/L IgG**) y la variante cubana IgEGAM (**5 g/L IgM, 5 g/L IgA, 40 g/L IgG**) es mucho más fuerte que las preparaciones que contienen solamente IgG; como el INTACGLOBÍN, Sandoglobín e Intraglobín F. Esto se debe a que la IgM de forma natural tiene alta capacidad de neutralizar los epítopes bacterianos y reconocer con gran afinidad la región O de los LPS bacterianos. ^(87, 88)

I.6- Métodos de purificación de inmunoglobulinas intravenosas (IGIV).

Intensas investigaciones desarrolladas a partir de la primera mitad del pasado siglo permitieron la obtención de preparados de inmunoglobulinas, que representaron un progreso en la profilaxis y/o terapéutica de las enfermedades infecciosas, principalmente en los pacientes inmunodeficientes. ⁽⁷⁶⁾

Cohn introdujo el fraccionamiento alcohólico o en etanol frío a partir del plasma de no menos de 1000 donantes voluntarios sanos para producir “globulina inmune (humana)” como fue denominada por primera vez en 1936. A los donantes se les realiza un profundo reconocimiento médico, pruebas hematológicas y tamizaje serológico para el antígeno de la hepatitis B (HBV), antígeno del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH tipo 1 y 2) y anticuerpos para la hepatitis C (HCV). ^(89, 90) En su preparación, luego de la purificación por fraccionamiento alcohólico, la fracción II se somete a una doble inactivación viral con pasteurización a 60° C durante 10 horas y tratamiento con pepsina a pH 4 durante 72 horas, lo que permite obtener una IgG intacta y monomérica. El producto final contiene más del 95% de IgG, menos del 25% de IgA y escasa cantidad de IgM, y es usado terapéuticamente por el alto contenido de inmunoglobulinas. La infusión intravenosa de concentrados de gammaglobulinas se intentó por primera vez en los años 50 y 60. Desafortunadamente, esas infusiones resultaron en reacciones severas en gran número de pacientes.

Sin embargo, han sido ideados varios métodos para modificar las soluciones de inmunoglobulinas para obtener productos apropiados para uso intravenoso. Estos métodos contemplan la acción enzimática en la inmunoglobulina, estabilización de la inmunoglobulina por exposición a ácidos con trazas de pepsina, adición de grupos químicos para impedir la agregación, reducción, sulfonación o reducción seguida por alquilación, adición de estabilizadores (maltosa, sacarosa, albúmina, filtración y precipitación de agregados con polietilenglicol, entre otros ⁽⁹¹⁾

Varios intentos para producir inmunoglobulina intravenosa apropiada resultaron en un grupo de productos que podrían ser infundidos de forma segura. El objetivo de los primeros estudios sobre la eficacia de estos

concentrados intravenosos fue establecer ensayos terapéuticos que compararan las inmunoglobulinas intramusculares con las inmunoglobulinas intravenosas recién desarrolladas. Estas investigaciones han demostrado la eficacia de los preparados intravenosos en términos de reducción de la infección y uso reducido de antibióticos. ^(79,91)

No es hasta finales de la década de los 80 en que se licencian 7 productos por la FDA, los cuales pueden ser utilizados con seguridad por vía intravenosa (Sandoglobulina, Venoglobulina, Gaminmune, Gammar e Intraglobín). En los tres primeros la IgG se encuentra fragmentada y en los otros preparados la molécula estaba químicamente modificada.

En este periodo, un Comité de Inmunología Clínica de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología, en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS) establecieron algunas guías para las preparaciones de Inmunoglobulina Intravenosa basadas en la información que se tenía en aquel momento.

- a) El 90 % de la preparación debe ser intacta, no excediendo los polímeros de un 5 % y los fragmentos estar ausentes de la preparación.
- b) La IgG debe mantener de forma fisiológica sus funciones efectoras relacionadas con el fragmento Fc como son la opsonización, fijación del complemento etc.
- c) La actividad de anticuerpos debe incluir las neutralizaciones de virus y toxinas bacterianas, así como 0.1 UI de anti HBs Ag y un título de 1: 1000 para la Hepatitis A/mL.
- d) Deben estar presentes las cuatro subclases de IgG en la preparación, en proporción similar a aquellas encontradas en una mezcla de plasma y que no se añadan preservativos.
- e) Poseer una adecuada estabilidad biológica.

En los últimos años el desarrollo de las inmunoglobulinas intravenosas (IGIV) ha proporcionado un avance terapéutico sustancial en el tratamiento de la deficiencia de anticuerpos. ^(91, 92, 93, 94)

La inmunoglobulina intravenosa se emplea cuando la vacuna para la inmunización activa contra la enfermedad no está disponible, cuando el individuo es alérgico a uno de los componentes de la vacuna, o cuando no hay tiempo suficiente para que la inmunización activa estimule la producción de anticuerpos. ^(80, 81, 82, 94)

I.6.1- Fraccionamiento alcohólico de plasma empleado en Cuba para la obtención de IgG.

El fraccionamiento de las proteínas plasmáticas es una operación compleja, pues éstas pueden ser alteradas irreversiblemente por el calor, ácidos o bases fuertes y otros agentes desnaturizantes. La solubilidad de las proteínas, durante la precipitación alcohólica, depende de la constante dieléctrica del medio, la que puede

disminuirse añadiendo un solvente orgánico miscible en agua como etanol. En este principio se basa el método de fraccionamiento alcohólico de Cohn, controlando otras variables como la fuerza iónica, la temperatura, el pH y la concentración de proteínas.

En 1974 se firmó con la desaparecida URSS, un convenio de colaboración en el que los especialistas soviéticos proporcionarían la tecnología (Cohn tradicional) y equipamiento para el montaje de una planta industrial para el fraccionamiento del plasma humano obtenido en Cuba con capacidad de procesamiento de 50 000 L.

Desde 1972 un grupo de investigadores cubanos estuvo enfrascado en el desarrollo de estas tecnologías, publicándose por primera vez en Cuba en 1977 un trabajo que proporcionaba una modificación al método de Cohn, el de Kistler-P y Nitschmann-H, acortando substancialmente el número de pasos. Este método ha continuado optimizándose hasta que 1984 se presentó en forma definitiva, la cual se adoptaría posteriormente en 1986 para la puesta en marcha de la planta de la industria de Hemoderivados, la cual aumentó su capacidad nominal al doble, debido a los cambios tecnológicos. Entre las ventajas que ofrece el método de Cádiz modificado respecto al método original, se pueden mencionar la reducción importante de las etapas de fraccionamiento, acortamiento del periodo de fraccionamiento, eliminación de soluciones tampón en el sistema de ajustes de pH, disminución de las cantidades de etanol a añadir, importante ahorro de energía, aumento de la capacidad instalada por simplificación del volumen de fraccionamiento y de las horas de trabajo, aumento de rendimientos por disminución de las pérdidas de manipulación. ^(87, 88)

La preparación de inmunoglobulina intravenosa (IGIV) contra *P. aeruginosa* generalmente se realiza a partir de sueros con altos títulos de anticuerpos, los cuales son obtenidos por la inmunización activa de individuos sanos con antígenos relevantes de la bacteria, usualmente proteínas de membrana externa (OMP) y lipopolisacárido (LPS) o por la recolección de sueros de personas sanas que anteriormente fueron infectadas con *P. aeruginosa*. Estos sueros se homogenizan y por los métodos de obtención de IgG a nivel industrial se purifica la fracción de inmunoglobulinas. Estos preparados tienen una alta demanda en las UCI; sin embargo, su efectividad se ha visto limitada por la variabilidad de anticuerpos antibacterianos de lote a lote. ⁽⁸⁹⁾

Un gramo de IgG contiene aproximadamente 4×10^{18} moléculas con más de 10^7 especificidades de anticuerpos diferentes. Además la porción Fc de la molécula de Ig está involucrada en una variedad de importantes funciones inmunorreguladoras. ⁽⁹⁵⁾

Las tendencias actuales en la búsqueda de estrategias de profilaxis y/o tratamiento para la infección por *P. aeruginosa* demuestran que si bien se realizan numerosos esfuerzos en la búsqueda de una vacuna eficaz, de

forma paralela se ha desarrollado la inmunoterapia pasiva, es decir, la administración de inmunoglobulinas anti-*Pseudomonas aeruginosa* en el tratamiento de pacientes afectados. El presente trabajo se inserta en esta línea de investigación; obteniéndose un Preparado de inmunoglobulinas anti *Pseudomonas aeruginosa* serotipo O11 y se evalúa además su efectividad en el ratón Balb/c.

II- MATERIALES Y METODOS.

II.1- Muestras de suero de donantes.

Las muestras de suero usadas en este trabajo fueron suministradas por el Laboratorio de Control de la Calidad de los laboratorios BETERA del Banco de Sangre de Marianao, Ciudad de la Habana.

II.2- Ensayo de reconocimiento del LPS por sueros donantes (Dot Blot).

A 104 muestras de suero se les realizó un estudio de reconocimiento contra 9 serotipos de *Pseudomonas aeruginosa*, incluidos los de mayor frecuencia de aislamiento en nuestras unidades asistenciales.

En tiras de membrana de Nitrocelulosa (NC) Hybon de 0,45 µm, se aplicaron directamente 10 µl de las muestras de LPS de los serotipos O2, O4, O6, O7, O8, O11, O13, O15, O16 de *Pseudomonas aeruginosa*. Dichas muestras se purificaron en el Departamento de Inmunoquímica del Área de Investigaciones del Instituto Finlay, mediante el método de fenol acuoso combinado con una digestión enzimática. Las tiras se bloquearon 1 h a 37°C con leche descremada al 3% en solución tampón fosfato salino (STFS) pH 7,2 y posteriormente se lavaron 3 veces durante 10 minutos con STFS pH 7,2. Seguidamente se añadieron las muestras de suero de donantes diluidos 1/200 en STSF-BSA 1%-Tween 20 0.05%. Se incubaron durante toda la noche a 4°C con agitación moderada en agitador IKA-SCHUTTIER MTS 4. Se usó como control negativo un suero de recién nacido depletado de inmunoglobulinas por inmunoabsorción, a la misma dilución. Luego se incubó 2 h a temperatura ambiente con un conjugado anti IgG humana -peroxidasa (SIGMA, USA) diluido 1/1000. Se lavó con agua/Tween 20 se revelaron las bandas utilizando como sustrato H₂O₂-diaminobencidina. La reacción se detuvo con agua al observarse las manchas. ⁽⁹⁶⁾

II.3- ELISA para la detección de anticuerpos anti LPS de *Pseudomonas aeruginosa*.

Para aplicar el método de Fraccionamiento acohólico, se hizo una selección de las muestras de plasma humano mediante una técnica de ELISA indirecto semi cuantitativo anti LPS de *Pseudomonas aeruginosa* serotipo O11 con valor de corte prefijado de 0,29.

Se emplearon 100 µl de LPS serotipo O11 (2 µg/mL) para el recubrimiento de las placas de poliestireno de 96 pozos (MaxiSorp, Nunc, Dinamarca). Las placas fueron incubadas toda la noche a 37 °C, y se les realizaron 3 lavados con solución de Tween 20 – suero de ternera 5%. Se aplicaron 100 µl de las muestras de sueros, empleando como control positivo el suero de un paciente convaleciente con aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* O11 y como control negativo un suero de recién nacido depletado de

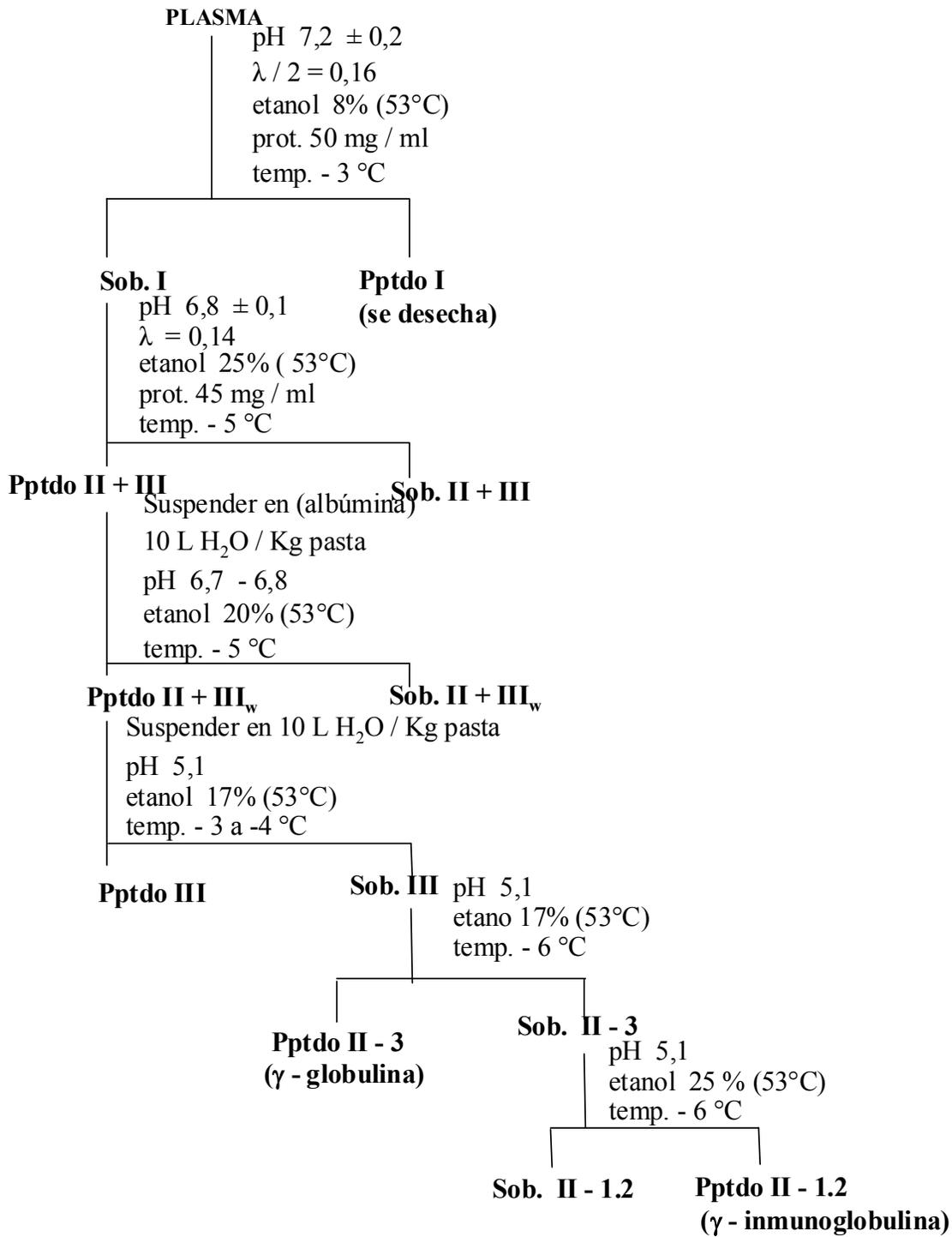
inmunoglobulinas por inmunoadsorción. ⁽⁹⁷⁾ Se incubó 30 minutos a 37°C y a continuación se lavó nuevamente. Se aplicó el conjugado anti IgG humana - Peroxidasa (SIGMA, USA), a una dilución de trabajo 1:40 000, se incubó nuevamente y se efectuó otro lavado. Se añadió Ortofenilendiamina (OPD) (SIGMA, USA) como sustrato, se incubó 30 minutos y se efectuó otro lavado. La lectura de la absorbancia se realizó en a 492 nm en un lector de ELISA (Organon Teknika). Las muestras con valor de corte superior al valor prefijado fueron consideradas positivas ⁽⁹⁸⁾

II.4- Fraccionamiento alcohólico.

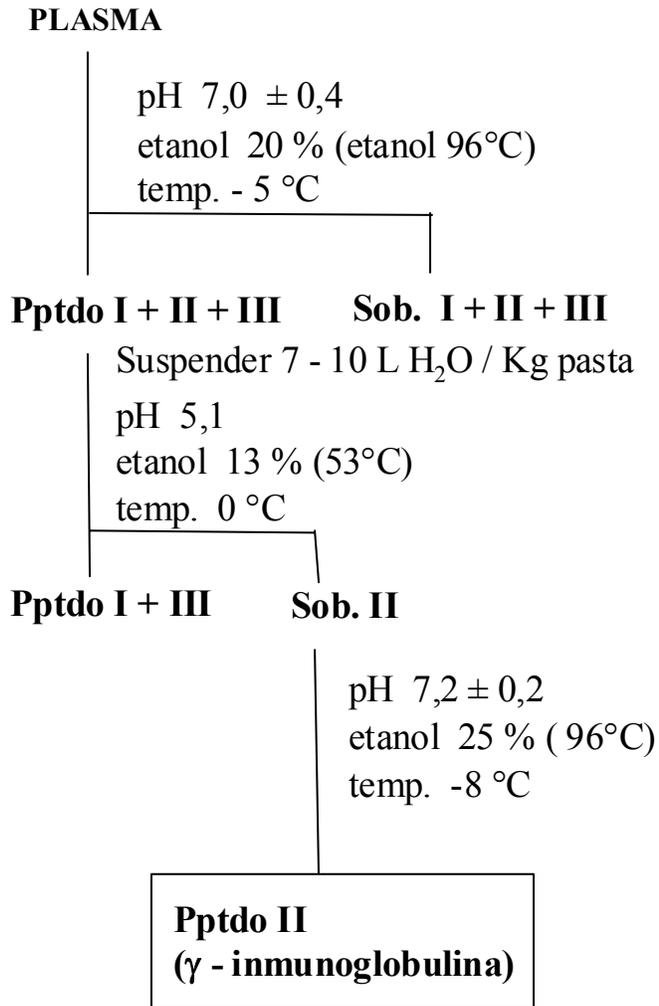
Para el desarrollo experimental de este trabajo, se utilizaron cuatro lotes de plasma normal de 2000 mL cada uno. Se empleó, según el método de fraccionamiento alcohólico de Conh (Anexo 1) modificado por Cádiz ⁽⁸⁸⁾ (Anexo 2).

Al plasma se le adicionó etanol a 96°, hasta llevarlo a una concentración de 20 %, en condiciones de agitación moderada, a la temperatura de -5° C y pH controlado $7,0 \pm 0.4$. Se mantuvo en reposo 1 h y se centrifugó por 30 minutos en centrífuga Beckman J2-21 UK a $3000 \times g$ y -10° C, desechándose el sobrenadante I+II+III. El precipitado I+II+III, fue resuspendido en solución salina fisiológica (0.9 %, p/v) y luego se añadió de 7 – 10 L de agua destilada por kilogramo de pasta, ajustando el pH a 5.1 con HCl 1 m/L y temperatura 0° C. Seguidamente, se le adicionó etanol a 53° C con agitación moderada hasta alcanzar la concentración del 13 %. Se mantuvo en reposo por 1h y la mezcla se centrifugó en iguales condiciones a las descritas, se desechó el precipitado I+III. Al sobrenadante I+II se le adicionó etanol a 96 ° C hasta una concentración del 25 %, se y ajustó el pH a 7.2 ± 0.2 , y la temperatura a -8 ° C: Se mantuvo la mezcla con agitación moderada, luego se dejó reposar por 2 h, fue centrifugada en similares condiciones, desechándose el sobrenadante II. El precipitado II se sometió a un proceso de ultrafiltración en un sistema AMICON empleando una membrana YM-100 (PM>100 000 daltons) a 3.5 atm con gas nitrógeno. Se lavó con 5 volúmenes de solución salina (0.9 %) como método establecido para eliminar alcohol del sistema. Luego se ajustó la concentración a

ANEXO # 1- Método de Cohn, 1946



ANEXO # 2- Método de Cádiz, 1984



50 mg/mL, el pH a 4.5 y se le añadió una solución de dextrosa isotónica como estabilizante hasta una concentración final de 5 %.

En cada uno de los pasos del fraccionamiento se tomaron 2 muestras de cada lote, para realizar los ensayos de control de proceso.

II. 5- Inmunodifusión Radial Simple.

Se determinó la concentración del Preparado de Inmunoglobulina durante los pasos del fraccionamiento alcohólico por una técnica de inmunodifusión radial simple según Mancini y col. ⁽⁹⁹⁾ Este método está basado en la especificidad de la reacción de precipitación que se produce *in vitro* al enfrentar un antígeno a su anticuerpo.

Se utilizó como anticuerpo específico incluido en el agar una anti IgG humana, obtenida en carnero, en el Instituto de Angiología y cirugía vascular de Ciudad de La Habana. Se aplicaron 10 µL de muestras en los pozos y se utilizó como estándar soluciones de INTACGLOBIN de concentración conocida. La concentración fue determinada mediante una curva de calibración a partir de los diámetros de los anillos de inmunoprecipitación vs la concentración de los estándares de INTACGLOBIN.

II.6-Electroforesis en gel de poliacrilamida. (SDS – PAGE) para muestras de inmunoglobulinas.

La electroforesis se realizó con un gel de Acrilamida al 12,5 % en condiciones de reducción y 4 M de urea, una corriente de 35 mA y un voltaje de 120 v, utilizando una fuente PHARMACIA LKB. EPS 500/400. La electroforesis para las muestras de LPS se realizó en condiciones similares.

En cada pocillo fueron aplicados 20 µg de muestras de inmunoglobulina, Los geles fueron colocados por 12 horas en una cubeta con solución colorante (azul de Coomassie 0,02 % en ácido acético 7%), tratando que los mismos quedaran completamente cubiertos hasta completa tinción. Seguidamente para transparentar los geles se sumergieron en la solución decolorante (metanol 25 %, ácido acético 7 % v/v) ⁽¹⁰⁰⁾

II.7-Inmunotransferencia (WESTERN BLOTT)

Una vez realizada la electroforesis (bajo las mismas condiciones que la anterior), la transferencia a las membranas de Nitro celulosa (NC Hybond de 45 µm) del LPS de las cepas seleccionadas de *Pseudomonas aeruginosa* se llevaron a cabo en un equipo para transferencia seca (**PHARMACIA**) LKB, a intensidad de 300 mA y voltaje libre durante 1:30 horas. Las tiras fueron bloqueadas por espacio de 1 hora a 37° C con leche descremada al 3 % en STSF pH 7.2. Seguidamente se realizaron 5 lavados con una duración de 5 minutos y se añadieron las muestras de IgG diluidas 1:200 en solución de bloqueo con leche descremada al 1,5 % y 0,1 % de Tween 20. Se empleó como control negativo un suero libre de IgG a la misma dilución y se incubaron durante toda la noche a 4° C con agitación moderada en agitador IKA – SCHUTTIER MTS 4 . Después de lavar, se procedió al revelado, añadiéndose el conjugado peroxidasa – anti IGg humana (SIGMA, USA) diluido 1:1000 y se incubó 2 h a temperatura ambiente. Se realizó un lavado y se empleó como sustrato una solución de Peróxido de Hidrógeno y 3,3 diaminobencidina. La reacción se detuvo cuando se observaron las bandas de reconocimiento biológico. ⁽⁹⁸⁾

II.8 Ensayo de evaluación del preparado de inmunoglobulinas.

II. 8.1- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

Se emplearon cepas clínicas de *P. aeruginosa* pertenecientes a la colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial de la Universidad de Oriente, de los serotipos O8, O11, O13, O15, O16. Las cepas fueron extraídas del medio de conservación y cultivadas en cuñas de agar nutriente (BIOCEN) e incubadas a 37° C x 48 horas, hasta su uso. ⁽¹⁰¹⁾

II.8.2- Animales

Se emplearon ratones isogénicos de la línea Balb/c, de 18 – 22 g de peso, de 6 – 8 semanas de nacidos; procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) con certificado de salud conforme con las exigencias requeridas para este tipo de trabajo. Los ratones fueron mantenidos en condiciones de alimentación y cuidado, según los parámetros establecidos para la especie. ^(102, 103)

II.8.3- Intacglobín

Inmunoglobulina Intravenosa de molécula intacta de producción nacional fundamentalmente compuesta por IgG, obtenida del fraccionamiento con etanol en frío a partir del plasma de más de mil donantes de Banco de Sangre. La misma posee un repertorio de inmunoglobulinas dirigidas contra diferentes epítopes bacterianos y de otros microorganismos. Estudios anteriores han demostrado la presencia de inmunoglobulinas anti *Pseudomonas aeruginosa* en este preparado ^(87,104)

Fuente de Plasma: Plasma de mil donantes de Banco de Sangre supuestamente sanos.

Concentración de proteínas (IgG): 50 mg/mL

Controles virus VIH, VHB, VHC y serología: Negativos.

Controles de esterilidad y seguridad inespecífica en ratones y curieles: Satisfactorios

Pirogenicidad: Apirogénica

pH ajustado: 4,5 ± 0,5

Pureza Electroforética: 100 %

Polímeros y Fragmentos: No más del 10 %

Monómeros: No más del 90 %

II.8.4- Preparado de Inmunoglobulinas.

Se empleó un pool de cuatro lotes del Preparado de Inmunoglobulinas anti LPS de *Pseudomonas aeruginosa* O11 obtenido por nuestro grupo de trabajo en el Departamento de Sueros y Diagnóstico del Instituto Finlay, cuyas características se relacionan a continuación. ⁽¹⁰⁵⁾

Fuente de Plasma: Plasma de donantes supuestamente sanos del Banco de Sangre (Marianao).

Concentración de proteínas (IgG): 35 mg/mL

Controles virus VIH, VHB, VHC y serología: Negativos.

Controles de esterilidad: Estéril

Pirogenicidad: Apirogénica

pH ajustado: 4,5 ± 0,5

Pureza Electroforética: 40 %

II.8.5- Dosis Letal Mínima.

II.8.5.1- Preparación del inóculo.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* serotipo O11 fue sembrada en cuñas de agar nutriente (Oxoid), incubada a 37° C por 24 horas. La siembra fue arrastrada con 3 mL de caldo nutriente, e inoculada en un erlenmeyer con 150 mL de caldo nutriente; este fue colocado en zaranda con agitación a razón de 120 rpm, a temperatura de 37° C por 5 h. Transcurrido este periodo se procedió a centrifugar el cultivo a 2 600 g por 20 minutos para separar el medio de cultivo, cuidando de no dañar la estructura bacteriana. Se realizaron dos lavados más a la misma velocidad por 10 minutos con solución salina fisiológica. El cultivo celular fue resuspendido en 10 mL de Solución Salina fisiológica (SSF), se le midió la absorbancia a 660 nm, y se ajustó la concentración. Se realizaron diluciones decimales seriadas desde 10^{10} hasta 10^3 .^(9, 106) A los animales se le realizaron observaciones clínicas post-inoculación con el objetivo de determinar signos o síntomas, así como muertes que pudieran producirse.

II.8.5.2- Determinación de la Dosis Letal mínima

Se crearon 8 grupos de 8 ratones (un grupo de trabajo para cada dilución del inóculo) con un grupo control. Se inoculó el germen a los ocho grupos de trabajo y al grupo control le fue inoculado SSF. Los animales fueron observados durante 7 días registrándose cada 12 h las muertes ocurridas. A partir del total de muertes registradas, para cada dosis de bacterias se calcularon las mortalidades acumuladas⁽¹⁰⁷⁾ y por análisis de regresión no lineal se obtuvo la mejor curva de ajuste para los puntos de dosis - mortalidad acumulada, empleando el modelo de E_{max} sigmoidea.

Mortalidad (%) = $100 \frac{D^n}{(DL_{50}^n + D^n)}$ Donde D = dosis de bacteria.

n = pendiente de la sigmoide

II.8.6- Determinación de la capacidad protectora del Preparado de Inmunoglobulinas

Se crearon 2 grupos de trabajo correspondientes a las dosis 10^9 y 10^{10} formado por 24 animales cada uno y un grupo control de 8. Se aplicaron 15,4 mg de Intacglobín y del Preparado de Inmunoglobulinas anti LPS 6 horas antes del reto bacteriano. La experiencia se repitió en tres oportunidades.⁽¹⁰⁸⁾

II.8.7- Ensayo de inhibición de la actividad protectora del preparado de inmunoglobulinas.

Se realizaron dos experimentos con 5 grupos de 8 animales cada uno y un grupo control. Los animales fueron inoculados con 500 µl de las variantes de trabajo: Ambos experimentos fueron realizados por triplicado.

Experimento 1: Todos los animales sometidos al ensayo (excepto el grupo control positivo) fueron protegidos con el preparado de inmunoglobulinas anti *Pseudomonas aeruginosa* serotipo O11. Pasadas 6 horas, cada grupo fue retado con una suspensión bacteriana de la cepa O11 ajustada a concentración de 10^9 UFC/ml con Solución Salina Fisiológica. El grupo control luego de la protección fue inoculado a las 6 horas con Solución Salina Fisiológica. ⁽¹⁰⁸⁾

Experimento 2: Del Preparado de Inmunoglobulinas se tomaron 5 alícuotas de 1000 µl cada una y estas fueron previamente incubadas durante 1h a 37°C en agitación con 300 µg de cada uno de los lipopolisacáridos purificados de las cepas O8, O11, O13, O15, O16 de *P. aeruginosa*. Seguidamente fueron centrifugadas a 2 000 g durante 10 minutos a 4°C con el objetivo de separar en el sedimento el complejo antígeno – anticuerpo formado. Pasadas 6 h de administrado por vía intraperitoneal el preparado de inmunoglobulinas, todos los animales (incluyendo el grupo control) fueron retados por la misma vía con 500µl, del inóculo de la cepa O11, ajustada a la misma concentración. ⁽¹⁰⁹⁾

II.9- Análisis estadístico.

Los datos resultantes de los experimentos, fueron procesados en el laboratorio sobre una base de datos de Microsoft Excel/97. Además se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de clasificación simple ($p < 0.05$), análisis de regresión no lineal ($p < 0.001$), X^2 ($p < 0,05$) y desviación estándar aplicando el STATISTIC GRAPHICS/ 2001. ⁽¹⁰⁷⁾

III- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El ensayo Dot - Blot demostró que los serotipos mayormente reconocidos por los sueros en orden descendente fueron O11, O16, O15, O13, O8. En este trabajo los serotipos O13, O16 y O8 muestran una circulación significativa no informada por ningún autor hasta el momento. Este hecho pudiera deberse a la posibilidad de que estos serotipos estén circulando entre la población estudiada y a la existencia de reacciones cruzadas entre ellos y el serotipo O11.

Este planteamiento concuerda con trabajos llevados a cabo por Yokota et. al. ⁽²⁸⁾ quienes demostraron la existencia de reacciones cruzadas entre los diferentes serotipos de *Pseudomonas aeruginosa* por el reconocimiento de epítopes comunes en la región O polisacáridica del LPS. Similares resultados fueron obtenidos por Cobas et. al. en 1996 ⁽²⁹⁾ para los serotipos O11, O15 y O4 en trabajos realizados en Santiago de Cuba.

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos al enfrentar los sueros de donantes a las muestras de LPS aislados de diferentes serotipos de *P. aeruginosa* y la frecuencia de reconocimiento de los mismos.

De un total de 104 sueros testados, 91 reconocieron al LPS del serotipo O11, con una frecuencia de 94.64 % dentro de la población estudiada, demostrando que estos donantes en cierto momento de sus vidas tuvieron algún tipo de contacto, con *P. aeruginosa*. Además, estos resultados nos ofrecen una visión más exacta de la prevalencia de *P. aeruginosa* en el área de salud estudiada y la circulación predominante que tiene el serotipo O11 en nuestro país. Esta alta tasa de reconocimiento demuestra la capacidad inmunogénica del LPS, independientemente de la sensibilidad del método inmunoquímico aplicado.

A continuación se encuentran el O16, O15, O13 y el O8, con una frecuencia de reconocimiento por los sueros de donantes de 66.56 %, 62.40 % y 61.36 %, respectivamente, mostrando idéntica frecuencia los serotipos O13 y O8.

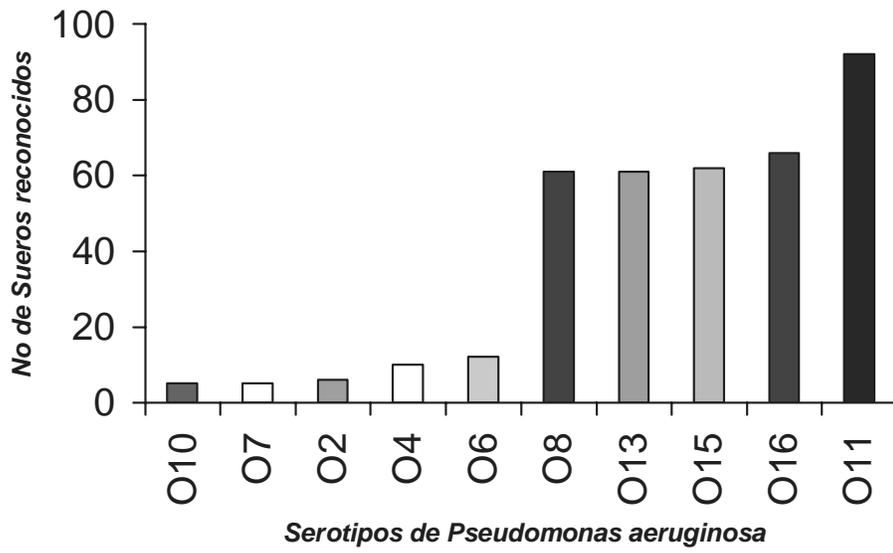


Figura 5 Reconocimiento del antígeno Lipopolisacárido de *P. aeruginosa* por los sueros de donantes

Todos los sueros que mostraron reconocimiento al enfrentarlos al lipopolisacárido serotipo O11 en el ensayo Dot Blot fueron analizados a través de un ELISA indirecto cualitativo anti LPS O11. Para este ensayo los sueros fueron calificados en positivos y negativos, atendiendo al valor de corte (0,29) prefijado, de estos fueron seleccionados 50 sueros que mostraron un título superior a dicho valor de corte.

Con el desarrollo de las biotecnologías los métodos de aislamiento y purificación de proteínas, tienden a ser cada vez más específicos, sencillos y eficientes, posibilitando la elevación de los rendimientos y la disminución de los costos.

En Cuba para la obtención de Inmunoglobulinas se aplica el método de Cohn modificado por Cádiz y col. ⁽⁸⁸⁾ que reduce el Método de Cohn original a solo tres etapas, a pesar de que se le incluye un paso de ultrafiltración; manteniéndose los mismos parámetros de calidad para el producto final. Esta variante resulta más económica y ventajosa, proporcionando entre otras cosas, ahorro de energía eléctrica y reactivos y eliminación de contaminantes de bajo peso molecular, además de la eliminación del paso de liofilización.

Partiendo de 2 L de plasma en el precipitado del primer paso de Fraccionamiento (Pptdo I+II+III) se obtuvieron 80, 75, 82 y 84 g de pasta por lote, de ellos aproximadamente la cuarta parte es IgG. Con la aplicación

de etanol al 20 % se obtuvo una fracción, en la cual se consiguió eliminar en buena medida, algunas moléculas de alto peso molecular del suero, que constituyen contaminantes. A continuación se aplican dos gradientes de concentración de etanol (13 y 25 %), con ello se eliminaron todos aquellos contaminantes de alto peso molecular del suero, que aún permanecían en la muestra a purificar. Los de bajo peso molecular como el etanol deben ser eliminados en la etapa de ultrafiltración, último paso de la purificación. Con esta metodología se obtuvieron 4 lotes del preparado de inmunoglobulinas con aceptables niveles de pureza.

Esta variante permitió obtener altos valores de rendimiento, cuyo promedio 6,525 g/L supera el intervalo de valores que históricamente se refieren en el laboratorio por el método de Fraccionamiento alcohólico para inmunoglobulinas intravenosas, los cuales oscilan entre 2 – 5 g/L. ⁽¹¹⁰⁾ Algunos autores que han modificado el método de Cohn, plantean que el rendimiento óptimo a nivel de laboratorio debe tener valores superiores a 3,8 g/L; ⁽¹¹¹⁾ los valores obtenidos superan este valor si comparamos el rendimiento para los cuatro lotes en el laboratorio con el rendimiento promedio del Intacglobín a escala industrial (3 g/L) y con el de las

inmunoglobulinas de uso intramuscular (3,8 g/L). Ello constituye un resultado alentador y abre grandes expectativas para su posterior escalado.

Como en todo proceso de purificación, se han producido pérdidas, las mismas pudieran estar asociadas a la manipulación, pérdidas mecánicas o en el proceso de centrifugación; que para los cuatro lotes fueron aproximadamente iguales, siendo este aspecto uno de los puntos en que el proceso industrial supera a esta técnica desarrollada en el laboratorio.

Como se puede apreciar en la tabla 2 luego del fraccionamiento se obtienen rendimientos superiores (7,27 - 6.00 g/L), a los conseguidos durante la obtención industrial del INTACGLOBIN (5 g/L).

En todos los lotes los valores resultaron similares lo que nos ofrece una idea de la consistencia de la variante del método de Cohn empleada, en comparación con otros métodos de fraccionamiento que normalmente se realizan usando alcohol como agente precipitante.

El mayor rendimiento en el proceso fue el del Lote I y el de menor rendimiento el Lote II. Sin embargo, los valores se encuentran dentro de los esperados, pues el empleo de la ultrafiltración en este procedimiento permitió obtener una mayor concentración de inmunoglobulina por litro de plasma fraccionado.

Se realizó una electroforesis por SDS PAGE para los cuatro lotes del preparado de inmunoglobulina obtenido, empleándose como patrón el INTACGLOBIN. (Figura 6).

Se aprecian dos bandas bien definidas correspondientes a las cadenas pesadas y otras correspondientes a las cadenas ligeras de la IgG. Este efecto tiene su origen en las condiciones de reducción bajo las cuales se desarrolló la electroforesis, las cuales provocan la ruptura de los puentes disulfuros (S-S), a través de los cuales están unidas ambas cadenas. Al tener lugar este evento las cadenas quedan separadas y migran independientes, produciéndose una mayor migración de las cadenas ligeras, dada su menor masa molecular.

⁽¹¹²⁾ Además de las dos bandas ya referidas aparecen otras menos definidas correspondientes a contaminantes que no se aprecian para el INTACGLOBÍN. Es probable que esta situación esté estrechamente relacionada con la no utilización en este trabajo de la adsorción con SEPHADEX, para eliminar trazas de IgA, IgM, calicreína, péptidos vasoactivos, plasminógeno y cualquier otro contaminante.

El proceso de extracción y purificación del LPS de *P. aeruginosa* llevado a cabo, nos permitió obtener productos con bajos niveles de contaminantes. (Tabla 3)

Los LPS de los serotipos O2, O11, O12, O13 y O16 mostraron rendimientos superiores al promedio obtenido, mientras que O4, O7, O8 y O15 estuvieron por debajo. Por lo tanto, se observa que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto al rendimiento de LPS alcanzado a partir de los diferentes

Tabla 2. Análisis del recobrado de inmunoglobulinas por etapas del método de fraccionamiento alcohólico utilizado.

Lote	Vol.(mL) plasma	Ppdo (g) I+II+III	IgG en ppdo I+II+III	Ppdo II (g)	IgG en ppdo II (g)	IgG Ultrafilt	Recobrado x litro (g/L)
I	2000	80	21	32	15	14,5	7,25
II	2000	75	20	27	12	12,0	6,00
III	2000	82	19	30	13	12,7	6,35
IV	2000	84	20	30	14	13,0	6,50

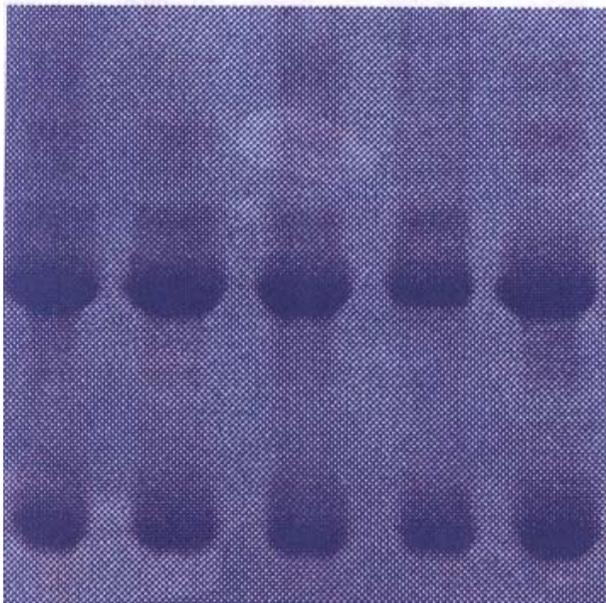


Figura 6. Electroforesis en gel de Poliacrilamida PAGE SDS.

1. Lote I
2. Lote II
3. Lote III
4. Lote IV
5. INTACGLOBIN

1 2 3 4 5

serotipos utilizados. Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos por Hatano y Masoud, en 1994, ⁽¹¹³⁾ los que registraron valores que oscilan en el intervalo de 1-3 mg/g de biomasa bacteriana húmeda en las cepas analizadas, aplicando el mismo método de extracción utilizado en nuestro trabajo.

El serotipo O7 fue el de menor rendimiento. Esto se debe fundamentalmente a que la purificación de LPS, empleando el método de fenol acuoso de Westphal y Jann, ⁽¹¹⁴⁾ permite extraer con elevados rendimientos los LPS de cadenas O-laterales largas debido a sus características hidrofílicas. Ha sido reportado por Pitt ⁽¹⁾ que el serotipo O7 no presenta estas cadenas O-laterales largas y es definido como semi-rugoso y con características semi-hidrofílicas. Esta pudiera ser la causa del bajo recobrado obtenido utilizando esta metodología. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Schiller et al. ⁽¹¹⁵⁾

Los contaminantes en el LPS fueron evaluados por SDS-PAGE y tinción con plata. Se observa el perfil migratorio correspondiente a las bandas características de los LPS purificados, no evidenciándose la presencia de bandas de proteínas contaminantes. Se demuestra la efectividad de la digestión enzimática mediante el empleo de la Pronasa y el grado de pureza de nuestro producto. (Figura 7)

Para analizar hacia que zona de la estructura antigénica está dirigida la actividad de este Preparado de Inmunoglobulinas se desarrolló un ensayo Western Blott. E en la Figura 8 se muestran los resultados de este ensayo, en el cual se observa un reconocimiento específico para todos los lotes del preparado de inmunoglobulinas. El mismo fue superior al observado para el INTACGLOBÍN; con un patrón de bandas definido principalmente en dos regiones; una superior correspondiente a la O sacarídica del LPS y otra región inferior, correspondiente al Lípido A y el core. Esto pudiera estar determinado principalmente por la alta inmunogenicidad del Lípido A y para la cual está dirigida específicamente la síntesis de anticuerpos dentro de la molécula del LPS. De este reconocimiento se infiere que los contaminantes que aún persisten en el producto final no ejercen ninguna interferencia, ni limitan la acción del Preparado de Inmunoglobulinas.

Para el INTACGLOBÍN se aprecia un marcado reconocimiento del antígeno en cuestión, lo que evidencia la existencia este preparado de anticuerpos; el cual reconoce los epítopes del LPS. De este reconocimiento se deriva la actividad anti *Pseudomonas aeruginosa* que muestra este tipo de producto. Los resultados obtenidos

Tabla 3. Rendimiento de LPS purificado y niveles de contaminantes.

LPS de serotipos	O2	O4	O6	O7	O8	O10	O11	O12	O13	O15	O16	Promed.
mg LPS/g de biomasa húmeda	4.58	3.00	4.30	1.77	2.98	3.08	5.12	6.23	4.73	3.15	4.71	3.96

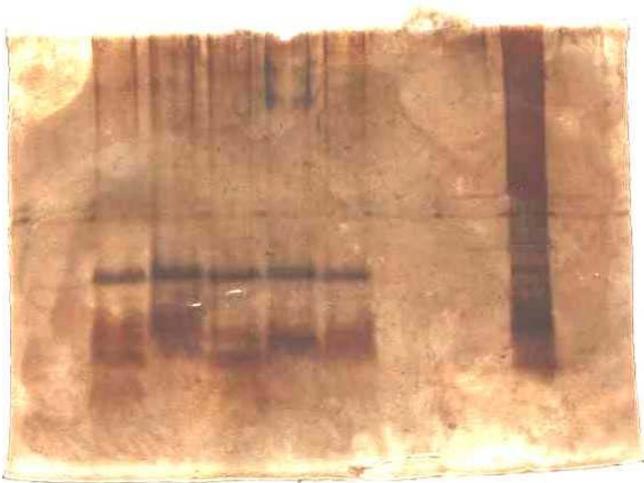


Figura 7. Electroforesis en Gel de Poliacrilamida y tinción con plata de los LPS.

Patrón de LPS.

Muestras:

1. LPS O8

2. LPS O11

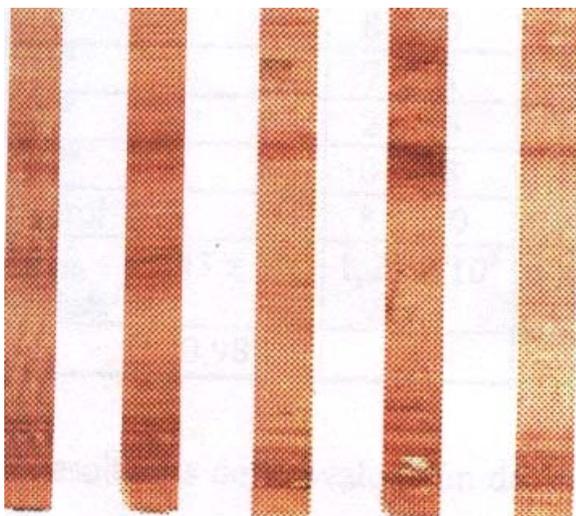


Figura 8. WESTERN BLOT de la actividad anti LPS de los 4 lotes de IgG y el INTACGLOBÍN

1. Lote I

2. Lote II

3. Lote III

4. Lote IV

5. INTACGLOBIN

en el ensayo coinciden con lo esperado y para corroborar los mismos se desarrollaron dos ensayos en animales.

La administración pasiva de anticuerpos policlonales o monoclonales antes de la infección por *P. aeruginosa* constituye una ventaja potencial, ya que se proporcionan altos títulos de anticuerpos de forma inmediata a los individuos susceptibles a contraer la infección. ^(116, 117)

Para evaluar la capacidad protectora del preparado de inmunoglobulinas se procedió a determinar la Dosis Letal mínima y la DL₅₀; los resultados están reflejados en la tabla 4.

Como se puede apreciar en el intervalo de dosis comprendido entre 10³ y 10⁷ ocurrieron solo 4 muertes, en ninguno de los casos atribuibles a la inoculación de dichas cargas bacterianas; dado que los síntomas que presentaban los animales no indicaban que se había instaurado proceso infeccioso

Alguno. Para la dosis de 10⁸ ocurrieron 4 muertes, ocurridas en ensayos separados, es decir en las dos últimas réplicas; 3 en una y 1 en la otra. En ambos casos los animales fallecidos mostraron síntomas típicos de la instauración de un proceso bacteriémico como piloerección, somnolencia prolongada, disminución de la actividad motora, secreciones oculares y postración, ocurriendo la totalidad de las muertes entre las primeras 12 y 72 horas después del reto, resultados similares a los obtenidos por Cobas y col. en 1997. ⁽¹⁰²⁾

La dosis de microorganismo correspondiente a 10¹⁰ provocó la muerte de la totalidad de los animales de experimentación en las tres réplicas del ensayo y en el 100 % de los casos las muertes se produjeron en las primeras 24 horas de retados los animales.

La dosis 10⁹ causó la muerte al 87,5 % de los animales, mostrándose en todos los animales la sintomatología anteriormente señalada, ocurriendo las muertes entre las 24 y 48 horas después del reto bacteriano con la cepa O11 de *P. aeruginosa*.

En las figuras 9, 10, 11 se grafican el número de muertes vs dosis de microorganismo inoculada para cada uno de los experimentos, de las cuales se puede determinar las DL₅₀ aproximadas por interpolación.

La administración profiláctica de plasma o globulina sérica inmune se ha comprobado que evita la muertes por sepsis, especialmente por *Pseudomonas* de un modo más eficaz que el suero salino, en pacientes que han sufrido quemaduras de más del 30 %. El tratamiento con plasma es también muy eficaz al igual que la globulina sérica inmune en la prevención de infecciones por *P. aeruginosa* ⁽⁸⁵⁾ En estudios llevados a cabo en Sancti Spíritus usando la inmunoglobulina de molécula intacta (INTACGLOBÍN), asociado al tratamiento antibiótico, en un grupo con 80 pacientes de ambos sexos ingresados en una unidad de cuidados intensivos y

Tabla 4 Datos del en sayo para determinar la dosis letal mínima.

Dilución UFC/mL	Experimento					
	I		II		III	
	V	M	V	M	V	M
10 ³	7	1	8	0	8	0
10 ⁴	8	0	8	0	6	2
10 ⁵	8	0	8	0	8	0
10 ⁶	7	1	8	0	8	0
10 ⁷	8	0	8	0	8	0
10 ⁸	8	0	7	1	7	1
10 ⁹	0	8	2	6	1	7
10 ¹⁰	0	8	0	8	0	8
Control	8	0	8	0	8	0
DL ₅₀ Calculada	1, 43 x 10 ⁸		1,27 x 10 ⁸		1,21 x 10 ⁸	
R	0,988		1		0,99	

V= Animales vivos M= Animales muertos

portadores de sepsis grave causada por múltiples agentes etiológicos, entre ellos *P. aeruginosa*, arrojó efectividad de 86 % en la erradicación del germen a pesar de no ser una inmunoglobulina específica contra *P. aeruginosa*.⁽⁸⁷⁾

La tabla 5 muestra los resultados del ensayo para evaluar la capacidad protectora del Preparado de Inmunoglobulinas. En la misma se aprecia que la dosis de reto 10^{10} provocó la muerte al 100 % de los animales de experimentación, incluyendo el grupo control que en ninguno de los dos casos estaban protegidos; demostrando que esta dosis superó ampliamente las potencialidades de protección tanto para el Preparado de Inmunoglobulinas como para el INTACGLOBÍN.⁽¹⁰³⁾

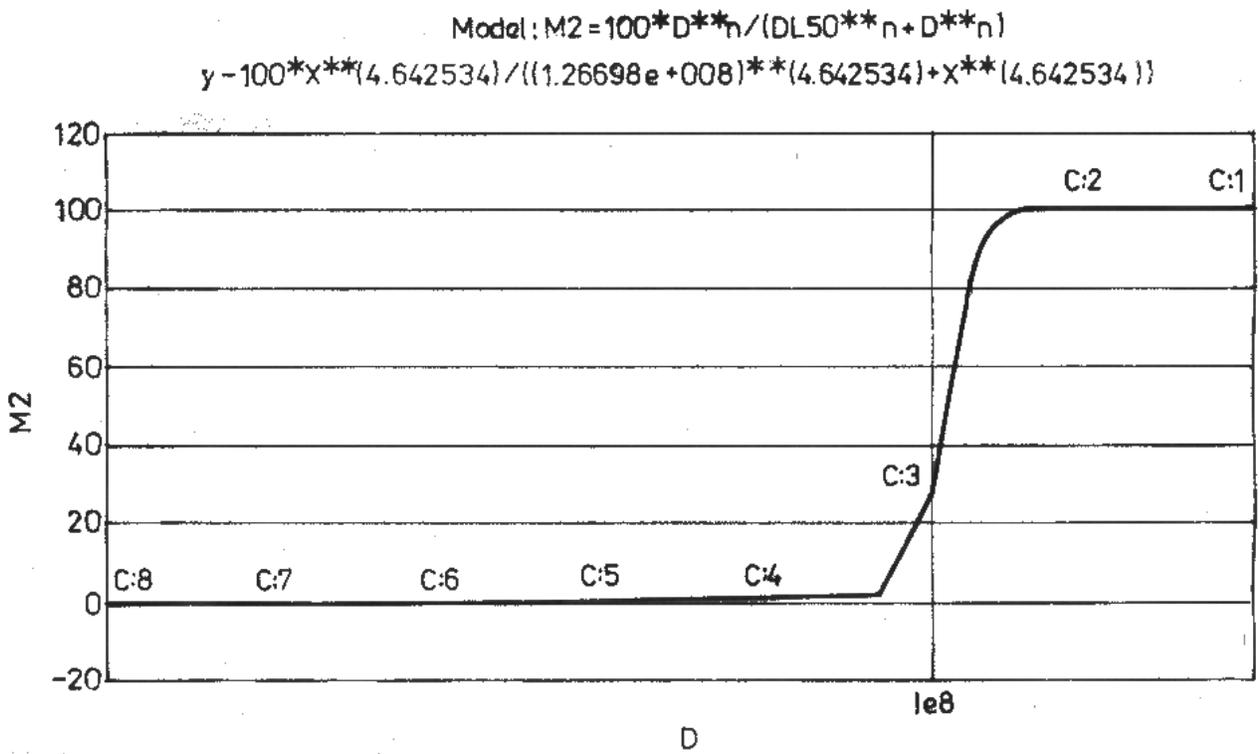
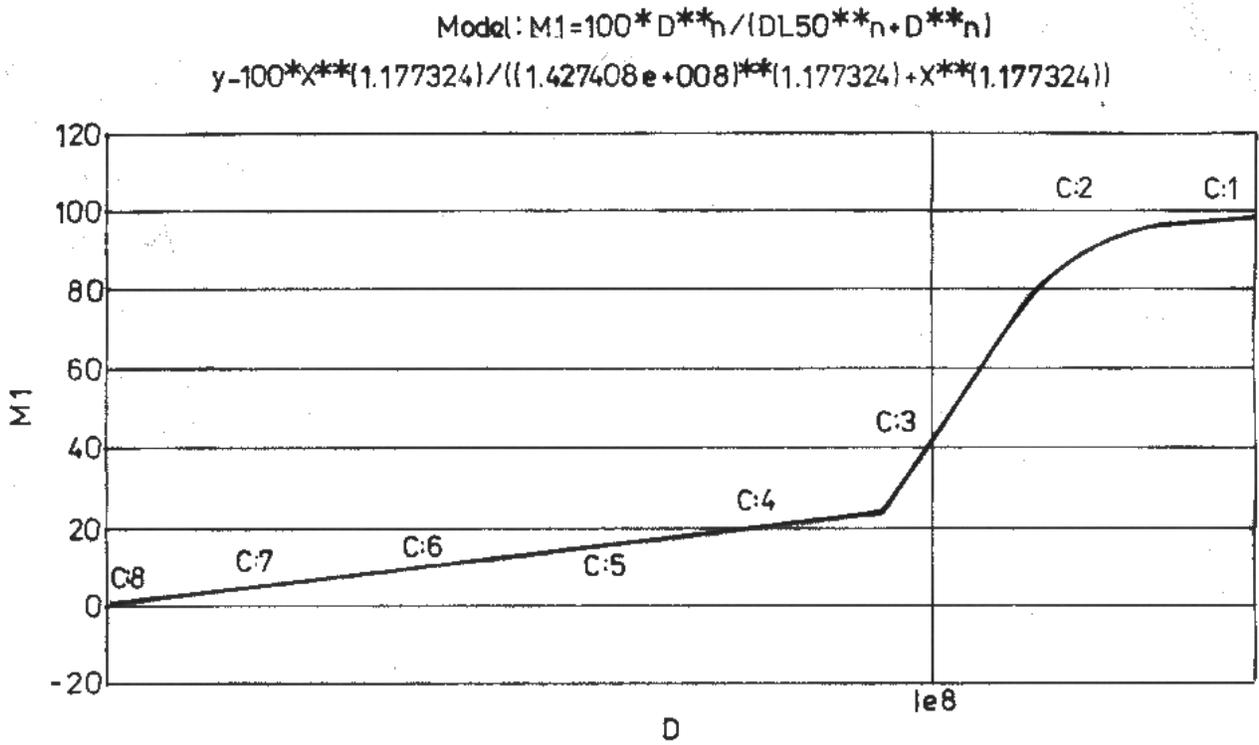
Por el contrario la dosis de reto 10^9 provocó el total de las muertes para el grupo control, no así para el grupo protegido con el INTACGLOBÍN, para el cual se obtuvo 75 % de supervivencia, los animales que fueron protegidos con el Preparado de Inmunoglobulina exhibieron un 91,66 %

de supervivencia. La respuesta inmune humoral contra productos bacterianos se produce como consecuencia de la exposición antigénica. Inicialmente, ante cualquier reto bacteriano se sintetiza IgM con una pequeña síntesis de IgG e IgA; luego en un segundo reto con el mismo antígeno, la respuesta principal es del tipo IgG. El patrón de anticuerpos difiere según la ruta o sitio de inmunización, influido por factores tales como la edad y el tiempo de exposición al antígeno, entre otros.^(80, 81, 82)

El modelo de E_{max} sigmoidea mostró un buen ajuste a los datos de dosis - mortalidad obtenidos en los ensayos de estimación de la DL_{50} . En todos los casos se obtuvieron valores de R superiores a 0.98, según el modelo empleado no existen diferencias estadísticamente significativas entre animales protegidos con el preparado de inmunoglobulinas y los protegidos con el Intacglobín, para el tamaño de muestra ensayado, siendo extremadamente significativas las diferencias existentes entre animales protegidos y los animales no protegidos, ($p < 0.001$) resultando ser *P. aeruginosa* muy virulenta para el ratón Balb/c, mostrándose muy distintos los grupo tratados respecto al control, estimándose una DL_{50} calculada (promedio de tres ensayos) de $1,30 \times 10^8$ (desviación estandar $1,11 \times 10^7$).

Datos recientes de ensayos *in vitro* indican que las preparaciones de IgG humano que contienen títulos protectores de anticuerpos suelen ser eficaces en la disminución de la motilidad flagelar y con ello de la viabilidad del germen en cuestión.⁽¹¹⁵⁾

Los resultados han demostrado que aun cuando las dosis de reto son elevadas, el preparado de inmunoglobulina anti *P. aeruginosa* posee efectos protectores en el ratón Balb/c, los cuales podrían tenerse en consideración para el futuro arsenal terapéutico contra dicha bacteria.



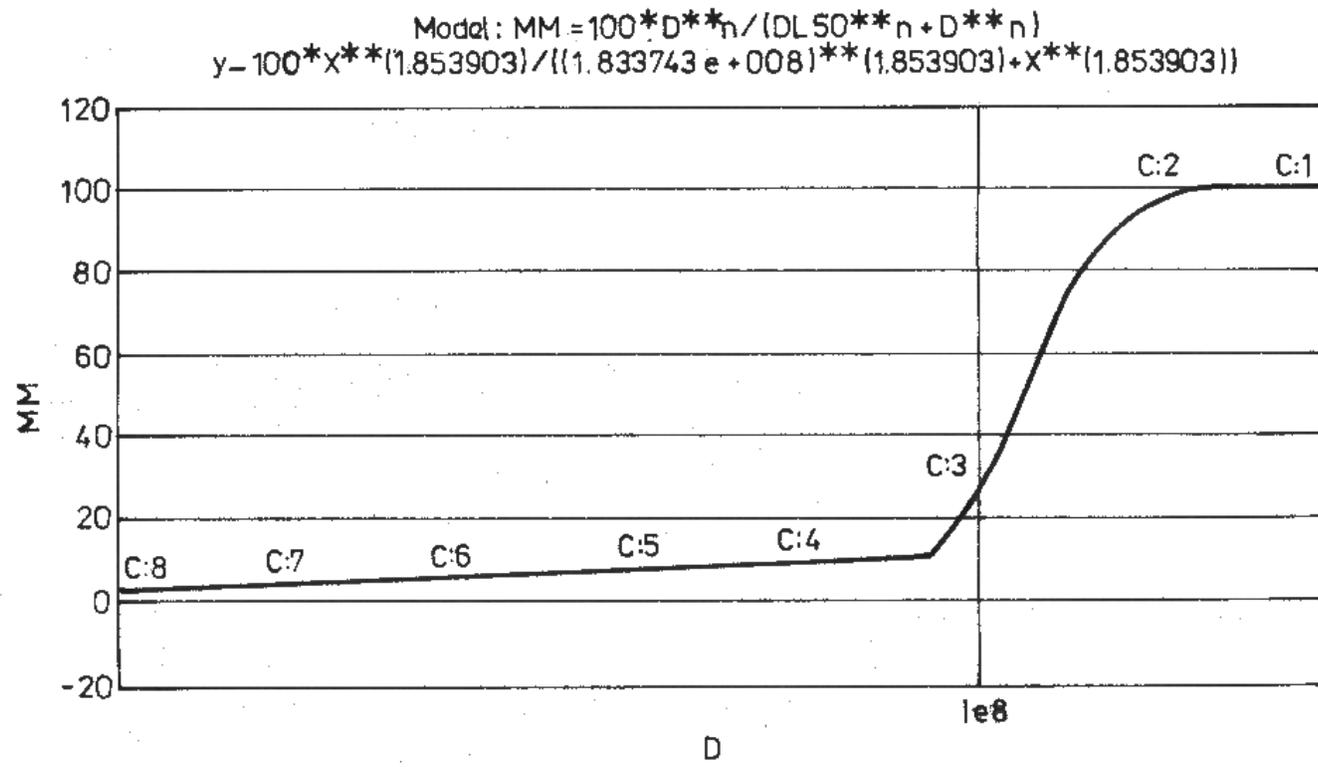
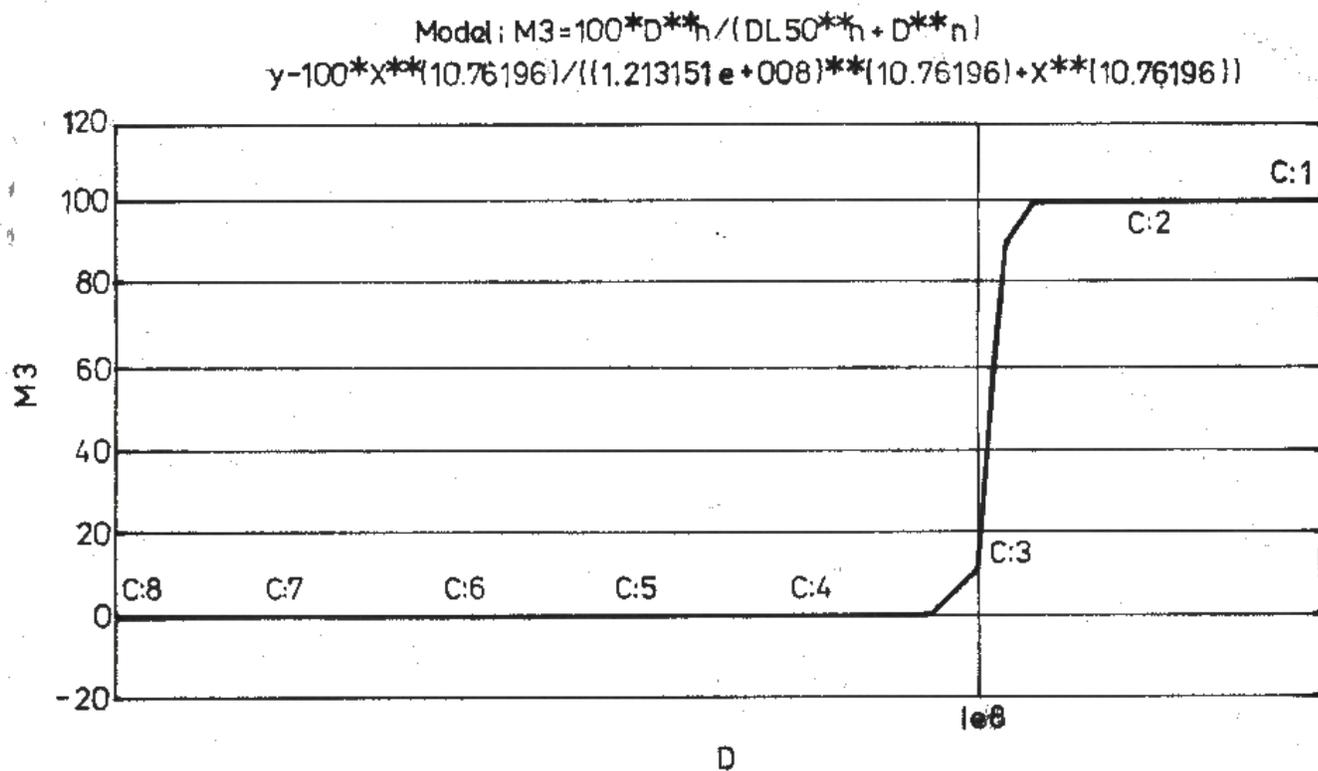


Tabla 5 Resultados del ensayo de evaluación de la capacidad protectora del Preparado de Inmunoglobulinas.

Inóculo	Tratamiento	M. 1	M. 2	M. 3	Muertos	Mort. (%)	Protecc. (%)
10¹⁰	Intacglobín	8	8	8	24	100	0
	Prep. Immun.	8	8	8	24	100	0
	Control	8	8	8	24	100	0
10⁹	Intacglobín	8	8	8	6	25	75 a
	Prep. Immun.	8	8	8	2	8,33	91,66 a
	Control	8	8	8	24	100	0 b

M = Muestra

La administración pasiva de anticuerpos contra los antígenos O polisacáridicos de *P. aeruginosa* ha demostrado ser protector en los biomodelos experimentales de infección contra *P. aeruginosa*. Los anticuerpos humanos contra estos antígenos serían ideales para el uso clínico en grupos de pacientes de alto riesgo. ^(117, 118)

Se han demostrado beneficios de las inmunoglobulinas polivalentes en modelos animales de sepsis, muchos de estos estudios evidencian que tales efectos son más pronunciados cuando las inmunoglobulinas intravenosas son administradas antes o durante el reto bacteriano. Por investigaciones recientes se conoce que el efecto potencial de las inmunoglobulinas intravenosas en las sepsis establecidas, esta relacionado con la capacidad de inhibir la liberación de mediadores proinflamatorios. ⁽¹¹⁵⁾ La inhibición por inmunoglobulinas intravenosas del factor de necrosis tumoral alfa, interleuquina 1 y la liberación de monocitos ha sido relacionada con la presencia de anticuerpos anti LPS en estos tipos de preparados de anticuerpos. ⁽¹¹⁶⁾

Del ensayo de inhibición, tablas # 6 a y 6 b; se obtuvo como resultado que la supervivencia de los animales inoculados estaba estrechamente relacionada con la variante empleada.

En el experimento 1, un **28,47%** de los animales sometidos al ensayo consiguió sobrevivir a la bacteriemia provocada por la cepa O11 de *P. aeruginosa*, estando muy estrechamente relacionada la suerte de los animales a la especificidad del Preparado de Inmunoglobulinas en el caso del grupo retado con el serotipo O11 y a la existencia de reacciones cruzadas entre este serotipo y el resto de los serotipos incluidos en este ensayo.

Esta última afirmación concuerda con trabajos realizados por Yokota et al, ⁽²⁷⁾ quienes demostraron la existencia de reacciones cruzadas entre los diferentes serotipos de *P. aeruginosa*, por el reconocimiento de epitopes comunes en la región O-polisacáridica del LPS, similares resultados fueron encontrados por Cobas y col, ⁽¹⁰²⁾ para los serotipos O11, O15 y el O13, en trabajos desarrollados en la provincia de Santiago de Cuba. La ocurrencia de reacciones cruzadas entre los serotipos ha sido también referida por Vale y Lam, quienes abordaron el tema de la reactividad inespecífica de estos serotipos clasificados por ellos mismos como "estrechamente relacionados", mediante el empleo de anticuerpos monoclonales para su subdivisión. ^(117, 118)

En el experimento 2 se provocó la muerte del 100% de los animales de experimentación pasadas 96 horas de haber retado los animales.

Tabla 6 Resultados del ensayo de inhibición de la capacidad protectora del preparado de inmunoglobulinas.

Experimento # 1

SEROTIPOS	O7	O11	O13	O15	O16	CONTR OL	TOTAL
# de animales	24	24	24	24	24	24	144
Variante (1) Prep. Inmunoglobulinas + reto a las 6 horas.	Vivos 10	Vivos 24	Vivos 13	Vivos 10	Vivos 9	Vivos 0	% Sobrev 28,47

Experimento # 2

# DE ANIMALES	24	24	24	24	24	24	144
Variante (2) Prep. Inmunoglobulinas + incubación con LPS específicos + reto a las 6 horas.	Vivos 0	Vivos 0	Vivos 0	Vivos 0	Vivos 0	Vivos 0	% Sobrev 0

A partir de las 18 horas comenzaron a producirse las muertes de los animales con la sintomatología propia de la infección por *P. aeruginosa*, aumentando esta en la medida en que transcurre el tiempo. Al incubarse los LPS de las cepas ensayadas con el preparado de inmunoglobulinas, se produce la reacción antígeno anticuerpo, producto del reconocimiento de los antígenos (LPS) por el preparado de inmunoglobulinas, dando como resultado la formación del inmunocomplejo antígeno – anticuerpo. Al ser éste sometido posteriormente a un proceso de centrifugación, este complejo precipita, eliminándose de esta forma los anticuerpos protectores en el preparado, estando de esta manera el preparado de inmunoglobulinas impedido de ejercer su acción contra la infección causada por la cepa O11 de *P. aeruginosa*. Este resultado confirma que la respuesta anti-*Pseudomonas* presente en el preparado de inmunoglobulinas es mayoritariamente anti-LPS. Figura 12

A continuación se estudió la dependencia estadística entre los tratamientos y las respuestas, siempre que el valor de la probabilidad de cometer error tipo I sea $p < 0,05$ (tabla 7)

El valor de χ^2 es estadísticamente significativo, ⁽¹⁰⁷⁾ por tanto queda demostrado la dependencia estadística entre tratamientos y respuestas, es decir que la supervivencia de los animales sometidos al ensayo depende de la protección que ofrece el preparado de inmunoglobulinas y la existencia de las reacciones cruzadas entre el serotipo O11 y el resto.

En el tratamiento de las bacteriemias causadas por *P. aeruginosa* se han empleado antibióticos de 1^{era}, 2^{da} y 3^{ra} generación como son penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, imeropén, quinolonas etc.; para los cuales este germen ha desarrollado resistencia como resultado de sus mecanismos de adaptación. En el caso de las vacunas, diversos investigadores han estudiado hasta el momento varias estructuras antigénicas de *P. aeruginosa* como Pili, flagelo, LPS, PME, exotoxina A y S como posibles candidatos vacunales y los resultados obtenidos parecen ser alentadores. Sin embargo, pensamos que la terapia más efectiva para disminuir o erradicar los efectos de la colonización por este microorganismo no debe estar dirigida hacia la producción y aplicación de vacunas ya que el organismo humano provisto de un sistema inmune competente es capaz de combatir la infección; sólo cuando se produce una disminución de las defensas normales es que tiene lugar la agudización de la enfermedad, generando shock séptico y puede ocasionar incluso la muerte. Ha sido difícil demostrar la eficacia de las inmunoglobulinas intravenosas en el tratamiento de las infecciones, en parte porque es preciso administrar altas dosis de anticuerpo para bloquear las grandes cantidades de antígeno, que se forman a medida que la infección progresa; al contrario de lo

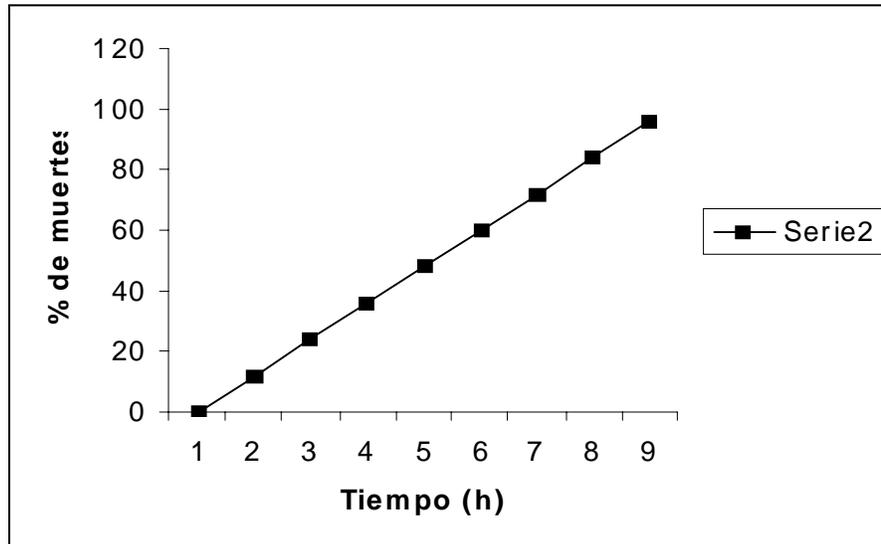


Figura 12 Inhibición de la actividad protectora del Preparado de Inmunoglobulinas, cuando se enfrenta al Lipopolisacárido de *P. aeruginosa* serotipo O11.

Tabla 7 Resultados del tratamiento estadístico entre los animales protegidos y el control no protegido.

Serotipo vs Control	χ^2	p
O7	5,58	0,182
O11		1
O13	11,08	$8,74 \times 10^{-4}$
O15	5,58	0,182
O16	4,348	0,371

que ocurre cuando se utiliza para la profilaxis. ⁽⁷¹⁾

En las infecciones experimentales en las que puede controlarse el momento de inicio de la infección, la eficacia de las inmunoglobulinas disminuye a medida que aumenta el tiempo de inicio de la infección. ⁽⁷¹⁾ En la clínica es mucho más difícil identificar el momento de inicio de una infección, además la vida media de las inmunoglobulinas disminuye en los pacientes infectados. Estas dificultades además de lo complejo y característico de cada germen en particular es lo que ha impedido poder demostrar la eficacia de las inmunoglobulinas en el tratamiento de las infecciones, especialmente en los adultos. ⁽⁶⁹⁾ Específicamente en el caso de las *Pseudomonas* los resultados han sido ambiguos y no concluyentes. ⁽⁹⁰⁾

Los resultados positivos obtenidos con el INTACGLOBIN en las unidades de cuidados intensivos fundamentalmente con sepsis grave provocada por *P. aeruginosa*, nos hicieron pensar en la posibilidad de obtener un preparado que teniendo las propiedades del INTACGLOBIN portara una concentración significativamente mayor en anticuerpos contra *P. aeruginosa*; lo que permitiría disminuir las cantidades de anticuerpos administrados evitando así la posibilidad del bloqueo de los sistemas de producción de anticuerpos en el enfermo. Este mecanismo se emplea actualmente en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes. ⁽⁸⁷⁾

Sin embargo no todos los preparados de inmunoglobulinas anti *Pseudomonas* han sido efectivos en pruebas clínicas, lo cual creemos sea debido a varias causas; entre ellas las más importantes son la variabilidad y complejidad de la estructura bacteriana que elicitla la respuesta de anticuerpo y también la clase o inclusive la subclase de anticuerpo que se forma como respuesta al estímulo bacteriano ⁽⁸⁴⁾

La vacunación contra *P. aeruginosa* no debe ser aplicada de forma masiva a todos los individuos, se considera útil en aquellos que vayan a ser intervenidos quirúrgicamente, para prevenir con su administración una posible infección con este germen durante o después de la operación o en el transcurso de la hospitalización en aquellos pacientes quemados, inmunodeprimidos, ya que como se ha planteado *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista por excelencia, responsable de un diverso espectro de infecciones en este tipo de pacientes.

Otra causa que limita la terapia con vacunas es que *P. aeruginosa* es una bacteria con gran variabilidad, posee varios serotipos que circulan en el ambiente y ha desarrollado mecanismos distintos de supervivencia, dado por su alta adaptabilidad a las condiciones medio ambientales y la versatilidad que posee para luego de implantarse evadir los mecanismos de defensa del hospedero. En este sentido el empleo de inmunoglobulinas intravenosas y su combinación con antibióticos, ha sido la terapia que mejores resultados ha mostrado tanto

en ensayos en animales como en humanos para atacar la infección por *P. aeruginosa*. Es por ello que antes de establecer un estudio basado en la vacunación de donantes con vacunas existentes, nos dimos a la tarea de estudiar cual es el estímulo natural frente a esta bacteria que presenta la población, por lo que los resultados del presente trabajo ofrecen nuevas oportunidades para la inmunoterapia.

IV- CONCLUSIONES.

- 1- Con la aplicación del método de **Fraccionamiento Alcohólico** modificado por Cádiz se consiguió obtener un preparado de inmunoglobulinas anti *P. aeruginosa* con un rendimiento del **6,525 g/L** y una pureza electroforética aceptable, comparado con la obtención industrial de Intacglobín.
- 2- El preparado de inmunoglobulinas obtenido mostró elevados niveles de protección del 91,66 % en el modelo ratón Balb/c retado con elevadas dosis de microorganismo.
- 3- Se demostró experimentalmente la existencia de reacciones cruzadas entre el serotipo O11 y el resto de los serotipos incluidos en el ensayo, así como la posible utilidad de estas reacciones cruzadas en la inmunoterapia de amplio espectro de acción contra *P. aeruginosa*.

V- RECOMENDACIONES

1- Continuar optimizando el procedimiento de obtención del preparado de inmunoglobulinas, combinando el método de purificación con otras técnicas para elevar la efectividad.

2- Realizar nuevos diseños de ensayos en animales, con muestras más amplias, así como evaluar la efectividad del Preparado de Inmunoglobulinas a diferentes dosis y a dosis repetidas.

3- Efectuar ensayos similares con los serotipos que más circulan después del O11 en futuros trabajos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Pitt T.L , Barth A.L. *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important *Pseudomonas*. Princ. and Pract. of Clin. Microbiol. 1997. 8. pp.14-8
- 2- Curso de Microbiología General de Enrique Iáñez ESTRUCTURAS SUPERFICIALES DE LA CÉLULA BACTERIANA. www.monografias.com 17/12/2005.
- 3- Microbiology: Dinamic and Diversity Jeromy J. Perry and Jame T. Staley.. ISBN 0–3 0538939 ed. Saunder Collage Publishing. 2005.
- 4- Huang X, Barrett P, McClellan A, Hazlett D. Silencing Toll-like receptor-9 in *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(11):4209-4216.
- 5- Sligl W, Taylor G, Brindley P. Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. *Int J Infect Dis* 2006; 3: 32-41.
- 6- Dulbecco D. Tratado de Microbiología con inclusión a Inmunología y Genética Molecular. Edición Salvat SA. 1978.
- 7- Frobisher M. Microbiología. Edición Salvat S A. 1976.
- 8- Jawetz E, EA Adelberg y J Melnick. *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiología Clínica. Edit. Pueblo y Educación. 1989. pag. 225-226.
- 9- Piatkin K. Y col. Microbiología. Editorial Mir. Moscú. 1986.
- 10- Nicas T, Hancock R. Outer protein HI of *Pseudomonas aeruginosa*. Involvement adaptative and mutational resistance to ethylenediaminetetraacetate polymixin and gentamycin. *J Bacterial*. 1996; 143: 872-8.
- 11- Vilar D, Jacquemin B, Díaz A, Velázquez C, Volkow P. Brote por *Pseudomonas aeruginosa*, en el área de atención ambulatoria de heridas quirúrgicas, en pacientes posmactectomizadas. *Salud Pública Méx*. 2003; 45(5): 371-8.
- 12- Cobas G, Esnard S, Ayala J, Almenares J, Sarmiento R, Fontaine R. Purificación de proteínas de membrana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Cubana Química*. 1999; XI(1): 86-93.
- 13- Yamila Lebeque Pérez, Humberto Morris Quevedo, Nerys Calás Viamonte. Infecciones Nosocomiales: Incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Cubana Med*. 2006; 45(1)

- 14- Gloria Soberón *Pseudomonas aeruginosa* J. Bioch. 2005, 3: 520 -550.
- 15- Farrera, P. Medicina Interna. 13^{ra} ed. Ediciones Doyma S.A. y Mosby Doyma Libros S.A. Madrid; 1997. p. 2304-07.
- 16- Corona A, Miranda M, Leños B, Portillo L, Hernández A, Antro J, et al. Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. Arch Med Res. 2001; 32: 238-42.
- 17- Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. Mandell G, Bennett J, Dolon R, eds. Principles and practice of infectious diseases. 5 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 2310.
- 18- Castellón J. Evolución al tratamiento de las úlceras corneales en pacientes hospitalizados en el Centro Nacional de Oftalmología. Managua; s.n. 2004. p. 92.
- 19- Wang W, Chang N, Huang R, Tsai W, Tsui W, Wang C, Su M, Rau S, “et al”. Post-neurosurgical nosocomial bacterial meningitis in adults: microbiology, clinical features, and outcomes. *J Clin Neurosci* 2005; 12(6):647-650.
- 20- Martínez A, Pérez J, Pérez M. Pseudomonas. En: Llop A, Valdés M, Zuazo J. Microbiología y Parasitología Médicas. La Habana: ECIMED; 2001. p. 303-12.
- 21- Lyczak J.B., Cannon,C.L. and Pier,G.B. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002, 15, 194–222.
- 22- Schuster M., Lostroh,C.P., Ogi,T. and Greenberg,E.P. (2003) Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.*, 185, 2066–2079.
- 23- Gómez – Reino J J, Carmona L, Valverde V R, Mola E M, Montero M D; BIOBADASER Group. Treatment of rheumatoid arthritis with tumour necrosis inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active – surveillance report. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2122-7.
- 24- Abbas A, Lichtman A, Pober J. Inmunología celular y molecular. 3ra ed. Madrid Interamericana McGraw-Hill; 2000. p. 4-517.
- 25- María Angélica Martínez T. Capítulo 2 Morfología y estructura bacteriana. Medicina. 6ta Ed. 2005.
- 26- Campos-García, J., A. Esteve, R. Vázquez-Duhalt, J. L. Ramos, & G. Soberón-Chávez.. Branched-chain dodecylbenzene sulfonate degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D involves a novel route for degradation of the surfactant lateral alkyl chain. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65: 3730-3734.

- 27- Yokota S, *et al*, Identification of the lipopolysaccharide core region as the receptor site for a cytotoxin-converting, phage, phi ctx, of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1999; 176 (17):5262-69
- 28- Kiewitz, C. & B. Tümmler.. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: Impact on population structure and genome evolution. *J. Bacteriol.* 2000, 182: 3125-3135.
- 29- Cobas P.G. Caracterización de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico y ambiental. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad de Oriente. 1998
- 30- Pitt T.L , Barth A.L. *Pseudomonas aeruginosa* and other medically important *Pseudomonas*. *Princ. and Pract. of Clin. Microbiol.* 1997. 8. pp.14-8
- 31- Jones A. Eradication therapy for early *Pseudomonas aeruginosa* infection in CF: many questions still unanswered. *Eur Respir J* 2005; 26(3):373-375.
- 32- Jorge Velásquez, Frank Lizasaro, Nicola Zetola, Hernani Larrea, Walter Wong, Luís Mestanza, Rosa Hernández. Microbiología de las neumonías intrahospitalarias y su impacto en el uso empírico de los antibióticos. *Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna - Vol.14 N° 2 – 2001.*
- 33- Yokota S, *et al*, Identification of the lipopolysaccharide core region as the receptor site for a cytotoxin-converting, phage, phi ctx, of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1999; 176 (17):5262-69
- 34- G. Cobas P., S. C. Esnard B., J. Ayala, J. Almenares Análisis del componente lipolisacarídico en cinco cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico y ambiental. *Revista Cubana de Química.* Vol. III, N° 1, 2001.
- 35- Morales P, Licea ME, Perera JJ. Otitis maligna del diabético: nuestra experiencia y revisión de la literatura. *Rev. cubana. Endocrinol.* 2002; 13(1): 7-16.
- 36- Goto H, Takeda H, Kawai S, Nakadate T, Shimada K, Nakano K, Suwabe A, Yokouchi H. Susceptibilities of bacteria isolated from patients with lower respiratory infectious diseases to antibiotics. *Jpn J Antibiot* 2005; 58(3):326-358.
- 37- Spilker T, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004; 42(5): 2074-79.
- 38- Saiman L, Ishimoto K, Lory S, Prince A. The effect of piliation and exoproduct / expresión of the adherente of *Pseudomonas aeruginosa* to respiratory epithelial monolayers. *J. Infect. Dis.* 2006; 161: 541 – 548.

- 39- Mahenthiralingam E, Speet DP. Nonopsonic phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by macrophagos and polymorphonuclear leukocytes requires the presence of the bacterial flagellum. *Inf. Immnu* 2004; 5:218 -219.
- 40- J. A. Bellanti. Recent Advances in the Diagnosis, Therapy and Prevention of Pediatric Pulmonary Diseases. Foundation for Education and Research in Allergy and Immunology. F.E.R.A.I. Vol. 2 2003
- 41- Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: 4th ed. Mandell Gl., Bennett JE., Dollin R., New Churchill Livingstone, 2003.
- 42- Shaver M, Hauser R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 2004; 72(12):6969-6977.
- 43- Reinolds Hy. Immunological system in the respiratory tract. *Biol. Rev.* 2004; 71:1117 – 1132.
- 44- Fick RB. Pathogenetic mechanisms in cystic fibrosis lung disease a paradigm for inflammatory airways disease. *J. Lab. Clin. Med.* 2000, 121: 632 – 634.
- 45- Guadarrama S, Pulcini E, Broadaway C, Pyle H. *Pseudomonas aeruginosa* growth and production of Exotoxin A in static and modeled microgravity environments. *Gravit Space Biol Bull* 2005; 18(2):85-86
- 46- Berger M, Sorensen RU, Tosi MF, Dearborn DG, Doping G. Complement receptor expression on neutrophils at an inflammatory site, the *Pseudomonas* - infected lung in cystic fibrosis. *J. Clin Invest.* 2002; 1: 218 -219. v
- 47- Salyers AA, Whitt DD. *Pseudomonas aeruginosa* and related species, a lesson of versatility. En: Salyers AA, Whitt DD, ed. *Bacterial pathogenesis, a molecular approach*. 2nd edition. Washington, DC: ASM Press; 2002:247-262.
- 48- Takumida M, Anniko M. Protective effect of edaravone against the ototoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Acta Otolaryngol* 2006; 126(1):15-19.
- 49- Pier GB, Grout M, Zaidik TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB. Role of mutant CFTR in hyper susceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 2005; 271: 64 - 67.
- 50- Garcia-Medina R, Dunne M, Singh K, Brody L. *Pseudomonas aeruginosa* acquires biofilm-like properties within airway epithelial cells. *Infect Immun* 2005; 73(12):8298-8305.
- 51- Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O`toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 2003; 426(20): 306-10.

- 52-Cristina Pichardo Guerrero, Maria Carmen Conejo Gonzalo, Fernando Docobo Pérez, Isabel Garcia Luque, R López Rojas, José Manuel Rodríguez Martínez, María Eugenia Pachón Ibáñez, María del Carmen Velasco Ramírez, Jerónimo Pachón Díaz, Alvaro Pascual Hernandez: Actividad de Imipenem en la Peritonitis Experimental Por Cuerpo Extraño (Látex Siliconizado Vs. Silicona) Causada por *Pseudomonas aeruginosa*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2006. Pag. 240-241
- 53-Wood DM, Smyth AR. Estrategias con antibióticos para la erradicación de *Pseudomonas aeruginosa* en personas con fibrosis quística. Cochrane Plus, número 3, 2006. ISSN 1745-9990.
- 54-Stanislawski E. S, Almitriev B, LAN B. JooI. Antígenos de *P. aeruginosa* y su uso en inmunoprofilaxis e inmunoterapia. Acta Immunol Hungarica. 1985; 32(29): 128-11.
- 55-Issaki S, Orinaca K, Hiroshi S. Role of pili in the in the patogénesis de *P. aeruginosa*. Microbial Immunol.1988; 32 (2):131-39.
- 56-Curso de Inmunología General. Capítulo 8, 9. Complejo principal de histocompatibilidad (MHC), Procesamiento y presentación de antígenos. Enrique Iáñez Pareja. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. España.
- 57-Cabrera R, Palma M, Garces MM, Tápanes PR. Aislamientos bacterianos más frecuentes de muestras biológicas de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) / The most frequent bacterial isolates of biological samples from HIV-infected patient. Rev cubana med. Trop. 2003; 55(2).
- 58-Menezes EA, Brasil Joquibe D, Rocha S, Valdenir A, Andrade M, Do Socorro de Sena M, Monteiro M, Cavalcante M, Cunha F. Urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* through catheter in patients from the urology clinic of Santa Casa de Misericordia Hospital at Fortaleza – Ceará. Rev Bras anal Clin. 2003; 35(2):77-9.
- 59-Flórez J. Farmacología Humana 3^{era} ed. Barcelona: Ed. Masson S.A.; 1998. p. 1078-80.
- 60-Bodey GP, Bolívar R, Fainstein V. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 1983; 5: 279-313.
- 61-Farrera P. Medicina Interna. 13^{era} ed. Madrid: Ed. Doyma S.A. y Mosby Doyma Libros S.A.; 1997: 2304-07.
- 62-Lang B. A, Horn M.P., Imboden M. A, Zuercher W. A. Prophylaxis and therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients. Vaccine. 2004; (22): S44-S48.
- 63-Cachia P. J, Hodges RS. Synthetic peptide vaccine and antibody therapeutic development: Prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa*. Peptide Science. 2003; 71(2): 141-68.

- 64- Erwin AL, VanDevanter DR. The *Pseudomonas aeruginosa* genome: how do we use it to develop strategies for the treatment of patient with fibrosis cystic and *Pseudomonas aeruginosa* infection? *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8(6): 547-51.
- 65- Holder IA. *Pseudomonas aeruginosa* vaccination and immunotherapy: an overview. *J Burn Care Rehabil* 2001; 22(5): 311-20.
- 66- Pier GB, Saunders JM, Ames PA, Edward MS, Auerbach H., Goldfarb J., Speert DP., Hurwith S. Oponophagocytic killing antibody to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in older non colonized patients with cystic fibrosis. *New Eng. J. Med.* 2000; 317: 783 – 798.
- 67- Pier GB, Desjardin D, Grout M, Garner C, Bennett Se, Pekoe G, Fuller SA, Thornton MO, Harkonen WS, Millar HC. Human Immune response to *Pseudomonas aeruginosa* micoid exopolysaccharide (alginate) vaccine. *Inf Immun* 2005; 62: 3972 – 3979.
- 68- Khan S, Misra A, Tripathi C, Mishra B, Bihari V. Response surface optimization of effective medium constituents for the production of alkaline protease from a newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Exp Biol* 2006; 44(2):151-156.
- 69- Cryz SJ, Wedgood J, Lang AB, Ruedeberg A, Que JU, Furer E, Schaad UB. Immunization of noncolonized cystic fibrosis patient against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect Dis* 2000; 169: 1159 – 1152.
- 70- Bruderer U, Cryz SJ, Schaad UB. Deusinger M, Que JU, Lang AB. Affinity constant of naturally acquired and vaccine – induces anti – *Pseudomonas aeruginosa* antibody in healthy adult and fibrosis patients. *J. Infect Dis* 2000; 166: 344 – 349
- 71- Cryz S.J, Furer E, Sadoff J.C, Fredeking T, Que J.U, Cross A.S. Production and characterization of human hyperimmune. Intravenous Immunoglobulin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella species*. *J. Infect. Dis.* 1995. 164.pp 1055-1061
- 72- Ortíz M, Gerónimo A, Cuevas F, Pérez L, Coria R. Caracterización por RAPD-PCR de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de pacientes con fibrosis quística. *Salud Pública de México* 2004 Marzo-Abril; 46(2): 147-59. Disponible en: URL: http://www.insp.mx/salud/46/462_6.pdf.
- 73- U. Baumann, E. Mansouri, B.-U. von Specht. Recombinant OprF–OprI as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Vaccine* 22 (2004) 840–847.
- 74- Doring G, Dorner F. A multicenter vaccine trial using the *Pseudomonas aeruginosa* flagella vaccine IMMUNO in patients with cystic fibrosis. *21: Behring Inst Mitt* 1997 Feb;(98):338-44

- 75- Cole N, Hume E, Khan S, Krockenberger M, Thakur A, Husband A, Willcox D. Interleukin-4 is not critical to pathogenesis in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection. *Curr Eye Res* 2005; 30(7):535-542.
- 76- Svensen H, Clifton B, Brauer K, Olsson J, Uchida T, Traber L. Sepsis produced by *Pseudomonas* bacteremia does not alter plasma volume expansion after 0.9% saline infusion in sheep. *Anesth Analg* 2005; 101(3):835-842.
- 77- Gallart T, Pacheco A, Regueiro J.R. Anticuerpos o Inmunoglobulinas. Medicina interna. Farreras y Rozmann. Ed en CD-ROM. Decimotercera Ed.pp 2678-2682. 1996.
- 78- Thomson, R; Miller, M; Murray, P;. Baron E., Jorgensen, J., Pfaller, M., Tenover, R. Specimen Collection, Transport, and Processing: Bacteriology. Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. American Society for Microbiology. ASM Press Washington, D.C. 2003. pp. 286-330.
- 79- AHFS Drugs Information 2000. American Society of Health. System Pharmacist Año 2000; 1298 – 1302, 2970 – 2980.
- 80- Olhsson A, Lacy J B. Intravenous immunoglobulin for suspected or subsequently proven infection in neonates. Cochrane review. In: The Cochrane library, Issue 4, 2003, Oxford: update Software.
- 81- Norrby-Teglund A, Ihendyane N, Darenberg J. Intravenous immunoglobulin adjunctive therapy with special emphasis on severe invasive group A Streptococcal infections. *Sand J Infect Dis* 2003; 35: 683-89.
- 82- Vitkauskiene A, Scheuss S, Sahly H, Sakalauskas R, Dudzevicius V. *Pseudomonas aeruginosa* strains from nosocomial pneumonia are more serum resistant than *P. aeruginosa* strains from noninfectious respiratory colonization processes. *Infection* 2005; 33(5-6):356-361.
- 83- Pressler T. IgG subclass and chromosomic antibodies and bacterial infection. Subclass antibodies and the clinical course of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *Acta Pathologica microbiologica e immunologica scandinavica*. 1996. 66(104).
- 84- Thampakkul S, Ballow M. Replacement intravenous immune serum globulin therapy in patients with antibody immune deficiency. *Immunol. Allergy Clin North Am*. 2001;.
- 85- Albertson T E, Panaceck E A, Mc Arthur R D, Jonson S B, Benjamín E, Matuschak G M, et al. Multicenter evaluation of a human monoclonal antibody to Enterobacteriaceae common antigen in patients with Gram – negative sepsis. *Crit. Care Med*. 2003; 31: 419-27.

- 86- Tugrul S, Ozcan P E, Akinci O, Seihun H, Cagatay A, Cakar N, et al. The effects of IgM – enriched immunoglobulin preparations in patient with severe sepsis ISRCTN 28863830. Crit. Care 2002; 6: 357 – 62.
- 87- Castañeda L, Castellano F, Castellano M.E, Cádiz A. Utilización de INTACGLOBIN en sepsis graves en una unidad de cuidados intensivos. Rev. Cienc.Med. 1994. 3
- 88- Cádiz A, Gutierrez A, Giralдино y García L. Ensayo de un método de obtención industrial en Cuba de una inmunoglobulina humana normal biológicamente activa por fraccionamiento etanoico. Rev. Cub. Farm. 1977. 11:5-12 Enero –abril.
- 89- Cohn-E; et al. Preparation and properties of serum and plasma protein. A system for the separation into fraction of he protein and lipoproteins components of biological tissues and fluids. J. Am. Chem. Soc. 1946. 68: 459- 475.
- 90- Werdan K. Intravenous immunoglobulin for prophylapxys and therapy of sepsis. Curr Opin Crit Care 2001; 7: 354-1.
- 91- Carlos J. Montoya G., Ricardo U. Sorensen. Generalidades y Farmacología de la Gammaglobulina Humana Endovenosa (GGEV). Boletín grupo latinoamericano de inmunodeficiencias primarias. OPS, 2005 Inmunoglobulina G.
- 92- Oncley JL, Melin M, Richert DA, Cameron JW, Gross PM. The separation of antibodies isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta I-lipoprotein into subfractions of human plasma. J Am Chem Soc 1949;71:514-50.
- 93- Ignacio Juan Ruibal Brunet, Enrique Noa Romero, Regina Zonia Martín García, Nibaldo Luis González Sosa y Ana Teresa Ramírez Mas. Inactivación de virus ADN envueltos en la producción de hemoderivados (Albúmina e Inmunoglobulinas) Rev Cubana Farm v.33 n.2 Ciudad de la Habana Mayo-ago. 1999.
- 94- Morris Hooke A, Sordelli DO, Cerquetti MC, Bellanti JA. Diferencial growth characteristics and immunogenicity of tight and coasting temperature sensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 2001; 133: 2835.
- 95- Alejadria M M, Lansang M A, Dans L F, Mantaring J B V. Intravenous immunoglobulin for treating sepsis and septic shock. Cochrane review. In: The cochrane library, Issue 3, 2003, Oxford: update Sotware.

- 96- Schina M, Spyridi E, Daoudakis M, Mertzanos E, Korfiás S. Successful treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* meningitis with intravenous and intrathecal colistin. *Int J Infect Dis* 2005; 28: 1-10.
- 97- Salgado H., Manual de Vacunación México 2005 Primera edición 2005 ISBN:970-721-162-8.
- 98- Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E., García AM, Blanco R., Sotolongo F. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *Vaccimonitor*. 2000. Año 9 No 3.
- 99- Mancini, G., Carbonara, O. A., Heremans, J. F., *Immunochemistry*. 1965, 2, 235-254
- 100- Multiphor II. Electroforesis system. Users Manual. Pharmacia LKB. Biotechnology. 1992.
- 101- Dra. Sara C. Esnard Bolaños, MSc. Guillermo Cobas Pupo, Lic. Juan Almenares Verdecia, MSc. Aniel Moya Torres, MSc. Jonathan Hernández Roche. Informe Técnico. Proyecto Nacional de Ciencia y Técnica. Aislamiento y Purificación de Antígenos Mayoritarios de la Pared Celular de *Pseudomonas aeruginosa*. 2001.
- 102- Cobas, G.; Infante, J. F.; Esnard, S.; Fontaine, R.; Torres, B y Almenares, J. F.. Modelo Animal para *Pseudomonas aeruginosa*. Utilizando ratones quemados de la línea Balb/c. *Journal Animal Science* Vol. 4 No. 4 1999.
- 103- Slobodanka Klein. El uso de animals en la investigación biomedical. *Rev. Cienciahoy* vol. 10 N° 55 Febrero/ Marzo 2000.
- 104- Armando Cádiz Lahens, Janhna Hernández Machín, Lázaro Joó Sánchez, Aniel Moya Torres y Amador Camero Santiesteban. Pasteurización de soluciones de inmunoglobulinas de uso intravenoso. El ph ácido como elemento estabilizante. *Rev Cubana Farm* vol.33 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic. 1999. ISSN 0034-7515.
- 105- Yenifer Cobián Artímez. Ensayo Preliminar para la Obtención de un preparado de Inmunoglobulinas hiperinmune anti *Pseudomonas aeruginosa* Ciudad de La Habana 2001.
- 106- Aniel Moya, Denisse Berrios, Juan Almenares, Linda N. Ibáñez, Johnatán Hernández, Lázaro Joo, Alexandro Rodríguez, Pavel Mustelier, Armando Cádiz, Sara C. Esnard Serotipificación y susceptibilidad antibacteriana de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes quemados infectados.. *Vaccimonitor* año 12 N°. 2 Abril - Junio 2003.
- 107- STATGRAPHICS plus para Windows 5.1. STATISTICAL Graphics Corp. 1994 – 2001.
- 108- J. Almenares, J. Hernández, A. Moya, Armando Cádiz, Miladis Camacho. Inhibición de la actividad protectora de un Preparado de Inmunoglobulinas anti *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Cub. Quim.* Vol. XVII, No 1, 2005.

- 109- Aniel Moya, Lázaro Joó, Alexandro Rodríguez, Janhna Hernández, Johnatan Hernández, Juan F. Almenares, Denisse Berrios, Zoraida Rodríguez, Armando Cádiz, Sara C. Esnard Preparado de inmunoglobulina contra LPS de *Pseudomonas aeruginosa* serotipo O11.. VacciMonitor Año 11 No. 1. Enero- Marzo del 2002
- 110- Cádiz A, Castellano ME, Castillo JR y Melchor A. Comportamiento de algunos parámetros determinantes de efectos adversos inducidos por inmunoglobulinas intravenosas. 1995 vol. 29 No 2. Pp109-116.
- 111- Mediman N. Comparación del método de Cohn con el método de B. Boros para la obtención de albúmina e inmunoglobulina humana. Proyecto de Investigación. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México D.F., 1990.
- 112- Alfaro C., Murillo O., Tirapu I., Azpilicueta A., Huarte E., Arina A., Arribillaga L., Perez-Gracia J.L., Bendandi M., Prieto J., Lasarte J.J., Melero I. El potencial de la inmunomodulación con anticuerpos monoclonales anti-CD137 (4-1BB) para terapia de enfermedades malignas e infecciones virales crónicas. An Sist Sanit Navar. 2006 Jan-Apr;29(1):77-96.
- 113- Masoud H, *et al.* General strategy for structure analysis of the oligosaccharide region of lipopolysaccharides of *P. aeruginosa*. Biochemistry. 1994; 33(35): 10568-78.
- 114- Westphal O. and Jann. K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedures. Methods Carbohydr. Chem. 1965. 5:83-1.
- 115- Shiller NL. Characterization of susceptibility of *P. aeruginosa* to complement-mediated Killing. Role of antibodies to the rough lipopolysaccharide serum-sensitive strains. Infect Immun 1988. 56:632-39.
- 116- Vale AT, Gaston MA, Pitt TL. Subdivision of O serotypes of *Pseudomonas aeruginosa* with monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1988;26(9):1779-82.
- 117- Lam JS, Michele Y, Handelsman C, Chivers TR, MacDonald LA. Monoclonal antibodies as probes to examine serotype-specific and cross-reactive epitopes of lipopolysaccharides from serotypes O2, O5 and O16 of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1992;174(7):2178-84.
- 118- Rojas IA, Anderson GA, Grainger DW, Slunt JB. Inhibition of flagellated bacteria motility *in vitro* using pooled human polyclonal immunoglobulin. Submitted 1999.