

Tesis de Posgrado

Inmunidad del tracto respiratorio en infecciones bacterianas : aspectos humorales de la respuesta inmune

García, Verónica Edith

1992

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

García, Verónica Edith. (1992). Inmunidad del tracto respiratorio en infecciones bacterianas : aspectos humorales de la respuesta inmune. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2519_Garcia.pdf

Cita tipo Chicago:

García, Verónica Edith. "Inmunidad del tracto respiratorio en infecciones bacterianas : aspectos humorales de la respuesta inmune". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2519_Garcia.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"Inmunidad del tracto respiratorio en infecciones
bacterianas. Aspectos humorales de la respuesta inmune"

por
Verónica Edith García

Tesis presentada para optar al título de
Doctora en Ciencias Biológicas

Director de tesis: Dr. Daniel O. Sordelli

1992

*Tesis
2519
ej. 2*

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología
Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Buenos Aires
Paraguay 2155, 1121, Buenos Aires - ARGENTINA

El contenido de esta tesis ha sido parcialmente publicado en:

Humoral immunity induced in the lower respiratory tract by local immunization with temperature-sensitive mutants of Pseudomonas aeruginosa. García VE, Sordelli DO, Gherardi MM, Hooke AM. *Current Microbiol*, 22:265, 1991.

Obtención y caracterización de mutantes termosensibles de *Streptococcus pneumoniae*. García VE, Gherardi MM, Iglesias MF y Sordelli DO. *Medicina*, 51:400, 1991.

Intranasal immunization with temperature-sensitive mutants protects granulocytopenic mice from letal pulmonary challenge with Pseudomonas aeruginosa. Sordelli DO, García VE, Fontán PA, Cerquetti MC, Hooke AM. *Current Microbiol*, 24:9, 1992.

Age-dependent pulmonary clearance of Pseudomonas aeruginosa in a mouse model: diminished migration of polymorphonuclear leukocytes to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. Sordelli DO, Djafari M, García VE, Fontán PA, Doring G. *Infect Immun*, 60:1724, 1992.

Agradezco al Dr. Daniel Sordelli por su dedicación a mi formación científica, por haberme brindado su apoyo para la realización de este trabajo, pero principalmente, por haberme enseñado que la investigación científica es una forma de vida.

Agradezco a la Licenciada Magdalena Gherardi por su incondicional ayuda para la realización de gran parte de este trabajo de investigación.

Agradezco a la Dra. M. Cristina Cerquetti por haber colaborado desinteresadamente en mi formación profesional y por su apoyo constante a mi trabajo.

Agradezco asimismo a la Dra. Christiane D. Pasqualini, Jefa de la División Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina, por haber autorizado la realización de parte de este trabajo en la Sección a su cargo.

Agradezco también a la Dra. Stella Maris Gonzalez Cappa, Jefa del Dto. de Microbiología de la Facultad de Medicina, por permitirme la finalización de mi tesis doctoral en el Departamento a su cargo.

A mis hijos, Facundo y Manuela

INDICE GENERAL

1.	INTRODUCCION.....	1
1.1.	RESPUESTA INMUNE DE MUCOSAS.....	1
1.1.1.	ANTICUERPOS EN LAS SECRECIONES. INMUNOGLOBULINA A.....	2
1.1.2.	PROCESAMIENTO DE ANTIGENO.....	5
1.1.3.	TRAFICO LINFOCITARIO.....	6
1.1.4.	REGULACION DE LA PRODUCCION DE IgA POR CELULAS T.....	7
1.1.5.	OTROS COMPONENTES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA INMUNE DE MUCOSAS.....	8
1.2.	MECANISMOS DE PROTECCION INMUNOLOGICA DE MUCOSAS EN EL TRACTO RESPIRATORIO.....	10
1.2.1.	GENERALIDADES.....	10
1.2.2.	MECANISMOS NO ESPECIFICOS DE DEFENSA EN EL TRACTO RESPIRATORIO.....	11
1.2.3.	MECANISMOS ESPECIFICOS DE DEFENSA.....	13
1.2.4.	INFECCIONES RESPIRATORIAS.....	18
1.3.	INMUNIZACION LOCAL.....	20
1.4.	INFECCIONES POR <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	22
1.4.1.	GENERALIDADES.....	22
1.4.2.	EPIDEMIOLOGIA.....	23
1.4.3.	FACTORES DE VIRULENCIA DE <u>P. aeruginosa</u>	24
1.5.	INFECCIONES POR <u>Streptococcus pneumoniae</u>	25
1.5.1.	GENERALIDADES.....	25
1.5.2.	EPIDEMIOLOGIA.....	27

1.5.3.	FACTORES DE VIRULENCIA DE <u>S. pneumoniae</u>	29
1.6.	PREVENCION Y TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS CAUSADAS POR <u>P. aeruginosa</u> y <u>S. pneumoniae</u>	30
1.7.	VACUNAS DISPONIBLES CONTRA <u>P. aeruginosa</u>	32
1.8.	VACUNAS DISPONIBLES CONTRA <u>S. pneumoniae</u>	34
1.9.	BACTERIAS ATENUADAS: MUTANTES TERMOSENSIBLES.....	36
1.10.	HIPOTESIS DE TRABAJO.....	38
1.11	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	39
2.	MATERIALES Y METODOS	43
3.	RESULTADOS.....	51
4.1.	DISCUSION.....	129
4.2.1.	CONCLUSIONES PARCIALES.....	156
4.2.2.	CONCLUSION.....	160
4.3.	FUTURO.....	161
5.	BIBLIOGRAFIA CITADA.....	163
6.	RESUMEN.....	175

ABREVIATURAS UTILIZADAS

P. aeruginosa= Pseudomonas aeruginosa

Psa= Pseudomonas aeruginosa

Psa-F= Pseudomonas aeruginosa muerta por formolización

S. pneumoniae= Streptococcus pneumoniae

S. aureus.= Staphylococcus aureus

CS= cepa salvaje muerta por calor

TS= termosensible

UFC= unidades formadoras de colonia

PMNs= leucocitos polimorfonucleares

Ig= Inmunoglobulina

IgG= Inmunoglobulina G

IgA= Inmunoglobulina A

IgM= Inmunoglobulina M

IgA-S= Inmunoglobulina A secretoria

I.N.= intranasal

I.P.= intraperitoneal

ML= mililitros

MIN= minutos

UL= microlitros

UG= microgramos

U= unidades

TSB= caldo tripticase soya

TSA= agar tripticase soya

SFB= suero fetal bovino

PIA= Pseudomonas isolation agar (agar para el aislamiento de Pseudomonas)

AM ϕ = macrófago alveolar

DL₅₀= dosis letal 50

N.S.= no significativo

N_G= N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina

D.O.= densidad óptica

TGM= tiempo de generación media

LIE= leucocitos intraepiteliales

BALT= tejido linfoide asociado a los bronquios

GALT= tejido linfoide asociado a intestino

TSI= triple sugar iron

G= gramo

Ac= anticuerpo

"La más hermosa y profunda emoción que podemos experimentar es el sentido del misterio. En él está el origen de todo arte , de toda verdadera ciencia. Quien no haya jamás probado esta emoción, quien no se ha detenido para meditar y quedar cautivo en temerosa admiración, está como muerto, su vida se ha apagado."

Albert Einstein

PROLOGO

Si tan sólo fuera posible listar los problemas de las enfermedades causadas por bacterias en el hombre, de modo de poder considerar la forma y el orden de controlarlas... En realidad, en cada momento, nosotros somos capaces de entender algunos problemas, tenemos idea acerca de otros y ninguna percepción acerca del resto (David W. Fraser).

En países del tercer mundo, cada 7 segundos un niño menor de 5 años muere a causa de infección respiratoria aguda, usualmente pneumonia, constituyendo ésta una de las principales causas de mortalidad infantil. Por este importantísimo motivo, este trabajo de investigación fue realizado para contribuir al conocimiento de las infecciones respiratorias agudas provocadas por dos microorganismos que continúan siendo un grave problema como agentes causales de neumonía: Pseudomonas aeruginosa y Streptococcus pneumoniae. El fin último de esta investigación es lograr métodos inmunoproliféricos apropiados para el tratamiento del grave problema que representan las neumonías bacterianas, especialmente en la infancia.

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. RESPUESTA INMUNE DE MUCOSAS

Los tejidos mucosos del cuerpo constituyen una enorme área superficial, y es allí donde los microorganismos patógenos y los agentes tóxicos con mayor frecuencia realizan su primer contacto con el huésped y pueden potencialmente causar enfermedad local o sistémica (1). Inmediatamente luego del nacimiento, las superficies mucosas del tracto respiratorio superior, el tracto intestinal y el tracto genital bajo, son colonizados por una gran variedad de bacterias y otros microorganismos que están presentes en el aire inspirado, alimento ingerido y excreciones fecales, respectivamente. La mayoría de estos microorganismos se establecen como la microflora indígena o normal. Otras superficies mucosas, como el tracto respiratorio bajo, son normalmente estériles en un huésped saludable. Durante el estado de buena salud, todas las superficies mucosas contienen importantes barreras contra la adhesión de bacterias patógenas invasoras. Pero cuando estas barreras se quiebran, los patógenos pueden rápidamente tener acceso y colonizar grandes áreas de las superficies mucosas. Desde estos sitios colonizados las bacterias patógenas pueden producir enfermedades infecciosas ya sea por invasión de los tejidos más profundos o por excreción de toxinas que dañan tejidos locales y distantes (2).

No es sorprendente que los tejidos mucosos que representan

áreas superficiales tan extensas, estén defendidos por un sistema inmune local, con propiedades y funciones que en muchos aspectos están separadas del sistema inmune sistémico (3). Desde hace ya varios años se sabe que los mecanismos inmunes de mucosas difieren en varios aspectos de aquellos que caracterizan a los órganos no-mucosos, incluyendo la sangre. Está bien establecido que las reacciones inmunes locales pueden ocurrir sin ningún reflejo de estos eventos en la circulación. Existen una gran variedad de mecanismos que han evolucionado en las superficies mucosas para prevenir la invasión o el daño local causado por patógenos. Estos incluyen tanto mecanismos inmunes específicos como no específicos. Entre los primeros se halla la existencia de anticuerpos IgA secretorio (IgA-S) e IgM que son secretados en los fluidos que bañan las membranas mucosas (4).

1.1.1. ANTICUERPOS EN LAS SECRECIONES. INMUNOGLOBULINA A.

Los anticuerpos presentes en las secreciones de las mucosas son de origen humoral o son sintetizados localmente por células plasmáticas localizadas en la submucosa. La mayor parte de la IgG de secreciones externas es de origen humoral, mientras que la IgA en forma de IgA-S y, probablemente, la IgM, son de origen local (5). Los tejidos mucosos se caracterizan por un predominio de linfocitos secretores de IgA en los tejidos intersticiales. A diferencia de la IgA sérica, la IgA-S es producida por células plasmáticas residentes en la submucosa del epitelio secretor y en

el estroma glandular. La estimulación antigénica de los precursores de las células plasmáticas secretoras de IgA, puede ocurrir por tres mecanismos: penetración o inyección local, ingestión o inhalación, o ruta parenteral.

En el nivel local, los antígenos que penetran el epitelio o que son infundidos dentro de las glándulas pueden inducir la diferenciación de linfocitos B locales, antígeno-específicos, en células plasmáticas secretoras de IgA. Presumiblemente estarían involucrados linfocitos T y células presentadoras de antígeno. La inyección de antígeno en la vecindad de las glándulas también induce anticuerpos IgA-S, aunque también usualmente se genera una respuesta de anticuerpo sistémica (IgM e IgG).

Las secreciones pueden contener anticuerpos contra organismos que se sabe que son incapaces de colonizar esas glándulas particulares. Por ejemplo, el calostro y la leche humana contienen IgA-S contra microorganismos y antígenos de los alimentos que no estimulan esta glándula directamente. Numerosos experimentos en animales han demostrado que la administración oral de una gran variedad de antígenos proteicos o bacterianos, evocan respuestas de IgA-S no sólo en las secreciones intestinales sino también en otras secreciones como saliva, lágrimas, secreciones bronquiales y del tracto genital (6).

La inyección parenteral también se ha propuesto como induc-

tora de las respuestas por IgA-S en individuos que han sido previamente estimulados para inmunidad de mucosas, pero el mecanismo preciso de este efecto no se conoce. Podría involucrar el transporte de antígeno o de fragmentos de antígeno procesados o la migración de células regulatorias estimuladas a la submucosa, donde ocurriría la estimulación de las células secretoras de IgA (6).

Se ha postulado que las células plasmáticas locales que sintetizan IgA-S podrían originarse de precursores que originariamente fueron estimulados en otro sitio. Tales interrelaciones entre sitios anatómicamente tan dispersos han conducido al concepto de la existencia de un sistema inmune secretor generalizado (7).

La principal función protectora de la IgA-S es la "exclusión inmune" de patógenos bacterianos y virales, toxinas bacterianas y otras moléculas potencialmente perjudiciales. Se ha descrito también que la IgA-S mediaría la citotoxicidad mediada por células T dependiente de anticuerpos (ADCC), y que interferiría con la utilización de los factores de crecimiento necesarios para patógenos bacterianos en el ambiente intestinal (3).

Las células plasmáticas secretoras de IgA de la submucosa, sintetizan IgA polimérica que contiene a la cadena J, la cual es tomada y transportada en la secreción por células epiteliales, en

un proceso que involucra al componente secretor unido a membrana como un receptor para la IgA polimérica. Como se explicó, la estimulación de los precursores de estas células puede ocurrir por los tres mecanismos citados (6).

Respecto al transporte de la IgA dimérica a través del epitelio, los factores que regulan el proceso celular secretorio en sí mismo podrían jugar un rol significativo en la cantidad de inmunoglobulina encontrada en secreciones externas, independientemente de factores que regulan el sistema inmune en sí mismo. Tales factores podrían incluir hormonas generadas localmente o en sitios distantes. La extensión de la contribución de la síntesis local a la presencia de IgA en las secreciones difiere en diferentes tejidos, y aún entre especies (4).

1.1.2. PROCESAMIENTO DE ANTIGENO

El procesamiento del antígeno se inicia por el epitelio asociado a folículo, que recubre los folículos linfoides especializados que se encuentran en la mucosa de los tractos respiratorio y gastrointestinal. La función del resto del epitelio mucoso en la toma y procesamiento del antígeno como parte de una respuesta inmune, no está claro. Sin embargo, el epitelio, especialmente aquel que está involucrado en eventos inflamatorios, expresa antígenos Ia, y se sabe que el epitelio puede estar involucrado en el procesamiento inmune (4).

1.1.3. TRAFICO LINFOCITARIO

El número de células que contienen inmunoglobulina en un tejido dado depende del tipo y localización del tejido, así como de la bacteria, virus o antígeno depositado. Los linfocitos en la mayoría de estos tejidos parecen derivar de la circulación, y una gran variedad de factores regulan la distribución celular a los tejidos y su subsecuente extracción desde sangre. Estos incluyen edad, estado del endotelio vascular, flujo sanguíneo, presencia de antígeno específico en tejido local, estado nutricional general y dieta.

Los linfocitos derivados de los tejidos mucosos, en subsecuentes reinyecciones, tienden a localizarse selectivamente en el tejido de origen, y secundariamente en otros tejidos mucosos, preferentemente en tejidos linfoides sistémicos. La base de esta información está aún en discusión, pero ha sido incorporada en el concepto general de un sistema inmune común de mucosas. El inicio de la respuesta inmune en mucosas podría entonces ocurrir en los folículos linfoides mucosos, en el epitelio, lámina propia e intersticio, o en los nódulos linfoides drenantes. Existe evidencia que corrobora que todos estos mecanismos están involucrados en mayor o menor proporción (4).

Observaciones experimentales ejemplifican las interrelaciones existentes entre sitios anatómicamente dispersos del sistema

inmune secretor generalizado. En el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT), aunque los linfocitos IgA emigrantes predominantemente retornan al pulmón, algunas células buscan el intestino. La exposición intestinal a antígenos bacterianos cariogénicos conduce a la formación de anticuerpos IgA específicos en lágrimas y en saliva. Los ratones expuestos oralmente a antígenos solubles, muestran grandes números de células plasmáticas IgA-específicas en la glándula mamaria lactante y en otros sitios secretorios tales como la mucosa bronquial, además de la mucosa intestinal. Más aún, en experimentos de transferencia celular, células sensibilizadas de los nódulos linfáticos mesentéricos de ratones inmunizados oralmente, viajan hacia las glándulas mamarias de ratones lactantes vírgenes respecto al antígeno, donde aparecen como células plasmáticas IgA antígeno-específicas. Otra evidencia de la existencia de una respuesta inmune secretoria generalizada incluye la observación que la inmunización rectal de ratones con virus influenza induce la aparición de anticuerpos anti-influenza en secreciones bronquiales, y la inmunización de la mucosa intestinal prima la mucosa respiratoria via diseminación de células inmunes (7).

1.1.4. REGULACION DE LA PRODUCCION DE IgA POR CELULAS T

Hay acuerdo general en que la inmunoglobulina A es un isotipo dependiente de células T. También se sabe que las interleuquinas 2, 3, 4 y 6 podrían contribuir individualmente a la síntesis

sis de IgA o sinergizar para promover la diferenciación a partir de una célula que lleva IgA hacia una que sintetice y secrete esta molécula. Se ha postulado otro tipo de célula T que podría ser responsable del cambio de síntesis de inmunoglobulina hacia el isotipo IgA. Existe evidencia creciente que sugiere que las células T podrían también ser responsables de los efectos contrasupresores, y que estos sistemas podrían ser isotipo específicos (incluyendo IgA) (4).

1.1.5. OTROS COMPONENTES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA INMUNE DE MUCOSAS.

A. LEUCOCITOS INTRAEPITELIALES (LINFOCITOS)

Dentro del epitelio de las mucosas existe una población de leucocitos que a menudo se los llama leucocitos intraepiteliales o linfocitos (LIE). En el ratón, estas células (de las cuales un 60% contienen gránulos) no llevan el marcador fenotípico Thy 1, pero sí poseen positividad para CD8. Recientemente, se demostró que esta población es CD3⁺, y expresa sobre su superficie receptores antigénicos gamma-delta de células T. Un exámen más detallado de la función celular de LIE reveló que poseen una alta frecuencia precursora para mastocitos, la presencia de precursores de células T citotóxicas así como células T citotóxicas, células responsables de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y actividad natural killer. Además han sido identifi-

cadras células con capacidad de matar específicamente ciertos blancos infectados por virus.

B. MASTOCITOS

En la última década se ha aclarado el hecho que los mastocitos son heterogéneos en términos de dependencia de factor de crecimiento, fenotipo, contenido de proteoglicano y esterasas de serina. El mastocito de mucosa intestinal, depende primariamente de IL-3 para su proliferación. El rol del microambiente podría ser crucial en la determinación de la diferenciación celular, y podría jugar un rol central en la regulación de las respuestas inmunes de mucosas.

C. NERVIOS

Hay una gran cantidad de tejido nervioso dentro de los tejidos de las mucosas. Los nervios contienen neurotransmisores. Los nervios están distribuidos a través de los tejidos de las mucosas, a menudo con ramificaciones hacia el epitelio (en el tracto respiratorio) y capilares, y con inervación de músculo liso. Las estructuras linfoides de mucosas están inervadas, así como lo están todos los tejidos linfoides (4).

1.2. MECANISMOS DE PROTECCION INMUNOLOGICA DE MUCOSAS EN EL TRACTO RESPIRATORIO

1.2.1. GENERALIDADES

El estado patofisiológico del epitelio y su integridad hacia macromoléculas y componentes particulados debe ser considerado cuando se enfatiza la relativa facilidad de penetración de estas sustancias en el microambiente interno. Este estado es mantenido por una compleja serie de reacciones entre el entorno y los eventos inmunológicos que ocurren sobre y dentro del tejido mucoso. Estas interacciones involucran los ya descritos factores humorales, nervios y neurotransmisores. La función normal del aparato ciliar y la hidratación relativa de la capa apical superficial, así como su contenido de mucus, juegan roles principales en la defensa de estos tejidos. El 80% o más del material aerosolizado e introducido en el tracto respiratorio, sin importar el tamaño de la partícula, eventualmente es incorporado, a través de mecanismos de depuración ciliar, en la saliva y pasa al tracto gastrointestinal.

Existirían diferencias entre el tracto respiratorio superior y el inferior, no sólo en términos inmunológicos sino también en términos de origen embrionario. Los mecanismos que protegen el tracto respiratorio superior se relacionan más con aquellos involucrados en la protección de superficies mucosas, mientras que

aquellos involucrados en la protección del tracto respiratorio inferior reflejan mejor aquellos de tejidos no mucosos. Además, las defensas del tracto respiratorio bajo cuenta con un importante aliado: la población de macrófagos alveolares. Estas células, al ser activadas, pueden expresar receptores de superficie para IgA y de esta manera participar con las defensas inmunes humorales del tracto respiratorio alto y ser integradas en él (8).

El tracto respiratorio y sus superficies mucosas constituyen un sistema de órganos únicamente integrado, que está bien designado para proveer al huésped con una multiplicidad de mecanismos de defensa: mecánicos, no inmunológicos, inmunológicos, y una combinación de todos los antes mencionados. Cuando funciona normalmente, o cuando no está expuesto a un inóculo infeccioso masivo, los mecanismos de defensa del huésped previenen el desarrollo de infección del tracto respiratorio. La falla de varios pasos en este sistema integrado puede comprometer al huésped e incrementar la probabilidad de infección pulmonar (9).

1.2.2. MECANISMOS NO ESPECIFICOS DE DEFENSA EN EL TRACTO RESPIRATORIO.

Un hombre adulto en reposo respira aproximadamente 14.000 litros de aire diarios. Sin embargo, a pesar de la reiterada inoculación que esto significa, la infección pulmonar raramente ocurre aún cuando el inóculo contenga microorganismos patógenos

(10,11,12). El diseño anatómico básico del tracto respiratorio provee una barrera inicial contra agentes infecciosos y agentes nocivos. La epiglotis y las fuertes uniones previenen la penetración de organismos dentro de los canales aéreos más bajos. Más aún, las superficies de los canales aéreos conductores presentan una efectiva barrera. Estas superficies están recubiertas con mucosa compuesta de una capa de mucus, células epiteliales ciliadas, una membrana basal y la submucosa con células secretoras y células linfoma. El diseño en rama de los canales aéreos conductores en unidades más finas cada vez, da como resultado la rápida y efectiva filtración de la mayoría de las partículas inhaladas, previniendo su entrada en los alvéolos terminales. Es decir que el diseño anatómico del tracto respiratorio ramificado provee una barrera mecánica inicial y altamente efectiva contra material extraño, incluyendo microorganismos.

Además, las células epiteliales ciliadas recubren los canales aéreos. Las cilias epiteliales baten aproximadamente 1.000 veces/minuto y crean un efectivo aparato mucociliar que remueve el mucus y partículas atrapadas. Las superficies de los canales aéreos mucosos también secretan o poseen una variedad de factores, tales como surfactante, inmunoglobulinas y complemento, que contribuyen aún más a las defensas pulmonares del huésped (9).

Si a pesar de los mecanismos enumerados antes, una partícula extraña alcanza los espacios alveolares del pulmón, se pone en

funcionamiento la próxima línea de defensa: la depuración alveolar. Esta importantísima función es llevada a cabo por las células fagocíticas y por el sistema inmunológico del pulmón. La principal célula fagocítica es el macrófago alveolar (AMØ) residente (13). En condiciones normales del huésped, la proporción de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en los espacios alveolares es muy baja. No obstante, cuando media una reacción inflamatoria, los PMNs pueden migrar desde los capilares sanguíneos pulmonares hacia los espacios aéreos (14).

1.2.3. MECANISMOS ESPECIFICOS DE DEFENSA.

Los mecanismos no específicos de defensa pulmonar pueden ser exacerbados por una respuesta inmune. Esta respuesta puede ser sistémica o local, con participación aislada del sistema inmune pulmonar (15). En el tracto respiratorio superior, los tejidos linfoides organizados se agrupan en folículos aislados o en grupos. Además, los linfocitos son hallados en el epitelio, donde yacen entre las células epiteliales y por encima de la membrana basal. Estos linfocitos epiteliales son similares a los de intestino (8).

El sistema inmune pulmonar tiene, por lo menos, tres niveles de organización: ganglios linfáticos, nódulos linfáticos y agregados o infiltrados linfoides. El grado de organización estructural decrece progresivamente desde las vías aéreas proximales

hacia los espacios aéreos periféricos (15). Los ganglios linfáticos típicos constituyen el primer nivel; ellos tienen canales aferentes y eferentes, cápsulas, folículos y centros germinales y están limitados a la región de la tráquea y las proximidades de los bronquios mayores.

El segundo nivel está compuesto por los nódulos linfáticos; éstos contienen folículos pero carecen de cápsula y se encuentran agregados en las paredes de los grandes y medianos bronquios, particularmente en las zonas de bifurcación (8,16). Finalmente, los agregados linfocitarios (un acúmulo difuso de linfocitos y fagocitos) se distribuyen a lo largo de toda la submucosa y lámina propia de los conductos aéreos y del tejido intersticial, encontrándose muy próximos a los vasos sanguíneos y linfáticos (8, 16). Dentro de los folículos linfoides organizados se encuentran también las células T "helper" y supresoras (8).

Los tejidos linfoides descritos en el segundo y tercer nivel de organización son conocidos también por la sigla "BALT" (del inglés: Bronchus-Associated-Lymphoid-Tissue). El BALT está constituido predominantemente por células B y mientras que no tiene un área de células T morfológicamente reconocible, se encuentran distintos sitios para la recolección de células T en la periferia de los folículos linfoides. Este tejido linfoide refleja el del tracto gastrointestinal (GALT), ya sea como nódulos linfoides aislados o conjuntos de folículos (placas de Peyer).

Existe similitud funcional entre BALT y GALT (17,18), y se han sugerido vías migratorias específicas entre los dos sistemas y la lámina propia (19). Este hecho podría tener importancia en lo que respecta a la inmunización oral contra infecciones respiratorias.

El epitelio que recubre al BALT generalmente no tiene cilias ni células caliciformes, así como tampoco tiene glándulas, y podría representar un área de turbulencia de corrientes de aire para cumplir su función principal: la toma del antígeno. El linfopitelio que recubre al BALT tiene como contrapartida, el epitelio asociado a folículos o células M sobre las placas de Peyer y la bolsa de Fabricius. Parecería ocurrir una toma selectiva de antígeno en todos estos sitios, en relación al epitelio de los alrededores. Esto se aplica tanto a antígenos solubles como particulados, los cuales son transportados en el interior del folículo donde tomarían contacto con macrófagos dendríticos. Presumiblemente, éste es un sitio donde ocurre la expansión de células de memoria dirigida por el antígeno, y también ocurre la inmunización primaria. Existe un rápido recambio de linfocitos en estas zonas y una subsecuente emigración de células en los linfáticos. Estudios experimentales han revelado que estos linfocitos contienen un alto número de células B precursoras de IgA, y podrían repoblarse, especialmente tejidos mucosos, con células B que contienen IgA (8).

El sistema inmune común de mucosas permitiría la diseminación de células B IgA de un sitio mucoso hacia otro. Esta migración selectiva y localización resultó un eficiente medio para proveer sitios mucosos distantes con células productoras de IgA dirigidas hacia antígenos específicos. De esta manera, podría otorgársele a aquellos sitios mucosos protección contra organismos particulares hacia los cuales las células originales estaban dirigidas (8). De hecho, varios han sido los intentos de manipular el sistema inmune común de mucosas para proveer inmunidad mucosa en sitios distantes de aquel de inmunización (20,21).

El tracto respiratorio cuenta con la presencia de inmunoglobulinas, fundamentalmente IgA secretoria (IgA-S) e IgG (22-29). Datos provenientes de estudios realizados en humanos y conejos, sugieren que existe una disminución progresiva de los niveles de IgA (acompañada de un aumento en los niveles de IgG) a medida que se desciende desde el tracto respiratorio superior al inferior (24). Este hecho es esperable ya que el tracto respiratorio superior cuenta con una gran superficie de tejido mucoso cuyas características incluyen la producción de anticuerpos secretorios (2). El origen de la IgG en el tracto respiratorio inferior se encuentra aún en discusión; una porción de esta Ig podría provenir de transudación plasmática, mientras que parte de los niveles hallados podrían provenir de la síntesis "local" (esto implicaría la síntesis de Igs en los tejidos linfoides del pulmón propiamente dicho o en los ganglios regionales).

En comparación con lo conocido acerca de la la inmunidad humoral, poca es la información disponible relacionada con la inmunidad mediada por células en el pulmón. En su clásico trabajo de 1974, Reynolds demostró que luego de la inmunización por vía intranasal se alcanzaba un cierto grado de inmunidad mediada por células en el pulmón. Esta inmunidad era transitoria y menos persistente que la inmunidad local (29). Reynolds evaluó la inmunidad celular a través de la producción del factor de inhibición de la migración de los macrófagos, por lo que las conclusiones de este estudio podrían haber quedado ya invalidados a la luz de los actuales conocimientos. En efecto, hoy ha quedado demostrado que el factor de inhibición de la migración puede ser sintetizado tanto por linfocitos T como B (30). Estudios más recientes, sin embargo, han corroborado lo encontrado por Reynolds (31,32,33).

Los análisis tradicionales de inmunidad contra infecciones bacterianas han enfatizado el rol de las respuestas inmunes humorales en la resistencia a la infección con bacterias extracelulares, mientras que la inmunidad celular mediada por células T se cree que es esencial para resistir la infección de aquellas bacterias que viven intracelularmente. Sin embargo, Markham demostró la importancia potencial de la inmunidad celular mediada por células T en la resistencia del huésped a una bacteria extracelular como Pseudomonas aeruginosa, mostrando que ratones granulocitopénicos eran protegidos contra un desafío letal por esta bacte-

ria, mediante transferencia adoptiva de células T inmunes (34).

1.2.4. INFECCIONES RESPIRATORIAS.

El espectro clínico de las infecciones respiratorias varía en severidad desde el resfriado común hasta enfermedades que amenazan la vida, como la neumonía. Afortunadamente para la mayoría de los individuos, la combinación de una terapia antimicrobiana adecuada y los mecanismos de defensa activos del huésped, es suficiente para controlar la neumonía así como para prevenir la injuria pulmonar y la muerte. Sin embargo, para otros, la neumonía continúa siendo un serio problema médico y una causa que conduce a hospitalización y muerte. A este respecto, existen ciertas poblaciones de pacientes que están más en riesgo que otras, por ejemplo los niños en los países subdesarrollados y en vías de desarrollo (9).

Respecto a la prevención de las infecciones respiratorias un aporte importante lo constituye el control ambiental del medio hospitalario. Existen pocos sitios donde la variedad de microbios sea mayor, su concentración más alta, o sus oportunidades para la infección más numerosas que el ambiente hospitalario (35). La Organización Mundial de la Salud estimó que de 190 millones de personas admitidas en los hospitales de todo el mundo cada año, más de 9 millones adquieren infecciones nosocomiales, entre los cuales un millón mueren a causa de una infección hospi-

talaria. Los Centros para el Control de Enfermedades sugieren que el 50% de las infecciones hospitalarias pueden prevenirse (36).

La frecuencia relativa de las infecciones respiratorias nosocomiales representan un 16%, siendo P. aeruginosa, S. aureus y Klebsiella sp. las especies más frecuentemente aisladas (36). En países subdesarrollados y en vías de desarrollo, las infecciones respiratorias agudas constituyen una de las principales causas de mortalidad infantil. Los neonatos y los niños hospitalizados son sumamente vulnerables al ambiente de alto riesgo en el que se encuentran. En los infantes, las infecciones ocurren con mayor frecuencia, tienden a ser más severas y a durar más tiempo. Además de las infecciones que aparecen en estos grupos infantiles, existen otras no menos graves asociadas a niños con al menos una condición predisponente, como por ejemplo fibrosis quística, anomalías congénitas de varias clases, especialmente cardíacas y pulmonares, inmunodeficiencias congénitas y enfermedades malignas, entre otras (37).

Datos epidemiológicos revelan que Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae son los agentes etiológicos bacterianos más comunes en niños con neumonía típica (38). En los huéspedes con un compromiso de sus defensas pulmonares se observa una alta incidencia de bacilos gram-negativos, especialmente P. aeruginosa y enterobacterias.

Este trabajo de investigación se basó en el estudio de las infecciones respiratorias agudas provocadas por dos microorganismos en particular: P. aeruginosa y S. pneumoniae, con el fin último de lograr métodos inmunoprolácticos apropiados para el tratamiento del grave problema que representan las neumonías bacterianas, causadas tanto por microorganismos gram-negativos como por gram-positivos, especialmente en la infancia.

1.3. INMUNIZACION LOCAL

Varias han sido las estrategias que han sido consideradas para aumentar la respuesta inmune de las mucosas. La vía de administración del inmunógeno es un punto importante cuando se considera la inmunización activa como método para producir un aumento de las defensas de tejidos mucosos. El concepto corrientemente aceptado de la existencia de un sistema inmune común de mucosas ha provisto un gran ímpetu en la utilización del intestino para inducir respuestas protectoras contra un gran número de patógenos de mucosas (6). Sobre esta base, estudios realizados con el virus Sendai, concluyeron que la combinación de inmunización intranasal (i.n.) e intragástrica en el tracto respiratorio, producían una respuesta inmune protectora contra un microorganismo virulento (20).

En otros trabajos recientes, se utilizó la vacunación i.n. de ratas con mutantes ts de Mycoplasma pulmonis con el fin de mi-

metizar la exposición natural a la cepa virulenta de este microorganismo. Los resultados indicaron que los animales resultaron protegidos significativamente (39). Ha sido propuesto la utilización de la ruta mucosa de inmunización primaria en vez de la vía parenteral, para vacunar con vacunas vivas atenuadas de sarampión (40). Existen, además evidencias que vacunas anti-idiotípicas, específicamente dirigidas al sistema inmune secretor, inducirían respuestas inmunes protectoras contra patógenos de superficies mucosas (41). Algunos estudios han demostrado también que la inmunización en la vecindad de tejidos mucosos podría producir altos títulos de IgA en secreciones, como por ejemplo en tracto reproductor femenino (42). La ruta de vacunación local mimetizaría la exposición natural al patógeno que ingresa por esa vía. Se ha sugerido que dosis de antígeno relativamente pequeñas, administradas por ruta i.n., provocarían una respuesta inmune local del tracto respiratorio (1).

Bienenstock sugirió que el mejor camino para producir una respuesta inmune local respiratoria de IgA, consistiría en presentar el antígeno primario y la dosis suplementaria de éste al tracto respiratorio. La ruta de vacunación es muy importante, y el peor método de inmunización para producir IgA-S en el tracto respiratorio, es presentar el antígeno únicamente por ruta parenteral (8). Debido a la aparente compartimentalización que existiría entre los sistemas IgA-S y sistémica, la inmunización parenteral usualmente no estimularía una respuesta de IgA en secrecio-

nes externas (41).

La inmunización local pulmonar, inducida con una gran variedad de antígenos en humanos normales y en animales, mostró excelentes respuestas de anticuerpos en las secreciones respiratorias. La respuesta inmune, evaluada en estas secreciones luego de la vacunación local, a menudo es superior a la respuesta concomitante en suero, y la inmunización sistémica es a menudo menos eficiente en la producción de una respuesta de anticuerpos en secreciones pulmonares (43). La estimulación de las defensas locales contra patógenos respiratorios y entéricos por el agente vivo, ya sea a través de la infección natural o a través de inmunización con una cepa atenuada, ha sido, reconocido como el más efectivo inductor de inmunidad duradera (44).

1.4. INFECCIONES POR Pseudomonas aeruginosa.

1.4.1. GENERALIDADES

P. aeruginosa, aislada por primera vez por Gessard en 1882, producía infecciones poco frecuentes hasta la introducción de las sulfonamidas y penicilinas (45), que provocaron una suerte de selección artificial de los géneros más resistentes a los agentes antimicrobianos.

P. aeruginosa es un bacilo gram-negativo, aerobio estricto,

versátil, que tiene una gran potencialidad metabólica y variados mecanismos de virulencia. Esta versatilidad le permite adaptarse a condiciones ambientales variables y frecuentemente adversas. La característica que distingue principalmente a P. aeruginosa de las otras especies de Pseudomonas es la producción de piocianina, un pigmento soluble en agua que da a las colonias y tejidos infectados una característica coloración azul-verdosa comúnmente asociada con esta bacteria (46).

Es de particular importancia médico-epidemiológica la capacidad que posee P. aeruginosa para sobrevivir y multiplicarse en agua destilada, lo cual ocasiona severos problemas en medios nosocomiales. La resistencia de esta bacteria a los desinfectantes, especialmente compuestos de amonio cuaternario, contribuyen a su capacidad para persistir en el medio ambiente (46).

1.4.2. EPIDEMIOLOGIA.

P. aeruginosa ha sido objeto de numerosos estudios epidemiológicos, debido a varios factores, entre ellos: (i) su potencialidad para causar epidemias entre pacientes hospitalizados con compromiso de sus defensas, (ii) el bajo porcentaje de individuos sanos portadores de esta bacteria, y (iii) la correlación que se halló entre colonización y riesgo incrementado de infección subsecuente (46).

En individuos saludables, es poco frecuente recuperar P. aeruginosa de la flora microbiana autóctona; sin embargo, es causa de aproximadamente el 12% de todas las infecciones hospitalarias, especialmente del 17% de todas las neumonías, hecho de particular importancia considerando que la mortalidad de las infecciones por P. aeruginosa es muy elevada (46).

Los grupos de mayor riesgo a las infecciones por P. aeruginosa son aquellos cuyos mecanismos de defensa se hallan comprometidos. Uno de los factores predisponentes más importantes para la infección por P. aeruginosa es la granulocitopenia (47,48).

La neumonía por P. aeruginosa se da con muy alta frecuencia en pacientes leucémicos, pacientes afectados de fibrosis quística y pacientes con quemaduras extensas (45).

1.4.3. FACTORES DE VIRULENCIA DE Pseudomonas aeruginosa.

P. aeruginosa posee una gran variedad de factores de virulencia. La contribución exacta de cada uno de estos factores a la patogénesis de las infecciones por P. aeruginosa no ha llegado aún a ser dilucidada completamente (49). Entre los factores de virulencia más importantes, debemos citar: i) exoenzimas como elastasa (50), y proteasas (43,51). Estas enzimas degradan la matriz del tejido conectivo, con lo que favorecen la penetración de la bacteria en los tejidos. P. aeruginosa también produce hemolisina y fosfolipasa (26). ii) Exotoxinas: la más importante es

la exotoxina A, cuya acción deriva de su capacidad de inhibir la síntesis protéica de las células del huésped (26). P. aeruginosa también produce exotoxina S, de acción semejante a la exotoxina A (52). iii) Endotoxina: factor de virulencia de todos los gram-negativos. iv) Fimbrias (pili): órgano de adherencia de muchos microorganismos. v) Matriz exopolisacárida, que facilita la adherencia de P. aeruginosa a los epitelios. vi) Secreción de alginatos, que forman una suerte de cápsula que protege al microorganismo de los mecanismos de defensa del huésped.

1.5. INFECCIONES POR Streptococcus pneumoniae.

1.5.1. GENERALIDADES.

S. pneumoniae fue aislado por primera vez en 1880 de portadores de este microorganismo en los Estados Unidos (Stenberg, 1881) y en Francia (Pasteur, 1881). Durante los diez años posteriores a su descubrimiento se demostró que esta bacteria era un importante patógeno para el hombre. Su rol como el principal causante de neumonía bacteriana adquirida en la comunidad, fue demostrado por Weichselbaum, en 1886; y su habilidad para producir otitis media, meningitis, endocarditis y artritis fue reconocido posteriormente, en 1890 (53). En 1897, utilizando un método de aglutinación y suero de fase convaleciente de pacientes con infección por neumococos, Bezacon y Griffon demostraron la existencia de varios tipos de S. pneumoniae (54).

El "neumococo" crece característicamente en pares, apareciendo a menudo como diplococos de forma lanceolada y en cadenas cortas, cuando se recuperan de sus huéspedes mamíferos. Morfológicamente, el neumococo no puede ser distinguido de otros estreptococos componentes de la microflora respiratoria humana. Las características que facilitan su identificación incluyen su grampositividad, su morfología de colonia mucoide y alfa-hemólisis cuando crecen en agar sangre, su habilidad para fermentar inulina, su rápida autólisis al ser expuestos a detergentes (solubilidad en bilis), su sensibilidad a etilhidrocupreína HCl (Optoquina), y su polisacárido de pared celular o C polisacárido.

La superficie externa del neumococo consiste básicamente de tres partes: la cápsula, la pared celular y la membrana plasmática. La especificidad de tipo dentro de las especies de neumococos está definida por la cápsula, la cual está enteramente compuesta por polisacárido. La pared celular consiste de un esqueleto de peptidoglicano al cual, un polímero de polisacárido, designado "polisacárido C", está unido. También han sido descritas proteínas asociadas a la pared celular. Estas incluyen proteínas tipo-específicas, designadas "proteínas M" (54).

En 1932 la clasificación de neumococos incluía 32 tipos capsulares específicos. El hecho que la cápsula determina el serotipo fue primeramente descubierto por Avery, Heidelberger y Goebel. Estudios sistemáticos realizados por estos autores demos-

traron que esta sustancia soluble específica característica de neumococos está compuesta por carbohidratos complejos (polisacáridos) y que el componente polisacárido da una reacción de precipitina con antisuero homólogo (54). En la actualidad se han reconocido 83 tipos de neumococos (53).

1.5.2. EPIDEMIOLOGIA.

S. pneumoniae es un componente de la microflora normal de la nasofaringe humana. La colonización puede comenzar muy pronto luego del nacimiento. La adquisición de un tipo capsular para el cual no ha habido una previa exposición puede conducir al desarrollo de anticuerpos contra el polisacárido de ese tipo en ausencia de enfermedad. También es probable que el contacto con bacterias de otras especies productoras de polisacáridos similares a aquellos de algunos polisacáridos capsulares de neumococos pueden ser responsables del desarrollo de anticuerpos humorales de tipo cruzado. Estos eventos podrían ser responsables de la denominada "inmunidad natural".

El humano puede estar colonizado simultáneamente por más de un tipo de neumococo. Sin embargo, la infección simultánea con más de un tipo es poco común. En pacientes pediátricos, el grado de portación de algunos tipos de neumococos o grupos causantes de infección frecuente, tales como los grupos 6, 9 y 23, puede ser alto, mientras que aquel del tipo 14, la causa más común de in-

fección bacteriémica en la infancia, es bajo. La presencia frecuente de neumococos como un componente de la flora normal del tracto respiratorio superior hace incierta la identificación de un aislamiento de neumococos de secreciones respiratorias expectoradas, como la causa de enfermedad pulmonar.

No existen datos exactos sobre el promedio de la incidencia y causas específicas de neumonía por S. pneumoniae. Las estimaciones deben ser realizadas de reportes de fuentes variadas y de variado grado de exactitud. Las enfermedades causadas por S. pneumoniae están comprendidas entre las principales causas de mortalidad en los Estados Unidos (55), ocasionando aproximadamente 150.000-570.000 casos de neumonía por año en este país (56). En países del tercer mundo, cada 7 segundos un niño menor de 5 años muere a causa de infección respiratoria aguda, usualmente pneumonia, y uno de los principales agentes causantes de ésta es S. pneumoniae, constituyendo una de las principales causas de mortalidad infantil (57). La mortalidad infantil debida a infecciones agudas del tracto respiratorio inferior es diez veces superior en América Central que en Norte América. En nuestro país, datos epidemiológicos locales revelan que S. pneumoniae es la bacteria más frecuentemente aislada en infecciones agudas del tracto respiratorio inferior, en niños de menos de cinco años de edad (58). El porcentaje de ataque de neumonía varía con la edad y es el más alto en la infancia y luego de la sexta década de vida. La mortalidad de neumonía por neumococo no tratada

varia entre 20 y 35% (53).

1.5.3. FACTORES DE VIRULENCIA DE Streptococcus pneumoniae.

El neumococo es un excelente ejemplo de un parásito extracelular que daña los tejidos del huésped sólo mientras permanece fuera de la célula fagocítica. La protección contra la fagocitosis es provista por la cápsula, la cual produce un efecto antifagocítico (59). Es decir, la cápsula de S. pneumoniae es un *si-ne qua non* de la virulencia del microorganismo (53). La remoción de la cápsula por tratamiento con una enzima específica para el polisacárido convierte al organismo en no patogénico y fácilmente susceptible a la fagocitosis (59).

En condiciones de crecimiento óptimas in vivo, los neumococos realizan una máxima elaboración de sus cápsulas; en contraste, los organismos pueden perder sus cápsulas con repetido pasaje in vitro, especialmente bajo circunstancias adversas. Estas cepas no capsuladas son llamadas "rugosas", en contraste con las cepas capsuladas que son denominadas "lisas". Ambos tipos de cepas, lisas y rugosas, difieren ampliamente en virulencia; por ejemplo, 10 bacterias capsuladas de algunos tipos pueden matar a un ratón, mientras que son necesarios 10^6 neumococos no capsulados para producir el mismo efecto. La invasividad del microorganismo depende tanto del tamaño como de la composición química de la cápsula. Además, la susceptibilidad a los serotipos de pneumo-

cocos varía con las especies de huésped (54).

La neuroaminidasa es uno de los factores que contribuyen a la invasividad del organismo. La adherencia a células epiteliales puede también ser importante para la colonización de nasofaringe del neumococo o la inducción de otitis media. Respecto a las toxinas, S. pneumoniae produce una hemolisina, la neumolisina O, toxina citolítica que deteriora las membranas celulares. Además de su actividad hemolítica es dermatóxica y letal. La actividad purpurogénica es producida por una sustancia que ocasiona púrpura y hemorragia dérmica en animales de experimentación. Está asociada con el mucopéptido de la pared celular y es liberada durante la autólisis (59,60).

Las células de neumococos se lisan durante incubación prolongada. La lisis ocurre en presencia de agentes de superficie activos y agentes antimicrobianos que impiden la síntesis de la pared celular. La autolisina de neumococos es importante no sólo en la actividad de agentes antimicrobianos bactericidas, sino también en la división celular y separación, competencia para la transformación genética e infección por bacteriofago (60).

1.6. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS CAUSADAS POR P. aeruginosa y S. pneumoniae.

Un importante medio para prevenir las infecciones hospitala-

rias por P. aeruginosa es el control ambiental. Durante muchos años, no hubo una terapia efectiva para las infecciones causadas por Pseudomonas. Con el advenimiento de la penicilina, la frecuencia de las infecciones por P. aeruginosa se incrementó, debido a su enorme resistencia a los antibióticos. Hoy día se dispone de nuevos derivados penicilínicos, aminoglicosídicos y cefalosporínicos de tercera generación que tienen buena acción pseudomocida.

Los agentes antipseudomonales son a menudo administrados sólo luego que el diagnóstico ha sido establecido. La mortalidad en las primeras 24 horas alcanza casi un 35% si la terapia apropiada no se instituye inmediatamente (45). La alta mortalidad asociada con las infecciones por P. aeruginosa en pacientes con sus defensas comprometidas, ha conducido a muchos investigadores a concluir que la terapia de antibióticos sola no es suficiente. Este concepto ha llevado al desarrollo de varios métodos para el tratamiento de las infecciones por esta bacteria, entre ellos la inmunización pasiva (61,62), que ha probado ser efectiva en un modelo granulocitopénico de infección experimental por P. aeruginosa (63), y la terapia de transfusión de granulocitos, método que se encuentra aún en etapas de experimentación clínica (64).

Ha sido reportado que la malnutrición es un factor de riesgo significativo para la mortalidad en niños con neumonía causada por S. pneumoniae. El entendimiento del mecanismo para tal pre-

disposición podría permitir que una terapia específica fuera aplicada en el momento que el niño es primeramente visto por un especialista (65). La terapia de antibióticos sola no es un camino satisfactorio para controlar la infección por neumococos. Primeramente, la terapia de antibióticos no reduce la mortalidad en los primeros tres días del tratamiento. Segundo, los países en desarrollo no pueden suministrar antibióticos efectivamente en áreas rurales remotas donde ocurre una sustancial proporción de las muertes. Tercero, la resistencia a los antibióticos es un problema de creciente importancia (66).

Sin lugar a dudas, un método postulado por diversos autores para prevenir las infecciones respiratorias agudas tanto por P. aeruginosa, como por S. pneumoniae es la inmunización activa artificial. En este sentido, hay una variedad de productos que podrían ser utilizados como vacunas.

1.7. VACUNAS DISPONIBLES CONTRA Pseudomonas aeruginosa.

En las primeras pruebas clínicas en las que se evaluó la eficacia de la inmunoterapia contra P. aeruginosa se utilizaron vacunas construídas con el microorganismo completo, muerto, ya sea por calor o por tratamiento con formalina (67,68). Aunque se observó una mayor sobrevivencia y una reducida incidencia de septicemia en los grupos inmunizados, el escaso número de pacientes y el deficiente diseño experimental de la prueba no permitieron obte-

ner conclusión firme alguna.

Las vacunas desarrolladas más recientemente son multivalentes y consisten en antígenos extraídos de cepas de serotipo definido. Una de estas vacunas es una preparación heptavalente de lipopolisacárido basada en el sistema de inmunotipificación de Fisher (Pseudogen) (69). La eficacia de esta vacuna ha sido probada en varias poblaciones de pacientes con riesgo de infección por P. aeruginosa. La vacunación no disminuyó significativamente la incidencia de las infecciones por P. aeruginosa, ni ofreció protección contra la infección bacteriémica, si bien se mostró promisorio para el control de infecciones letales por P. aeruginosa en ciertas poblaciones de pacientes, su uso ha sido limitado debido a las reacciones adversas que presenta (70). Los ensayos con la vacuna polivalente Pseudogen sirvieron para demostrar que la inmunidad serotipo-específica confiere mayor protección que la inmunidad cruzada producida por otros componentes bacterianos (71).

Miller y col. han descrito una vacuna polivalente que contiene antígenos extraídos de 16 serotipos de P. aeruginosa (PEV-01). El análisis cuantitativo de la vacuna revela que ésta contiene 13% de proteínas, 13% de carbohidratos y 20% de lípidos. Los resultados obtenidos llevaron a concluir que la protección observada se debió en parte a la presencia de anticuerpos contra exoproductos tóxicos (70). Homma y col. han aislado un compues-

to protéico de P. aeruginosa al que denominaron endotoxina protéica original (72). La mayor proteína de este compuesto parece ser un antígeno común de superficie compartido por la mayoría de los serotipos de P. aeruginosa, aunque la protección que provee parece no extenderse a los inmutipos 3 y 4 de Fisher (73).

Las vacunas recientemente desarrolladas están constituidas por preparaciones conjugadas; un ejemplo de tales vacunas es la preparación de polisacárido O conjugado a un toxoide (43). Una preparación de toxoide de exotoxina A de P. aeruginosa ha sido probada recientemente en pacientes pediátricos afectados de fibrosis quística (74).

1.8. VACUNAS DISPONIBLES CONTRA Streptococcus pneumoniae.

La primera vacuna contra neumococos fue producida en 1911. En 1937, un estudio de inmunización de infantes con una vacuna de neumococo tipo 1 completo proveyó evidencia de la subóptima respuesta del hombre a antígenos de polisacárido en etapas tempranas de la vida. En 1938, las investigaciones de Felton culminaron en las primeras pruebas de campo a gran escala de una vacuna bivalente de los polisacáridos capsulares de neumococos tipos 1 y 2. Aunque el grado de ataque por neumonía en los vacunados fue menor que en los controles, los estudios bacteriológicos realizados fueron incompletos. En 1945 se estableció la eficacia de una vacuna polivalente de polisacárido capsular de neumococo. Se determinó que la protección era tipo-específica. Estudios adi-

cionales de vacunas similares mostraron que podían administrarse hasta seis polisacáridos capsulares conjuntamente sin interferencia antigénica o efectos adversos (53).

Se ha establecido la eficacia de una vacuna polivalente de polisacáridos capsulares de S. pneumoniae que contiene 25ug de polisacárido de 23 serotipos. Aunque la eficacia de una vacuna contra este microorganismo en adultos sanos no se cuestiona, aún no se han hallado vías adecuadas para inmunizar en forma efectiva a niños de menos de dos años de edad con los polisacáridos de neumococos. Estos niños tienen una respuesta de anticuerpos pobre contra la mayoría de los serotipos de esta vacuna (66). Ha sido demostrado el aumento de la inmunogenicidad de los polisacáridos al ser acoplados a proteínas. En la mayoría de los casos, los oligo o polisacáridos han sido acoplados a grandes proteínas inmunogénicas como el toxoide tetánico o el toxoide diftérico.

Recientemente se han realizado estudios para investigar si los portadores con capacidad adyuvante afectan la respuesta de anticuerpos a polisacáridos cuando se utilizan como proteínas transportadoras como las mencionadas en vacunas conjugadas. Se sabe de estudios previos que la respuesta de anticuerpos al hapteno conjugado a una proteína puede ser o bien suprimida o bien aumentada por inmunización previa con la proteína transportadora sola. Serán necesarios más estudios para dilucidar el efecto de un carrier primante sobre los resultados de la vacunación con

conjugados polisacárido-proteína (75).

1.9. BACTERIAS ATENUADAS: MUTANTES TERMOSENSIBLES (ts).

Desde los comienzos de la microbiología, las cepas bacterianas atenuadas han sido utilizadas para inducir inmunidad contra enfermedades infecciosas. La atenuación por termosensibilidad ofrece varias ventajas específicas sobre otras formas de atenuación genética. Estas cepas mutantes resultarían seguras, ya que el problema inherente a la reversión a la virulencia sería superado combinando múltiples mutaciones de idéntico fenotipo en una cepa, reduciendo de esta manera la frecuencia de reversión a valores insignificantes. Además, estos mutantes contendrían todos los antígenos de superficie del patógeno salvaje, en su conformación natural (76). La utilización de este tipo de mutantes como vacunas ha sido investigada y probada para el control de enfermedades virales y bacterianas en humanos y animales, con resultados promisorios.

Está aceptado que las vacunas con cepas vivas son superiores a aquellas que contienen cepas muertas. Las vacunas vivas usualmente proveen inmunógenos con mayor capacidad protectora tanto desde el punto de vista cuali como cuantitativo, ya que los procedimientos químicos y físicos utilizados para la preparación de vacunas muertas pueden alterar a los inmunógenos. Las vacunas compuestas por cepas vivas podrían también estimular la inmunidad

de larga duración, ya que el organismo se multiplicaría en el huésped y de esta manera produciría una continua estimulación del sistema inmune, tanto local como sistémicamente (39).

Las cepas mutantes ts de P. aeruginosa fueron descritas por Morris Hooke y col. (77). Estos mutantes crecen bien a bajas temperaturas (por debajo de 32°C) pero no se replican, o lo hacen un número limitado de veces, cuando se los transfiere a la temperatura corporal de los mamíferos. La inocuidad de una vacuna ts está dada por la inclusión de múltiples mutaciones de idéntico fenotipo, con el objeto de llevar la frecuencia de reversión a valores insignificantes (10^{-21}) (78).

Estudios preliminares de Morris Hooke y col. demostraron que la inmunización con distintos mutantes portadores de una única lesión genética induce protección contra el subsecuente desafío con P. aeruginosa de la cepa salvaje (cs) parental (77). Sorde-lli y col. han demostrado: a) que la inmunización local pulmonar con un mutante ts de P. aeruginosa produce una exacerbación de los mecanismos de defensa del tracto respiratorio bajo contra P. aeruginosa (79); b) que la exacerbación de las defensas contra P. aeruginosa no se correlaciona, en las etapas tempranas de la infección, con los niveles de anticuerpo circulante (80); y c) que esta exacerbación es específica para el género e inmunotipo bacteriano y que no depende de fenómenos inflamatorios inespecíficos (81). Otros estudios por los mismos autores han obtenido

información referente a aspectos relacionados con las interacciones que ocurren en las etapas tempranas de invasión de las vías aéreas, especialmente con referencia a la velocidad de duplicación in vivo (82,83), a la liberación de factores con actividad quimiotáctica in vivo e in vitro (84), a las reacciones inflamatorias que produce P. aeruginosa (85,86,87) y a la participación del quinto componente del complemento en las defensas pulmonares contra dicho microorganismo (88). Estos hallazgos sustentan la hipótesis de que los mutantes ts mimetizarían los eventos que ocurren en la fase temprana de la infección, produciendo una inmunidad semejante a la inducida por la infección misma.

1.10. HIPOTESIS DE TRABAJO

Nuestra hipótesis de trabajo es que la estimulación antigénica local de las mucosas es el método más eficaz para producir una exacerbación de los mecanismos de defensa contra patógenos invasores, permitiendo la diferenciación de linfocitos B locales en células plasmáticas secretoras de anticuerpos específicos. Dado que la mejor protección parece estar inducida por la infección natural, la utilización de mutantes ts como inmunógenos sería, a nuestro entender, la mejor manera de mimetizar tal infección. Se utilizará un antígeno que contiene todas las características de superficie del patógeno salvaje, en su conformación natural.

1.11. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Los mutantes ts reproducirían en el huésped los primeros estadios de la infección natural. Por este motivo, el primer objetivo específico fue:

- a. determinar el tiempo de permanencia nasofaríngea de dos tipos distintos de mutantes ts de P. aeruginosa, uno con capacidad replicativa nula y otro con capacidad replicativa limitada, en un huésped normal.

Debido a que uno de los grupos de individuos que podrían ser objeto de la inmunización activa son aquellos que recibirán tratamiento citostático, el siguiente objetivo específico fue:

- b. determinar si se verifica una permanencia prolongada de los dos tipos de mutantes ts en el bazo de ratones normales y de ratones granulocitopénicos, luego de una inoculación intraperitoneal.

Por el mismo motivo explicado en el punto b, y para determinar el período durante el cual el huésped inmunizado se convierte en portador sano, el próximo objetivo específico fue:

- c. determinar el tiempo de permanencia en heces de los dos tipos de mutantes ts y de la cepa salvaje de P. aeruginosa en

un huésped normal y en un huésped granulocitopénico.

Con el fin de probar la eficacia inmunizante de los mutantes ts por vía local, el siguiente objetivo específico fue:

- d. determinar la capacidad protectora inducida por inmunización local con dos tipos distintos de mutantes ts en un modelo granulocitopénico de infección pulmonar letal por P. aeruginosa.

Para verificar el efecto de la inmunidad local versus la sistémica luego de inmunización con mutantes ts, se determinó:

- e. la capacidad protectora inducida por inmunización local versus inmunización intraperitoneal con dos tipos distintos de mutantes ts y con la cepa salvaje muerta por formolización en un modelo granulocitopénico de infección pulmonar letal por P. aeruginosa.

Para determinar los mecanismos involucrados en la protección contra el desafío por P. aeruginosa, se evaluaron:

- f. distintos parámetros de inmunidad local humoral pulmonar luego de la inmunización local con mutantes ts de distinto fenotipo de P. aeruginosa.

Con el objeto de establecer la contribución de los distintos tipos de células fagocíticas en la depuración pulmonar, se determinaron:

- g. los cambios existentes en la población celular del pulmón murino en los estadios primarios de la infección por S. pneumoniae.

Con el objeto de verificar si la utilización de mutantes ts como inmunógenos es la mejor manera de mimetizar la infección natural, se realizó la

- h. obtención de mutantes ts de S. pneumoniae a partir de una cepa de origen local.

Para determinar los mecanismos involucrados en la inmunidad inducida luego de vacunación con cepas ts de S. pneumoniae, se evaluó:

- i. el rol que desempeñan las defensas humorales locales luego de la inmunización local y sistémica contra S. pneumoniae.

A fin de determinar la mejor ruta de vacunación con los inmunógenos utilizados, se determinó:

- j. cuál es la vía de inoculación con la que se obtiene la

máxima protección contra la infección producida por microorganismos gram-negativos y gram-positivos.

Con el objeto de determinar las interrelaciones que pudieran existir entre patógenos del tracto respiratorio, se realizaron experimentos para:

- k. verificar si existe interferencia de un germen gram-negativo sobre los mecanismos de defensa contra un germen gram-positivo y viceversa, luego de la exacerbación de las defensas pulmonares contra uno y otro microorganismo, en un modelo de desafío mixto.

Para estudiar la susceptibilidad a ciertas infecciones bacterianas en relación a la edad del huésped, se estudió:

1. la depuración pulmonar de P. aeruginosa en función de la edad en un modelo murino.

2. MATERIALES Y METODOS

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Cepas bacterianas y cultivos. Se utilizaron cepas de P. aeruginosa inmunotipo 1 de Fisher-Devlin-Gnabasik, gentilmente cedidas por la Dra. Anne Morris Hooke, Miami University, Oxford, Ohio, USA. Se utilizaron dos cepas mutantes ts de P. aeruginosa que pueden duplicarse únicamente a temperaturas por debajo de los 32°C. Ellos son: D/1/8, que es un no replicante, es decir que luego de ser transferido a la temperatura no permisiva cesa de inmediato su duplicación, manteniendo su viabilidad; y E/9/9, que es un replicante restringido, es decir continúa duplicándose por un número limitado de veces luego del cambio de temperatura, antes de cesar por completo su duplicación. Respecto a S. aureus, se utilizó una cepa aislada de un caso de mastitis bovina (INTA, Buenos Aires) y un derivado mutante ts de fenotipo no replicante obtenido por mutagénesis (mutante 17). Las bacterias se cultivaron en caldo tripticase soya (TSB) en un incubador de aire con agitación rotativa a 300 rpm a 37°C (P. aeruginosa) o a 28°C (mutantes ts). Todas las cepas fueron mantenidas en el laboratorio por pasaje en placas de agar tripticase soya (TSA). Se utilizó una cepa de S. pneumoniae de origen local, aislada de un paciente de nuestro medio afectado de neumonía.

2.2. Ratones. Se utilizaron ratones no endocriados de la cepa Swiss. Los animales fueron obtenidos del bioterio del Departamento de Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones

Hematológicas, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, donde fueron mantenidos durante los experimentos en condiciones estándar. Algunos grupos de animales fueron obtenidos de una fuente comercial (Izaguirre, Buenos Aires). Las últimas series de experimentos fueron realizadas con ratones obtenidos del bioterio del Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, a partir de la colonia Swiss gentilmente cedida por el Departamento de Medicina Experimental.

2.3. Producción de granulocitopenia en ratones. La granulocitopenia fue inducida en ratones por tratamiento con una única dosis intraperitoneal (i.p.) de ciclofosfamida (SIGMA, St. Louis, Mo.) de 200 mg/kg (89). Las inoculaciones bacterianas fueron realizadas a las 96 horas de la inyección de ciclofosfamida, en el momento en que la depleción granulocítica es máxima. Cuando los animales tuvieron que ser mantenidos por un período de más de 4 horas luego del desafío bacteriano, recibieron otra inyección de ciclofosfamida, en la misma dosis, cada 96 horas a partir de la primera inyección.

2.4. Lavados de la cavidad naso-bucofaríngea. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente después del sacrificio se realizó una retrocanulación traqueal practicada mediante una pequeña incisión en la tráquea por la cual se colocó una cánula de 1,4 mm. Los lavados se llevaron a cabo ha-

ciendo pasar 10 ml de solución salina de ClNa al 0,85% por animal. Las suspensiones de lavado fueron convenientemente diluídas y las diluciones sembradas cuantitativamente en placas de TSA. Aquellas suspensiones que no fueron diluídas para su cultivo cuantitativo fueron además sembradas en medio *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA) (Difco Lab., Detroit, Michigan). Se confirmó la presencia de *Pseudomonas* por la producción de piocianina y por cultivo en medio Triple Sugar Iron (TSI, Difco). Las colonias sospechosas fueron sembradas en tubos con medio en pico de flauta y se cultivaron a 37°C (cepa salvaje) o a 28°C (mutantes). *P. aeruginosa* vira al fucsia el pico de flauta y no crece en profundidad. La presencia de los mutantes ts se confirmó además por cultivo diferencial de placas replicadas de agar a 28 y 37°C.

2.5. Homogenatos de bazo. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajo el bazo de cada animal y se colocó en un tubo de vidrio con 1 ml de agua destilada. El órgano fue lavado por agitación rotativa unos minutos y posteriormente se descartó el líquido. Se agregó nuevamente 1 ml de agua destilada y se realizó la homogeneización del material por medio de un aparato de Potter-Elvehjem con tubos de vidrio y émbolos de teflón y acero inoxidable. Se completó luego con 4 ml de agua destilada para llegar a un volumen final de 5 ml de homogenato por animal. Este homogenato fue diluído convenientemente y sembrado sobre placas de TSA para recuento cuantitativo.

2.6. Producción de infección pulmonar. El desafío pulmonar fue producido por exposición de los ratones a un aerosol conteniendo P. aeruginosa, S. pneumoniae o una mezcla P. aeruginosa-S. aureus, según el caso. La exposición se llevó a cabo en una cámara especial construida sobre la base del diseño original descrito por Henderson (90). Los animales se expusieron al aerosol infectante durante 30 min y recibieron dosis que oscilaron en el orden de $6-8 \times 10^6$ UFC.

2.7. Plan de inmunización. Ratones Swiss fueron inmunizados por vía intranasal (i.n.) o i.p. con distintas dosis de los mutantes ts D/1/8, E/9/9, 17 o J/3, o con las cepas parentales muertas por formolización o por calor, según el caso. Los animales recibieron uno, dos o tres inóculos espaciados entre ellos por una semana, previos al desafío con la cepa salvaje de P. aeruginosa o P. aeruginosa-S. aureus, según el caso. Se utilizaron 12 animales como controles de nebulización y 16 animales como controles de inmunización. Se realizaron desafíos por aerosolización con dosis variables de P. aeruginosa y S. aureus.

2.8. Inmunidad humoral local. La presencia de anticuerpos fue determinada por un método de micro-ELISA (80). A manera de antígeno se utilizó una preparación de P. aeruginosa inmutotipo 1 muerta por tratamiento con formol 1% o preparaciones de S. pneumoniae muertas por calor, según el caso. Las bacterias muertas fueron adsorbidas a microceldas (placas de 96 celdas) por incuba-

ción de 18 horas a 4°C en buffer de bicarbonato de sodio, pH 9.6. Las preparaciones de IgG e IgM de cabra purificada por cromatografía de afinidad (anticadenas pesadas gamma y mu) conjugada con fosfatasa alcalina fueron obtenidas de los laboratorios Cappel (West Chester, Pennsylvania, USA) o de SIGMA Chemical Co. Preparaciones similares anti-cadenas pesadas alfa conjugada con la misma enzima fueron obtenidas de los laboratorios Kirkegaard & Perry (Gaithersburg, Maryland, USA) y de SIGMA Chemical Co. El sustrato para la fosfatasa alcalina fue una solución 1 mg/ml de p-nitrofenil fosfato en un buffer de carbonato de sodio, pH 9.8. Se determinó la presencia de anticuerpos en muestras de líquido de lavado pulmonar concentradas por medio de micro-concentradores descartables Centricon (Amicon Corp., Lexington, Massachusetts, USA) y en muestras de suero.

2.9. Obtención de líquido de lavado pulmonar. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente después del sacrificio se realizó una canulación traqueal practicada mediante una pequeña incisión en la tráquea por la cual se colocó una cánula de 1,4 mm. La cánula fue asegurada ligándola con hilo de cirugía. Los lavados se llevaron a cabo haciendo pasar 1 ml de solución salina de ClNa al 0,85% a través de la cánula. El volumen de solución salina fue introducido y reinyectado 5 veces a intervalos de 30 segundos. Las células recuperadas por lavado pulmonar fueron sedimentadas por centrifugación a 200 g durante 5 minutos a 4°C y descartadas. Los sobrenadantes fueron decantados

y mantenidos a -20°C hasta el momento del ensayo.

2.10. Detección de células productoras de anticuerpos por ELISPOT. Se evaluó la respuesta inmune humoral local pulmonar a través de la medición de células productoras de IgG e IgM mediante un inmunoensayo en fase sólida basado en los principios del método de ELISA. Las células fueron obtenidas de ganglios mediastinales de ratones inmunizados y como antígeno se utilizó una preparación de P. aeruginosa inmunotipo 1 muerta por calor. Las bacterias muertas fueron adsorbidas a microceldas por incubación de 18 horas a 4°C en buffer de carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Las suspensiones celulares fueron incubadas en placas con el antígeno previamente adsorbido, en atmósfera húmeda a 37°C durante 1-2 horas. Los conjugados utilizados fueron preparaciones de IgG e IgM de cabra purificada por cromatografía de afinidad (anti-cadenas pesadas gamma y mu, SIGMA Chemical Co.) conjugada con fosfatasa alcalina. El sustrato de la enzima fosfatasa alcalina que se utilizó en este sistema fue 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato y fue disuelto en buffer fosfato aceptor 2-amino-2-metil-1-propanol (SIGMA, St. Louis, Mo). Se utilizó una solución mezcla de sustrato-agarosa, convenientemente preparada (91,92,93). Los anticuerpos se unen al antígeno dentro del microambiente inmediato de las células secretoras de anticuerpos, produciendo zonas localizadas de viraje del sustrato, que se visualizan como "puntos" en el medio semisólido.

2.11. Mutagénesis, enriquecimiento y aislamiento de mutantes ts de *S. pneumoniae*. Se utilizaron métodos estándar de mutagénesis química y enriquecimiento para aislar mutantes ts de *S. pneumoniae* (94). Se utilizaron dosis mutagénicas óptimas de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (disuelta en acetona) sobre cultivos en fase logarítmica de *S. pneumoniae*. Luego de 10 minutos a 37°C (sin aereación), los cultivos fueron lavados tres veces, resuspendidos en medio de cultivo, e incubados durante toda la noche a la temperatura permisiva (28°C) antes de ser sometidos a un ciclo de enriquecimiento con Penicilina-G (100 U). La adición del antibiótico fue retrasada por 1-2 horas después de que los cultivos fueran transferidos a la temperatura no permisiva (37°C), para enriquecer en mutantes ts de fenotipo "replicación limitada". Las células sobrevivientes fueron diluidas apropiadamente, sembradas en placa e incubadas a 28°C. Las colonias obtenidas a 28°C fueron repicadas mediante la técnica de "réplica plate" e incubadas a 28 y 37°C para la detección de mutantes incapaces de crecer a la temperatura no permisiva. Posteriormente se estudiaron los mutantes ts aislados respecto a su capacidad para continuar la replicación limitada luego de ser transferidos a la temperatura no permisiva, y los mutantes apropiados fueron sometidos a análisis de reversión. Los cultivos líquidos fueron incubados a la temperatura permisiva y luego transferidos a 37°C, monitoreándose su crecimiento espectrofotométricamente y por siembra en placa de diluciones apropiadas para cuantificar las unidades formadoras de colonia (UFC). Luego de finalizada la

replicación limitada, muestras de 0.1 ml fueron sembradas en placa e incubadas a la temperatura restrictiva para la detección de revertantes.

2.12. Determinación de la actividad de mieloperoxidasa en sobrenadantes de homogenatos de pulmón. Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital y, antes de su muerte, los pulmones fueron perfundidos mediante inyección de solución salina fisiológica en el ventrículo derecho del corazón, a fin de eliminar la sangre residual. Se extrajeron los pulmones y se homogeneizaron en 1 ml de solución fisiológica fría. Luego de centrifugar los homogenatos, se realizó la medición de la actividad de mieloperoxidasa en los sobrenadantes, mediante un método previamente descrito (95).

2.13. Consideraciones estadísticas. Las comparaciones estadísticas de muestras sin distribución normal se llevaron a cabo por medio del contraste de la suma de rangos usando el programa RANKTEST del paquete estadístico EPISTAT (Tracy L. Gustafson, MD, Round Rock, Texas, USA). Para aquellos experimentos en que se obtuvieron datos con distribución normal, varianzas homogéneas, y con más de 30 observaciones por muestra, se utilizó el test t de Student del mismo paquete estadístico. Para la comparación estadística de proporciones, se utilizó el test exacto de Fisher, también del paquete estadístico EPISTAT.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. CURVA DE CRECIMIENTO DE Pseudomonas aeruginosa.

En este estudio se utilizó una cepa de P. aeruginosa inmuno-tipo 1 de Fisher-Devlin-Gnabasik. Esta cepa es productora de pigmentos fluorescentes y fenazínicos, experimenta crecimiento hasta temperaturas de 42°C, da reacción de no fermentador en picos de flauta de medio TSI, hidroliza la gelatina, es oxidasa positiva, arginina dehidrolasa positiva, desarrolla en agar cetrimide y es móvil. De esta cepa bacteriana se realizaron curvas de crecimiento a 28 y 37°C, a fin de establecer el tiempo medio de generación (TGM) a ambas temperaturas. El crecimiento bacteriano se evaluó espectrofotométricamente. A partir de una placa de P. aeruginosa de 24 horas de incubación, se tomó un inóculo con ansa y se sembró en caldo triptycase soya (TSB). Cuando el cultivo alcanzó una D.O. de 0.300 nm, se diluyó al décimo y se determinó la curva de crecimiento. El cultivo fue realizado en incubador con circulación de aire, con agitación rotativa a 300 rpm a ambas temperaturas. A intervalos de 20 minutos se midió la D.O. de los cultivos a 600 nm. Los resultados se muestran en la Figura 1 y 2. El TGM máximo a fue de 30 minutos a 37°C y de 45 minutos a 28°C. La porción lineal de la curva logarítmica de crecimiento se mantuvo, a ambas temperaturas de crecimiento, hasta una D.O. de 0.900.

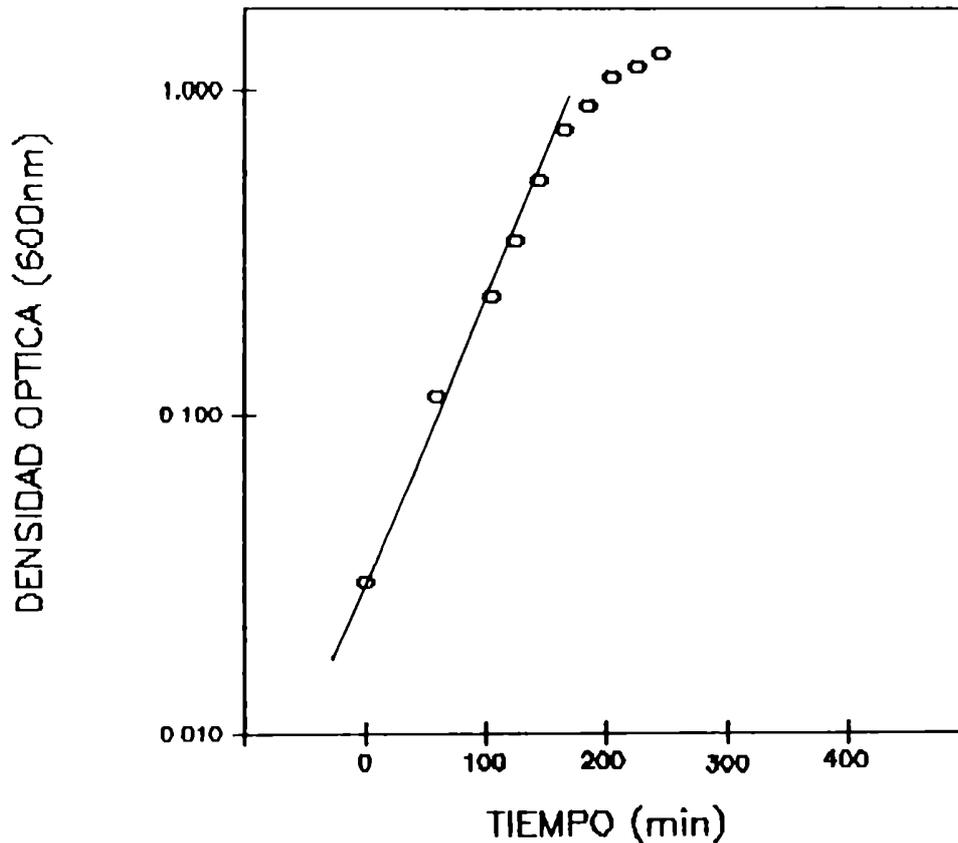


Figura 1. Curva de crecimiento de *P. aeruginosa* a 37°C en medio TSB. El TGM fue de 30 minutos. Cada punto representa la D.O. del cultivo medida a 600 nm.

3.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE MUTANTES TERMOSENSIBLES.

Se realizaron las curvas de crecimiento para los mutantes ts D/1/8 y E/9/9, derivados de la cepa de *P. aeruginosa* inmunotipo 1 de Fisher-Devlin-Gnabasik utilizada. A partir de placas de 24 horas de incubación, cuyos controles de termosensibilidad correspondientes a 37°C indicaron falta de desarrollo bacteriano a la temperatura no permisiva, se sembraron inóculos de cada mutante en TSB. Los cultivos fueron realizados y monitoreados como se indicó anteriormente. A intervalos de 30 minutos se

midió la D.O. de cada cultivo. Las curvas se muestran en las Figuras 2 y 3. El TGM máximo a 28°C para el mutantes ts E/9/9 fue de 60 minutos, y para D/1/8 de 90 minutos. La porción lineal de la curva logarítmica de crecimiento se mantuvo hasta una D.O. de 0.7 para ambos mutantes ts. Ambos mutantes ts experimentaron TGM mayores que los de la cepa salvaje a la misma temperatura de crecimiento.

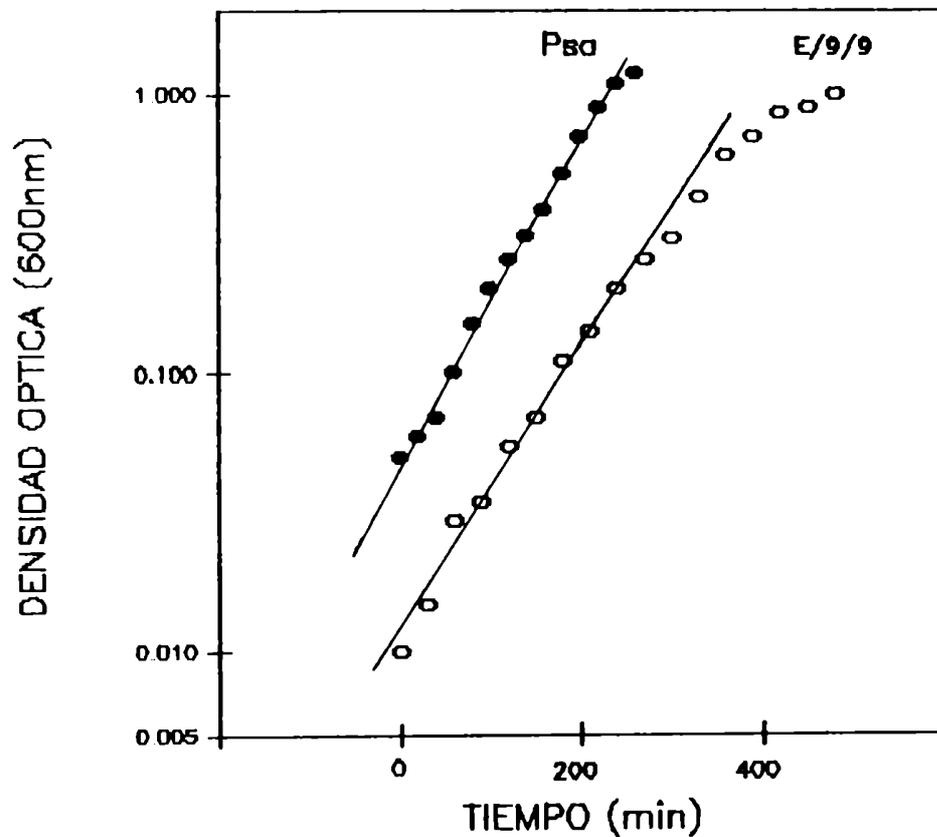


Figura 2. Curva de crecimiento de E/9/9 y *P. aeruginosa* a 28°C en medio TSB. El TGM fue de 60 minutos para E/9/9 y de 45 minutos para *P. aeruginosa*. Cada punto representa la D.O. del cultivo medida a 600 nm.

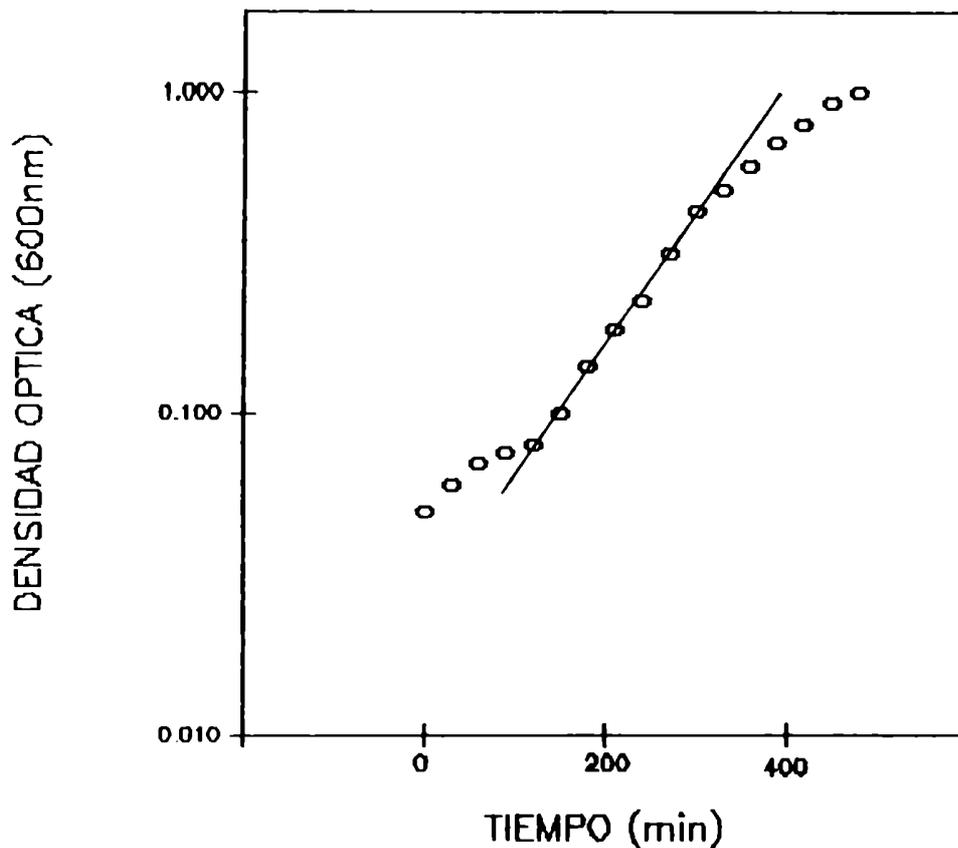


Figura 3. Curva de crecimiento de D/1/8 a 28°C en medio TSB. El TGM fue de 90 minutos. Cada punto representa la D.O. del cultivo medida a 600 nm.

3.3. PORCENTAJE INICIAL DE RECUPERACION DE P. aeruginosa, Y MUTANTES TERMOSENSIBLES DE LA NASOFARINGE MURINA.

Debido a que uno de nuestros objetivos era administrar los mutantes ts de P. aeruginosa a los ratones por vía intranasal (i.n.) (Fotografía 1), se realizaron experimentos previos para determinar el porcentaje de recuperación de la cepa salvaje y de los mutantes ts por esta ruta de inoculación. En la Tabla 1 se presentan los resultados, a manera de resumen, de los porcentajes



Fotografía 1. Administración intranasal de antígenos a ratones Swiss. La punta metálica de la cánula penetra en la narina una distancia de 2 mm.

=====

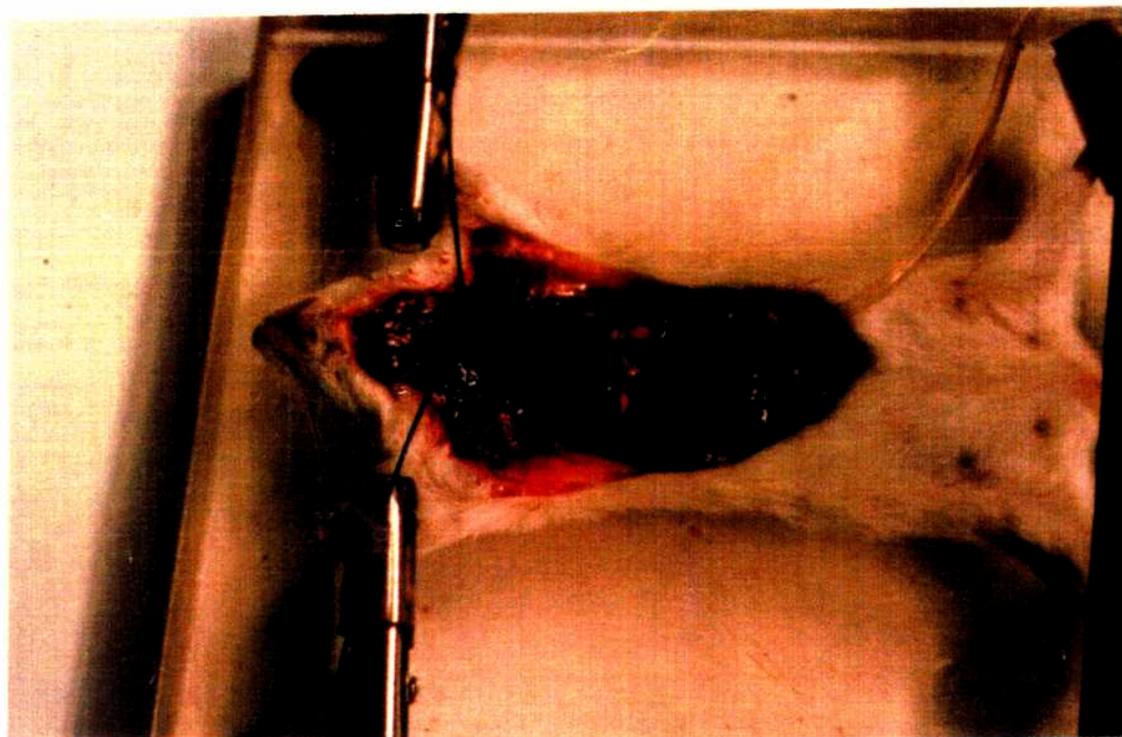
Tabla 1. Porcentaje de recuperación de P. aeruginosa.

BACTERIA	DOSIS (UFC)	RECUPERACION (UFC)	% DE RECUPERACION
Psa 1	1,2 x 10 ⁵	3,0 x 10 ⁴	25
E/9/9	1,3 x 10 ⁷	3,0 x 10 ⁶	23
E/9/9	2,8 x 10 ⁶	7,0 x 10 ⁵	25
E/9/9	1,3 x 10 ⁷	3,4 x 10 ⁶	27
D/1/8	1,3 x 10 ⁷	3,0 x 10 ⁶	23
D/1/8	2,3 x 10 ⁷	4,7 x 10 ⁶	20
D/1/8	3,0 x 10 ⁷	5,2 x 10 ⁶	17

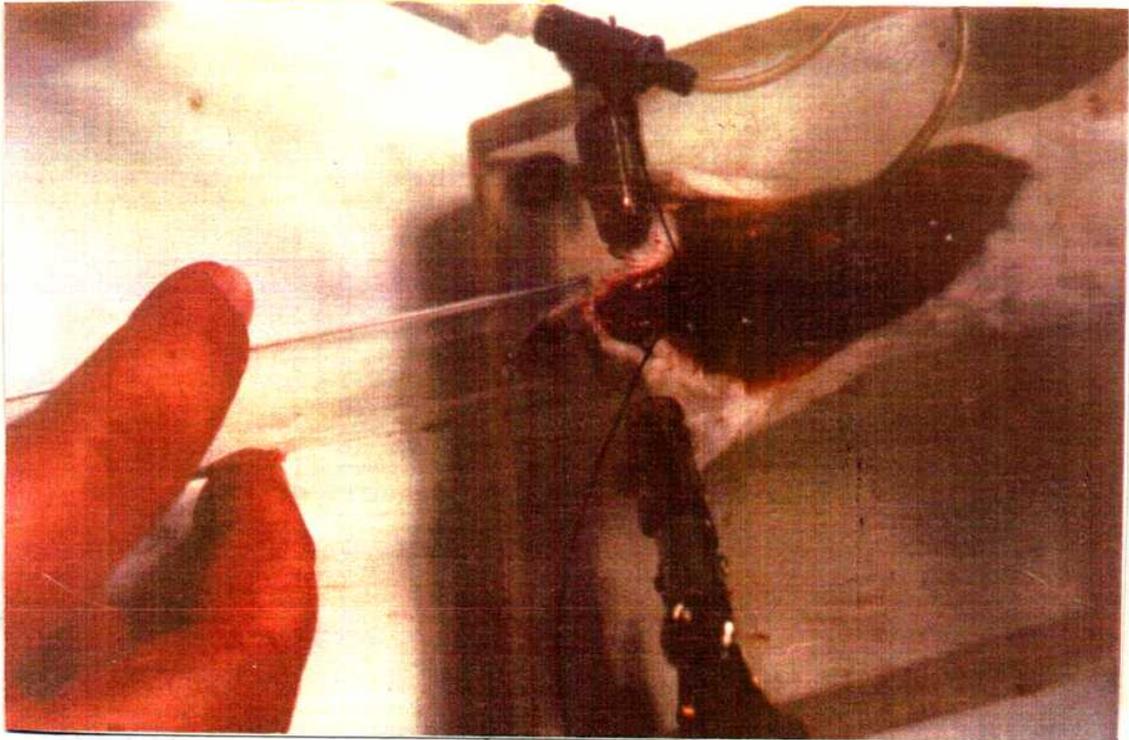
Mediana del porcentaje de recuperación: 23%

=====

de P. aeruginosa y de los mutantes ts que pudieron recuperarse por lavado retronasofaríngeo (Fotografías 2 y 3) en cada uno de los experimentos realizados. Este porcentaje indica la cantidad de unidades formadoras de colonia (UFC) totales recuperadas. Las UFC que no pudieron recuperarse por lavado pueden haber pasado a la vía digestiva inmediatamente después de la inoculación i.n., o bien pueden haber quedado adheridas a los epitelios. La proporción que sigue uno u otro destino no fue confirmada en este estudio, pero existen datos que demuestran que gran parte del inóculo pasa a la vía digestiva (79).



Fotografía 2. Retrocanulación traqueal en ratones.



Fotografía 3. Recuperación de líquido de lavado retronasofaríngeo de ratones.

Los resultados obtenidos muestran que, como mínimo, la cuarta parte del inóculo queda retenida en la vía aérea alta y las cavidades faríngea y bucal.

3.4. PERMANENCIA NASOFARINGEA DE P. aeruginosa.

El propósito de esta serie de experimentos fue determinar el tiempo de permanencia de la cepa salvaje de P. aeruginosa en la cavidad nasofaríngea luego de la inoculación i.n.. Los resultados se presentan en la Tabla 2. Pudo observarse una importante caída del número de UFC recuperadas dentro de las primeras 24 horas,

para luego llegar subsecuentemente a valores que oscilaron en el orden de 10^3 . El número de animales que portaban P. aeruginosa no varió en gran medida durante el transcurso del experimento. Repeticiones del experimento arrojaron resultados que coincidieron con los del primer ensayo. En distintos experimentos, por ejemplo, se aisló P. aeruginosa de un sólo ratón a los 14 días de la inoculación. No se detectó P. aeruginosa a los 21 días de la inoculación. En todos los casos, la presencia de P. aeruginosa fue confirmada por la producción de piocianina y por viraje al fucsia de medio TSI inoculado con las colonias a confirmar.

=====

Tabla 2. Permanencia intranasofaríngea de P. aeruginosa

TIEMPO (días)	NUMERO DE PORTADORES	MEDIANA UFC EN NASOFARINGE	MEDIANA DEL % DE PERMANENCIA
0	5/5	$6,7 \times 10^5$	100
1	5/5	$1,8 \times 10^4$	2,70
2	5/5	$9,6 \times 10^3$	1,43
3	5/5	$3,4 \times 10^3$	0,50
7	3/5	$1,4 \times 10^3$	0,20
14	1/5	$5,0 \times 10^1$	0.01

Inóculo: 1×10^7 UFC/10 ul por ratón.

=====

3.5. PERMANENCIA INTRANASOFARINGEA DE LOS MUTANTES D/1/8 y E/9/9.

El objetivo de esta serie de experimentos fue determinar por cuánto tiempo permanecían los mutantes ts D/1/8 y E/9/9 en la cavidad nasofaríngea murina luego de la administración i.n. Se

realizó un experimento en el cual se inocularon intranasalmente 50 ratones Swiss machos y hembras con los mutantes ts D/1/8 y E/9/9. Todos los animales fueron inoculados el primer día del experimento con una dosis aproximada de 10^7 UFC/10 ul por ratón. Se realizaron siembras cuantitativas de la suspensión de inoculación para determinar en forma exacta el número de UFC que recibieron los animales. Las dosis iniciales fueron de $2,3 \times 10^7$ UFC de D/1/8 por animal y $2,8 \times 10^6$ UFC de E/9/9 por animal. Los ratones fueron divididos en grupos de 5 para cada tiempo y la duración del experimento fué de 7 días. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Para los dos mutantes ts se observó una disminu-

Tabla 3. Permanencia intranasofaríngea de D/1/8 y E/9/9
Período menor a 7 días.

TIEMPO (días)	D/1/8 (MEDIANAS UFC)	E/9/9 (MEDIANAS UFC)	P*
0	$4,35 \times 10^6$ (4/4) (100%)	$6,1 \times 10^5$ (5/5) (100%)	-
1	$4,0 \times 10^3$ (5/5) (0,09%)	$2,4 \times 10^3$ (5/5) (0,39%)	N.S.
2	250 (5/5) (0,0057%)	1050 (5/5) (0,172%)	= 0,0293
3	115 (4/5) (0,0026%)	650 (5/5) (0,106%)	N.S.
7	120 (5/5) (0,0027%)	200 (5/5) (0,032%)	= 0,0079

(*) Nivel de significación de la diferencia de los porcentajes de UFC recuperadas, determinados por el test de suma de rangos.

ción progresiva del número de UFC con el tiempo. El porcentaje inicial de recuperación fue del 25% para E/9/9 y 20% para D/1/8. La permanencia nasofaríngea del mutante de replicación limitada (E/9/9) fue superior a la del mutante no replicante (D/1/8) solamente a los días 2 y 7. Sin embargo, aunque estadísticamente significativas, estas diferencias podrían carecer de significado biológico. La presencia de los mutantes en las suspensiones de lavado nasofaríngeo fue confirmada por cultivo en medio diferencial PIA, por viraje del indicador en medio TSI, por la producción de piocianina y por cultivo diferencial de placas replicadas a 28 y 37°C.

Como los recuentos de UFC en el día 7 resultaron distintos de 0, se repitió el experimento en las mismas condiciones pero extendiéndose el período de rastreo de los mutantes ts a tiempo hasta los 21 días. Se inoculó por la vía i.n. un nuevo lote de animales. Los ratones recibieron 3×10^7 UFC/animal de D/1/8 y $1,3 \times 10^7$ UFC/animal de E/9/9. Los resultados de este experimento y la comparación de los tiempos de permanencia de ambos mutantes con el de la cepa salvaje parental, se muestran en la Figura 4.

En este caso, los recuentos al día 14 resultaron igual a 0, por lo cual no se extendió el experimento más allá de ese día. También en este caso, pudo observarse una disminución progresiva de las UFC en el tiempo, y una mayor permanencia del mutante de replicación limitada. De ambos experimentos pudo inferirse que

CAVIDAD NASOFARINGEA

PERMANENCIA BACTERIANA

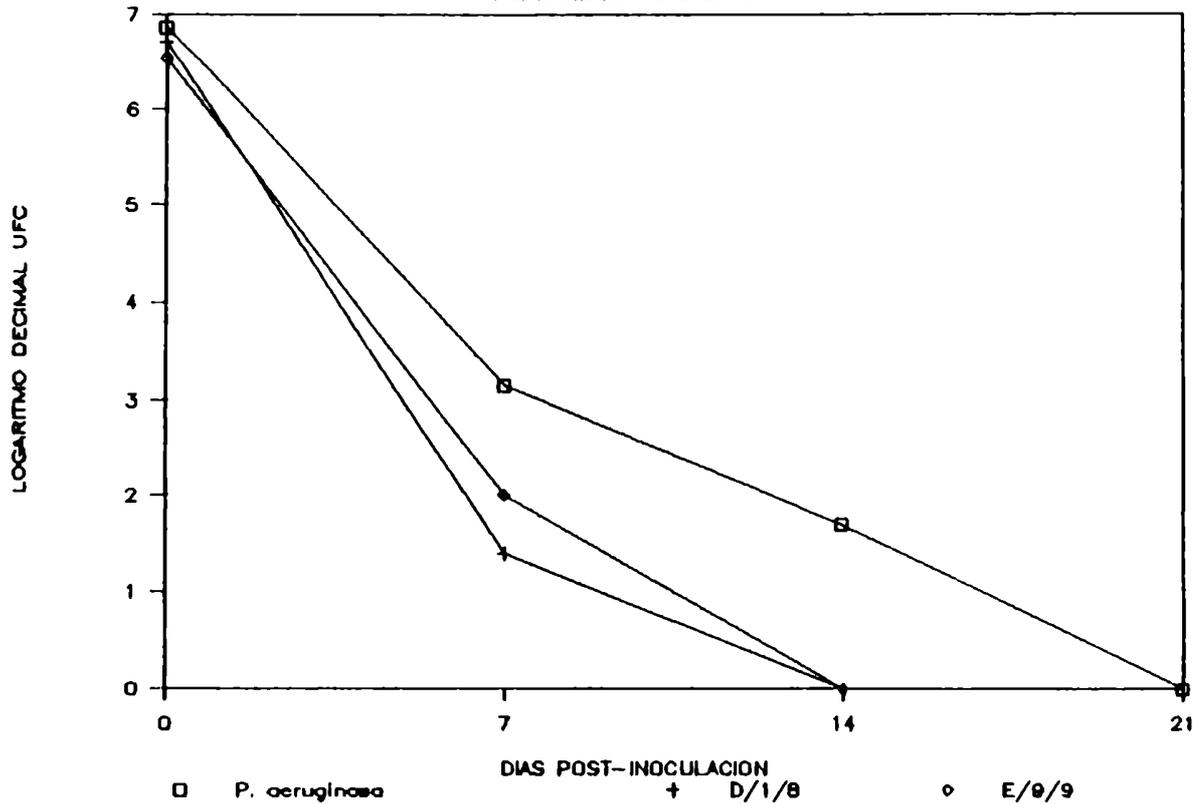


Figura 4. Permanencia de *P. aeruginosa*, y de los mutantes ts D/1/8 y E/9/9 en la cavidad nasofaríngea de ratones Swiss. Cada punto representa la mediana del número de UFC recolectadas de hasta 5 ratones.

el tiempo de permanencia intranasofaríngea de los mutantes ts no excedía los 7 días, y que no existieron diferencias significativas entre ambos.

3.6. DETERMINACION DE DOSIS LETAL 50 DE *P. aeruginosa* EN RATONES NORMALES.

Con el propósito de determinar la dosis letal 50 (DL₅₀) de

P. aeruginosa en ratones de la cepa Swiss por vía intraperitoneal (i.p.), se realizó un experimento con animales machos y hembras. Los ratones fueron divididos en tres grupos, y las dosis administradas fueron: 1×10^9 , 1×10^8 y 1×10^7 UFC/animal. En la tabla 4 se muestran los resultados de mortalidad obtenidos durante los 14 días posteriores a la inoculación bacteriana.

Tabla 4. Dosis letal 50 en ratones normales.

DOSIS	Nº MUERTOS/Nº INOCULADOS	% MORTALIDAD
1×10^9	7/8	91
1×10^8	3/8	33
1×10^7	0/8	0

Aplicando la fórmula:

$$M = h \times \frac{a - 50\%}{a - b}$$

donde :

a = % animales afectados en dilución mayor al 50%

b = % animales afectados en dilución menor al 50%

y considerando lo expuesto en la tabla 4, la DL_{50} de P. aeruginosa en ratones de la cepa Swiss por vía i.p. resultó de 2×10^8 UFC/ratón.

3.7. PERMANENCIA ESPLÉNICA DE D/1/8 Y E/9/9 EN RATONES NORMALES.

Con el propósito de determinar la permanencia en bazo de los mutantes ts, se realizó un experimento donde un lote de 36 ratones Swiss fue inyectado por vía i.p. con los mutantes D/1/8 y E/9/9, utilizándose 18 animales para cada mutante. Las dosis inyectadas fueron de 6×10^7 UFC/animal para E/9/9 y $5,5 \times 10^7$ UFC/animal para D/1/8. Los resultados del experimento se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Permanencia esplénica de D/1/8 y E/9/9 en ratones normales. Período menor a 14 días

TIEMPO (horas)	E/9/9 (MEDIANA UFC)	D/1/8 (MEDIANA UFC)	P*
INOCULADO	$6,0 \times 10^7$ (100%)	$5,5 \times 10^7$ (100%)	
5	6400 (5/5) (0,0106%)	500 (5/5) (0,00091%)	N.S.
48	82 (6/6) (0,00014%)	50 (2/6) (0,00009%)	N.S.

(*) Nivel de significación de la diferencia de los porcentajes de UFC recuperadas, determinado por el test de la suma de rangos.

Pudo observarse una aguda disminución del número de UFC de ambos mutantes en las primeras 48 horas. Los recuentos de UFC a los 7 días resultaron 0. Los porcentajes de recuperación inicial

fueron de 0,009% para E/9/9 y de 0,002% para D/1/8. Estos resultados demuestran que los mutantes ts son depurados dentro de las primeras horas luego del desafío i.p., sin que se detectara la presencia de organismos revertantes, a pesar de haber sido inoculados $5-6 \times 10^7$ UFC. No se hallaron diferencias significativas en el contenido esplénico de ambos mutantes entre sí.

3.8. DETERMINACION DE DOSIS LETAL 50 PARA P. aeruginosa EN ANIMALES GRANULOCITOPENICOS.

Se realizó un experimento similar al descrito en el punto 3.6. pero en este caso, el lote de animales utilizado fue previamente tratado con ciclofosfamida en una dosis de 200 mg/kg por vía i.p. con el objeto de inducir granulocitopenia en los ratones. La curva de decaimiento del número de PMN luego del tratamiento con la droga se muestra en la Figura 5. Los ratones fueron inyectados 120 y 24 horas antes del desafío y la droga fue administrada nuevamente a las 96 horas luego del mismo.

En este caso, las dosis bacterianas inoculadas fueron 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 y 1×10^2 UFC/animal. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Aplicando la fórmula descrita en el punto 3.6., la DL₅₀ i.p. de P. aeruginosa en ratones granulocitopénicos, resultó ser 2.2×10^4 UFC/ratón. Como conclusión pudo observarse un decaimiento de la DL₅₀ de cuatro órdenes de potencia de diez respecto a los animales normales.

INDUCCION DE GRANULOCITOPENIA

TRATAMIENTO CON CICLOFOSFAMIDA

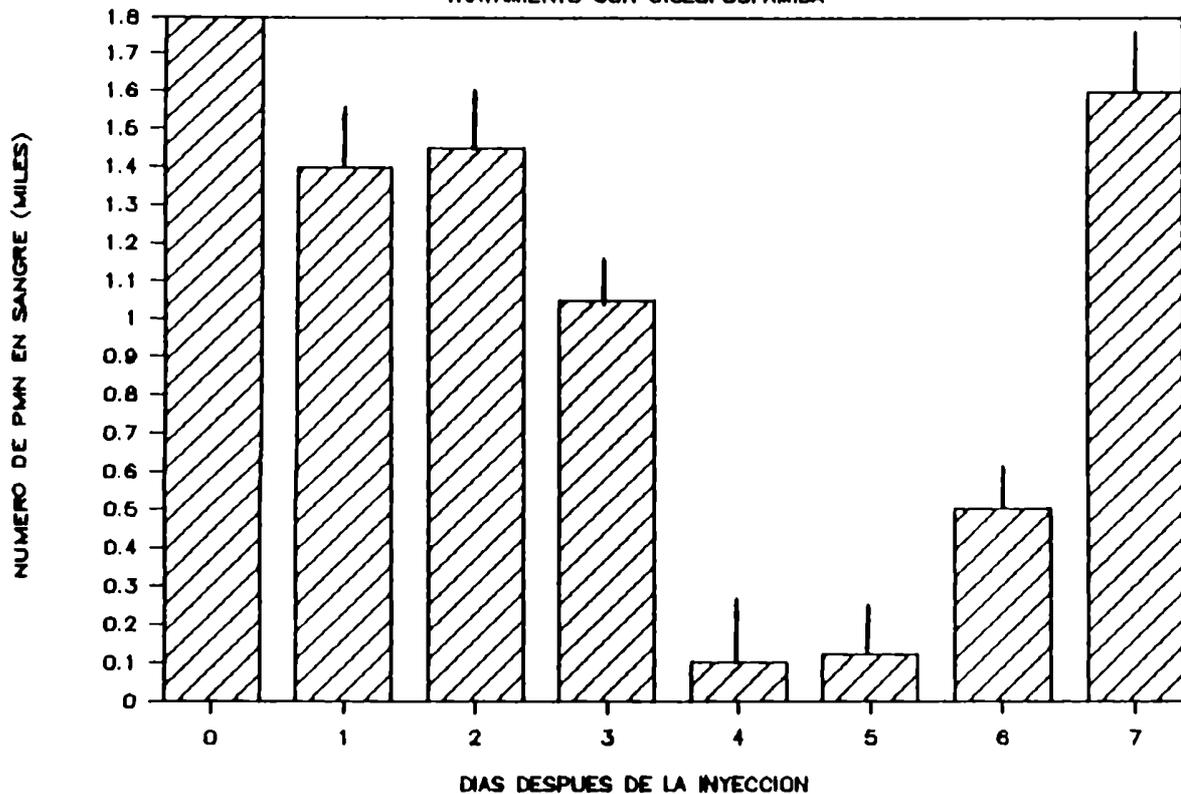


Figura 5. Inducción de granulocitopenia por tratamiento con ciclofosfamida. Cada barra representa la media aritmética \pm ES del número de PMN sanguíneos circulantes. Las disminuciones observadas a los días 4 y 5 post-inyección son significativas ($p < 0.01$).

3.9. PERMANENCIA ESPLÉNICA DE D/1/8 Y E/9/9 EN RATONES GRANULOCITOPENICOS.

Este experimento fue realizado en forma similar al descrito en 3.7., pero este lote de animales fue previamente tratado con ciclofosfamida en las mismas condiciones descritas en el punto 3.8. En este caso, las dosis i.p. bacterianas inyectadas fueron

Tabla 6. Dosis letal 50 en ratones granulocitopénicos.

DOSIS	Nº MUERTOS/Nº INOCULADOS	% MORTALIDAD
1×10^6	7/8	87.5
1×10^5	6/8	75
1×10^4	1/8	12.5
1×10^3	0/8	0
1×10^2	0/8	0

Tabla 7. Permanencia esplénica de D/1/8 y E/9/9 en ratones granulocitopénicos. Período menor a 14 días

TIEMPO	E/9/9 (MEDIANA UFC)	D/1/8 (MEDIANA UFC)	P*
INOCULADO	$5,5 \times 10^7$ (100%)	$6,5 \times 10^7$ (100%)	
4 horas	$8,4 \times 10^3$ (6/6) (0,077%)	$6,8 \times 10^2$ (6/6) (0,005%)	= 0.0043
48 horas	15 (5/6) (0,00014%)	38 (6/6) (0,00029%)	N.S.
7 días	100 (1/5) (0,00018%)	< 25 (< 0,00004%)	-

(*) Nivel de significación de la diferencia de los porcentajes de UFC recuperadas, determinado por el método de la suma de rangos.

de $5,5 \times 10^7$ por animal, para aquellos que recibieron el mutante ts E/9/9 y $6,5 \times 10^7$ por animal para los que recibieron el mutante ts D/1/8. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

Ambos mutantes ts fueron depurados principalmente en las primeras 48 horas, y se halló únicamente un 0,28% de E/9/9 a la semana en un solo animal de un grupo de 5. Los porcentajes de recuperación iniciales fueron de 0,07% para E/9/9 y 0,007% para D/1/8. De estos resultados pudo inferirse que aún en animales granulocitopénicos, la permanencia esplénica de los mutantes ts de P. aeruginosa es de corta duración. La posible generación de microorganismos revertantes por parte de las cepas D/1/8 y E/9/9 no afectó a los animales, ya que la supervivencia de los mismos fue del 100% en ambos grupos.

3.10. PERMANENCIA DE P. aeruginosa Y MUTANTES TS EN HECES DE RATONES NORMALES LUEGO DE INMUNIZACION INTRANASAL.

Como se describió en el punto 3.3., la recuperación de P. aeruginosa y de los mutantes ts obtenida por lavado retro-nasofaríngeo, luego de inmunización i.n., fue de 23%. Una de las hipótesis postuladas respecto al hecho que esta recuperación no fue del 100% fue que las UFC que no pudieron recuperarse por lavado podrían haber pasado a la vía digestiva inmediatamente después de la inoculación i.n. Para corroborar esta hipótesis, se realizaron experimentos de permanencia de la cepa salvaje y los mutantes

ts en heces de ratones Swiss, luego de inoculación i.n. Previamente a la inoculación bacteriana, se comprobó que ninguno de los animales de este experimento portaban P. aeruginosa en materia fecal. Así, se inocularon 75 ratones Swiss machos y hembras con P. aeruginosa, D/1/8 o E/9/9. Todos los animales fueron inoculados por vía i.n., el primer día del experimento con una dosis en el orden de 10^7 UFC/10 ul. Los ratones fueron divididos en grupos de 5 para cada tiempo y la duración del experimento fue de 14 días. La materia fecal de cada animal fue recogida en tubo y dispersada con varilla de vidrio en solución fisiológica. La suspensión así obtenida de cada ratón fue sembrada en TSA y en medio diferencial PIA. Con las colonias obtenidas se realizaron los controles de termosensibilidad correspondientes para los dos mutantes ts. En todos los casos se confirmó la presencia de P.

=====
 Tabla 8. Permanencia de D/1/8, E/9/9 y P. aeruginosa en heces de ratones normales. Período menor a 14 días.

TIEMPO (días)	CRECIMIENTO EN PIA (+ ó -)		
	D/1/8	E/9/9	Psa
	(Nº de portadores/ Nº total)		
1	+ (4/5)	+ (4/5)	+ (5/5)
2	+ (1/5)	+ (4/5)	+ (3/5)
3	+ (1/5)	+ (1/5)	+ (3/5)
7	- (0/5)	- (0/5)	+ (1/5)

Inóculo: 1×10^7 UFC/10 ul por ratón.

aeruginosa por la producción de piocianina en medio PIA y por reacción no fermentadora en picos de flauta de medio TSI. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tanto para los mutantes ts como para la cepa salvaje se observó una disminución progresiva con el tiempo de la permanencia bacteriana en heces, como demostró la disminución del número de ratones portadores con el tiempo. El número de animales que portaban al mutante de replicación limitada (E/9/9) apareció superior a la del mutante no replicante (D/1/8) solamente el día 2. La permanencia en heces de la cepa salvaje resultó superior a la de los mutantes ts (7 días versus 3 días). Ya que los ratones de este lote experimental no eran portadores de P. aeruginosa, concluimos que, ciertamente, parte del inóculo administrado por ruta i.n. pasó a vía digestiva durante la inmunización de los ratones.

3.11. PERMANENCIA DE P. aeruginosa Y MUTANTES TS EN HECES DE RATONES GRANULOCITOPENICOS LUEGO DE INOCULACION INTRANASAL.

Este experimento fue realizado en forma similar al descrito en el punto 3.10., pero en este caso los animales recibieron tratamiento con ciclofosfamida. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

En el caso de ratones granulocitopénicos, la permanencia en heces del mutante ts E/9/9 fue menor de 7 días, mientras que la

Tabla 9. Permanencia de D/1/8, E/9/9 y P. aeruginosa en heces de ratones granulocitopénicos, luego de la administración i.n. Período menor a 21 días.

TIEMPO (días)	CRECIMIENTO EN PIA (+ ó -)		
	D/1/8	E/9/9	Psa
	(N° de portadores/ N° total)		
1	+ (6/6)	+ (5/6)	+ (6/6)
2	+ (4/6)	+ (6/6)	+ (4/5) (*)
3	+ (1/6)	+ (4/6)	+ (4/5)
4	- (0/6)	+ (3/6)	+ (4/5)
7	- (0/6)	- (0/6)	+ (4/5)
14	- (0/6)	- (0/6)	+ (3/3) (**)

Inóculo: 1×10^7 UFC/10 ul por ratón.

(*) 1 animal muerto.

(**) 2 animales muertos.

del mutante D/1/8 resultó menor de cuatro días. La cepa salvaje permaneció en heces de animales granulocitopénicos durante un período menor a los 21 días.

De los experimentos descritos en los puntos 3.10. y 3.11. se concluye que la permanencia de de la cepa salvaje de P. aeruginosa en heces de ratones granulocitopénicos es marcadamente más prolongada que en ratones normales. El mutante ts de replicación limitada (E/9/9) tuvo una permanencia superior en heces de ratones granulocitopénicos, mientras que no existieron diferencias significativas para D/1/8.

3.12. EFECTO DEL NUMERO DE INOCULACIONES SOBRE LA PROTECCION INDUCIDA POR INMUNIZACION INTRANASAL CON EL MUTANTE TS E/9/9.

Se realizó un experimento para determinar el número de inoculaciones i.n. con los mutantes ts de P. aeruginosa que conferirían la mayor protección contra el desafío con la cepa salvaje. Para esto, se utilizó al mutante E/9/9 como inmunógeno. Grupos de ratones Swiss fueron inmunizados localmente (por ruta i.n.) con E/9/9. Un grupo de animales recibió un único inóculo el día 1 del experimento. Un segundo grupo de ratones recibió dos inóculos, un inóculo el día 1 y otro el día 7. Un tercer grupo de animales recibió tres inoculaciones bacterianas los días 1, 7 y 14 del experimento. En todos los casos, las dosis bacterianas inoculadas fueron de 1×10^7 UFC/animal. Un cuarto grupo de animales no fue inmunizado con el mutante E/9/9 (grupo control). El día 17 del experimento, se indujo granulocitopenia en los animales mediante una dosis de ciclofosfamida de 200 mg/Kg de peso. Los ratones recibieron 2 dosis más de esta droga espaciadas por 96 horas. El día 21 todos los animales, inmunizados y controles, fueron desafiados con la cepa salvaje de P. aeruginosa mediante un aerosol que contenía 6×10^7 UFC/ml. La dosis intrapulmonar que recibieron los ratones fue de 1.8×10^4 UFC. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.

Estos resultados permiten concluir que la mayor protección conferida por inmunización i.n. con mutantes ts de P. aeruginosa

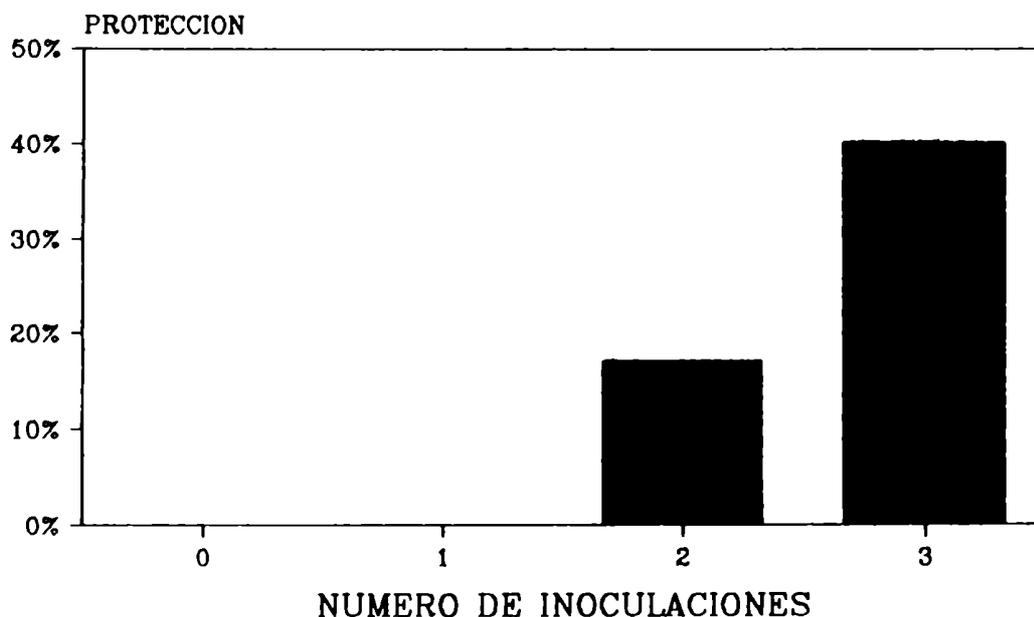


Figura 6. Efecto del número de inoculaciones sobre la protección inducida por inmunización i.n. con E/9/9. Cada barra representa el porcentaje de ratones sobrevivientes de grupos de 6 animales.

en las condiciones que utilizadas en este trabajo, se obtiene mediante la administración de tres inoculaciones bacterianas espaciadas entre sí por siete días.

3.13. PROTECCION INDUCIDA POR INMUNIZACION INTRANASAL CON D/1/8 Y E/9/9.

Esta serie de experimentos fue realizada con el objeto de determinar si la inmunización i.n. con mutantes ts de P. aeruginosa confería protección contra el desafío por aerosol con la cepa salvaje. Para estos experimentos se siguió un plan de inmuni-

zación que se elaboró en base a los resultados obtenidos en los experimentos de permanencia de los mutantes ts y en los experimentos descritos en el punto 3.12. Se realizaron desafíos con la cepa salvaje de *P. aeruginosa*, por medio de aerosoles. En un primer experimento, los animales recibieron una dosis intrapulmonar de $1,3 \times 10^5$ UFC, que resultó ser excesiva. Todos los animales, inmunizados y no inmunizados, murieron en el término de las primeras 48 horas. En un experimento subsiguiente se desafió a los animales con una dosis intrapulmonar de $2,1 \times 10^4$ UFC. Los resultados de este segundo desafío se muestran en la Tabla 10.

=====
 Tabla 10. Protección inducida por inmunización intranasal con D/1/8 y E/9/9.

DOSIS* (UFC)	MORTALIDAD (% PROTECCION)	
	D/1/8	E/9/9
1×10^4	8/8 (0%)	0/8 (100%)
1×10^6	8/8 (0%)	0/8 (100%)
1×10^8	1/8 (88%)	6/8 (25%)

(*) Todos los animales del grupo control (no inmunizados) murieron dentro de las primeras 48 horas.

=====
 Se controló la mortalidad durante los 10 días subsiguientes al desafío. A la observación macroscópica, los pulmones de estos animales mostraban lesiones hemorrágicas confluyentes que abarcaban gran parte de la superficie del órgano.

Los resultados obtenidos mostraron que el mutante ts E/9/9 confirió mayor protección que el mutante D/1/8. Respecto al mutante ts de replicación limitada, pudo observarse que la protección de los ratones ocurrió aún a las dosis de inmunización más bajas (10^4 y 10^6). La dosis de inmunización más alta (10^8) de E/9/9 no protegió a los animales, como podría haberse esperado. Estos resultados, como se discutirá más adelante, corroboran los hallazgos previos de otros laboratorios.

3.14. PROTECCION INDUCIDA POR INMUNIZACION INTRANASAL O INMUNIZACION INTRAPERITONEAL.

Esta serie de experimentos fue realizada siguiendo los mismos planes de inmunización local descritos en el punto 3.13 y un plan de inmunización sistémica que consistió en una única inoculación i.p. el primer día del experimento. Grupos de ratones de la cepa Swiss fueron inmunizados por ruta i.n. o i.p. con los mutantes ts o con la cepa salvaje de P. aeruginosa muerta por formalización. Veintiún días después de la primera inoculación bacteriana, los ratones fueron desafiados por aerosolización con la cepa salvaje de P. aeruginosa. Los animales recibieron una dosis intrapulmonar de 2×10^4 UFC. Los resultados de este desafío se muestran en la Tabla 11.

Posteriormente al desafío, se realizó el control de mortalidad durante los 10 días subsiguientes. La mayor parte de los

Tabla 11. Inmunización intranasal vs. intraperitoneal

RUTA DE INMUNIZACION (*) , (**)	MORTALIDAD (% PROTECCION)		
	D/1/8	E/9/9	PsaF
INTRANASAL	2/8 (75)	2/8 (75)	8/8 (0)
INTRAPERITONEAL	6/8 (25)	7/8 (12.5) (***)	8/8 (0)

(*) Todos los animales del grupo control (no inmunizados) murieron dentro de las primeras 48 horas.

(**) Las dosis de inmunización fueron de 1×10^7 UFC/animal para cada inmunógeno.

(***) Diferencia significativa respecto de la inmunización i.n. con $p < 0.05$ (test de Fisher)

=====
animales que no resultaron protegidos por la inmunización, murieron dentro de las primeras 48 horas.

Los resultados obtenidos mostraron que los mutantes ts, por ambas rutas de inmunización, confirieron una protección significativamente superior a la otorgada por la cepa salvaje formolizada. Asimismo, pudo observarse que el mutante ts E/9/9 confirió una mayor protección por ruta i.n. que por ruta i.p. ($P < 0.05$, test de Fisher).

3.15. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPO EN LIQUIDO DE LAVADO PULMONAR LUEGO DE INMUNIZACION INTRANASAL CON MUTANTES TS DE P. aeruginosa.

Se realizaron experimentos para determinar los niveles de anticuerpos específicos anti-P. aeruginosa producidos en respuesta a la inmunización con mutantes ts de este microorganismo. Se realizó un experimento en el cual grupos de ratones Swiss fueron inmunizados por ruta i.n. con E/9/9 o con D/1/8 según el plan de inmunización determinado en 3.12. Veintiún días después de la primera inoculación bacteriana, se realizaron lavados pulmonares en los ratones inmunizados y en los controles (no inmunizados). Los líquidos de lavado obtenidos fueron concentrados mediante centrifugación a 3000 rpm, durante 12 horas, en microconcentradores. Por este método, se logró una concentración 15x. Sobre los concentrados obtenidos se realizó la determinación de los niveles de IgG e IgA específicos anti-P. aeruginosa mediante el método de ELISA. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7.

No se detectaron anticuerpos IgG específicos anti-P.aeruginosa en los concentrados de los líquidos de lavado de ratones control, pero la inmunización i.n. con ambos mutantes ts indujo altos niveles IgG. También se detectaron niveles medibles de IgA anti-P.aeruginosa en los líquidos de lavado pulmonar de animales inmunizados con los dos mutantes ts. Asimismo, el mutante ts

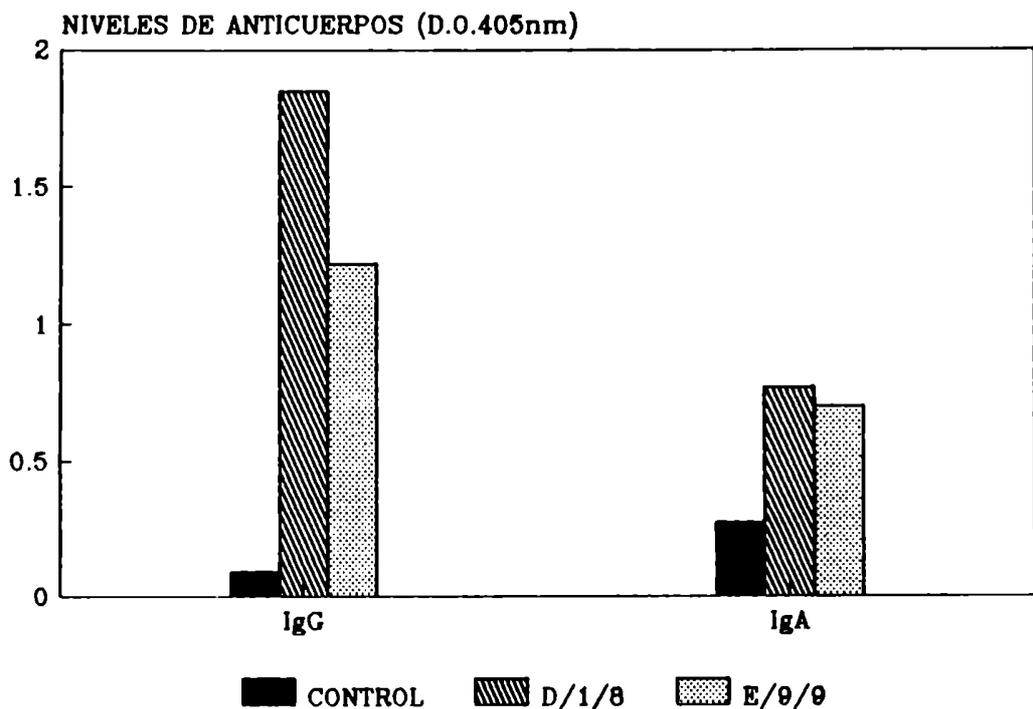


Figura 7. Determinación de los niveles de anticuerpo en líquido de lavado pulmonar luego de inmunización i.n. con mutantes ts de P. aeruginosa. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre concentrados 15x de líquidos de lavado pulmonar obtenidos de 8 ratones de un experimento representativo.

D/1/8 indujo niveles de IgG superiores a los inducidos por el mutante ts E/9/9.

3.16. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS EN LIQUIDO DE LAVADO PULMONAR LUEGO DE INMUNIZACION INTRAPERITONEAL CON MUTANTES TS DE P. aeruginosa.

Este experimento fue realizado para determinar los niveles de IgG e IgA específicos anti-P. aeruginosa presentes en líquido

de lavado pulmonar de ratones inmunizados por ruta i.p.. Grupos de animales fueron inmunizados con una única dosis i.p. de E/9/9 o D/1/8 el primer día del experimento. La dosis inmunizante fue de 1×10^7 UFC/ratón para cada mutante ts. Veintiún días después de la inoculación bacteriana, se realizaron lavados pulmonares en los ratones inmunizados y en los controles. Se realizó la concentración de los líquidos de lavado obtenidos, a 3000 rpm, durante 12 horas. Sobre los concentrados obtenidos (15x) se realizó la determinación de los niveles de IgG e IgA específicos anti-P. aeruginosa mediante el método de ELISA. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8.

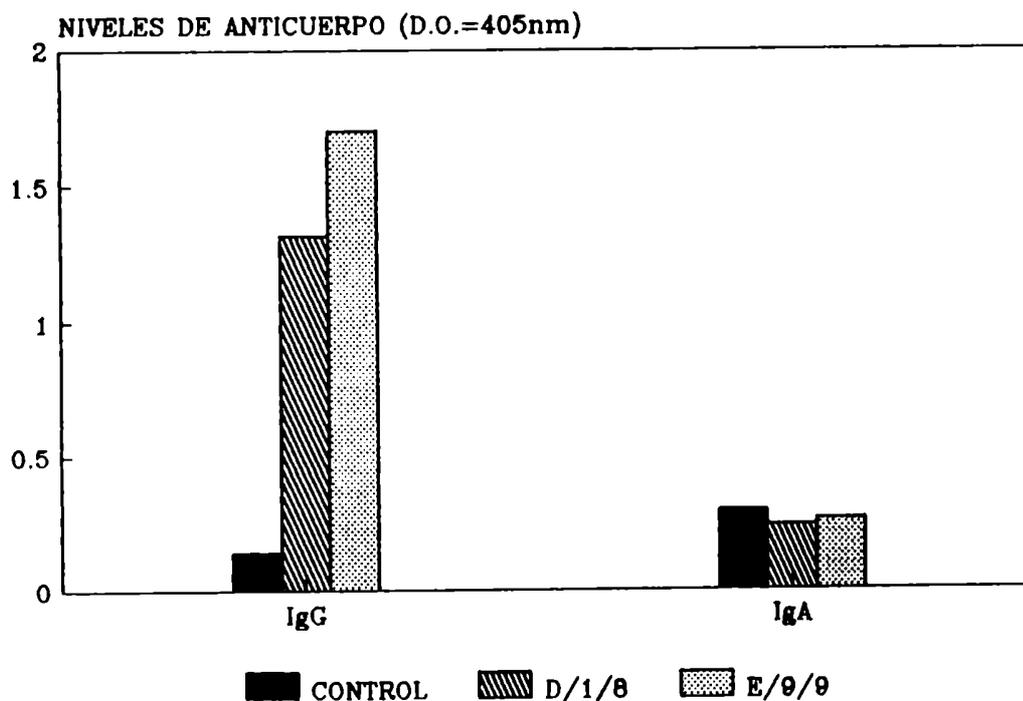


Figura 8. Determinación de los niveles de anticuerpo en líquido de lavado pulmonar luego de inmunización i.p. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre concentrados 15x de líquidos de lavado pulmonar obtenidos de 8 ratones de un experimento representativo.

Se detectaron niveles medibles de IgG específica anti-P. aeruginosa en los concentrados de los líquidos de lavado de los animales inmunizados con ambos mutantes ts por vía sistémica, pero no se detectó IgA anti-P. aeruginosa en los líquidos de lavado pulmonar de estos ratones. Estos resultados muestran una importante diferencia en el patrón de anticuerpos producidos luego de inmunización sistémica respecto al producido luego de inmunización local con los mutantes ts de P. aeruginosa.

3.17. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS EN LIQUIDO DE LAVADO PULMONAR LUEGO DE INMUNIZACION INTRANASAL CON E/9/9 Y CON P. aeruginosa MUERTA POR CALOR.

Se realizó un experimento en el cual grupos de ratones Swiss fueron inmunizados por ruta i.n. con E/9/9 o con la cepa salvaje de P. aeruginosa muerta por calor. De forma similar al experimento descrito en el punto 3.15., veintiún días después de la primera inoculación bacteriana, se realizaron lavados pulmonares en los ratones inmunizados y en los controles. Se realizó la concentración de los líquidos de lavado obtenidos, a 3000 rpm, durante 12 horas. Sobre los concentrados obtenidos (15x) se realizó la determinación de los niveles de IgG e IgA específicos anti-P. aeruginosa por ELISA. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

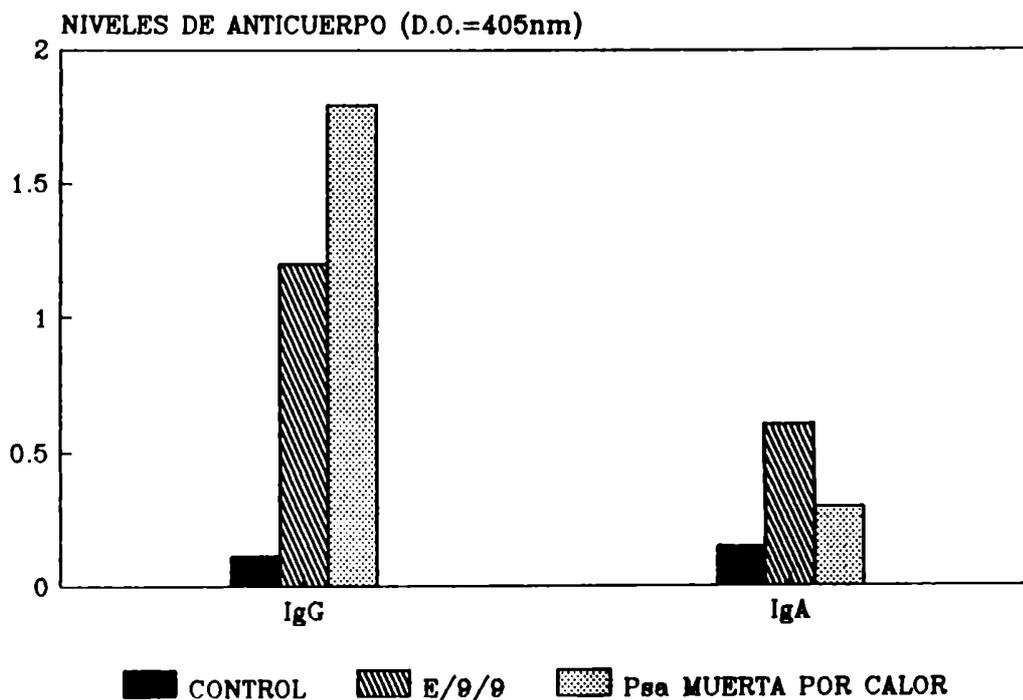


Figura 9. Determinación de los niveles de anticuerpo en líquido de lavado pulmonar luego de inmunización i.n. con E/9/9 o con P. aeruginosa muerta por calor. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre concentrados 15x de líquidos de lavado pulmonar obtenidos de 8 ratones de un experimento representativo.

Tanto el mutante E/9/9 como la cepa salvaje muerta por calor, indujeron altos niveles de anticuerpos IgG específicos anti-P. aeruginosa como pudo medirse en los concentrados de los líquidos de lavado pulmonar de ratones inmunizados localmente. El mutante ts E/9/9 indujo niveles de IgA medibles respecto al control, mientras que la cepa salvaje muerta por calor produjo niveles débilmente detectables.

3.18. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPO EN PLASMA.

Esta serie de experimentos fue realizada con el fin de determinar los niveles séricos de anticuerpos inducidos por inmunización con los mutantes ts de P. aeruginosa o con la cepa salvaje muerta por calor. Se inmunizaron grupos de ratones de la cepa Swiss con D/1/8 o E/9/9 por ruta i.n. (tres inoculaciones bacterianas espaciadas entre sí por siete días) o i.p. (una única inoculación el primer día del experimento). Veintiún días después de la primera inoculación bacteriana, se extrajo suero de los animales inmunizados y no inmunizados (controles) y se determinaron los niveles de anticuerpos IgG e IgM anti-P. aeruginosa en plasma por ELISA. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 10.

Ambos mutantes ts indujeron niveles mayores de IgG anti-P. aeruginosa en ratones inmunizados por vía i.p. comparados con los medidos en plasma de animales inmunizados por ruta i.n. No se hallaron diferencias en los niveles de anticuerpos medidos entre E/9/9 y D/1/8. No se detectaron niveles medibles de IgM anti-P. aeruginosa en plasma de los animales inmunizados por ruta i.n. o i.p.

En experimentos separados, grupos de ratones Swiss fueron inmunizados con D/1/8, E/9/9 o la cepa salvaje de P. aeruginosa muerta por calor, por ruta i.n. (tres veces), mediante una única

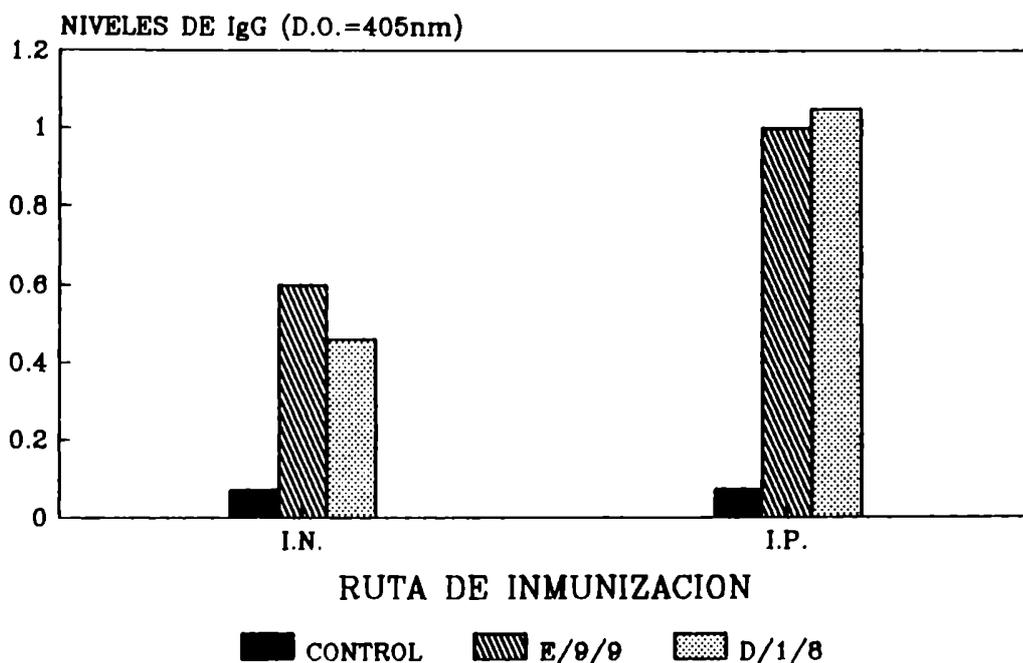


Figura 10. Determinación de los niveles séricos de anticuerpo luego de inmunización i.n. o i.p. con los mutantes ts de *P. aeruginosa*. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre plasma obtenido a partir de 8 ratones de un experimento representativo.

inyección i.p. o mediante una inyección i.p. seguida por dos inoculaciones con la misma dosis de los mutantes ts o la cepa salvaje muerta por calor, los días 7 y 14. A los 21 días se determinaron los niveles de IgG e IgM anti-*P. aeruginosa* en plasma. Los resultados se muestran en las Figuras 11 y 12.

Nuevamente, pudo observarse que: a) los niveles séricos de IgG resultaron más elevados en animales inmunizados intraperitonealmente que en animales inmunizados por ruta i.n.; b) no se hallaron diferencias entre los dos mutantes ts respecto a los niveles de anticuerpos inducidos.

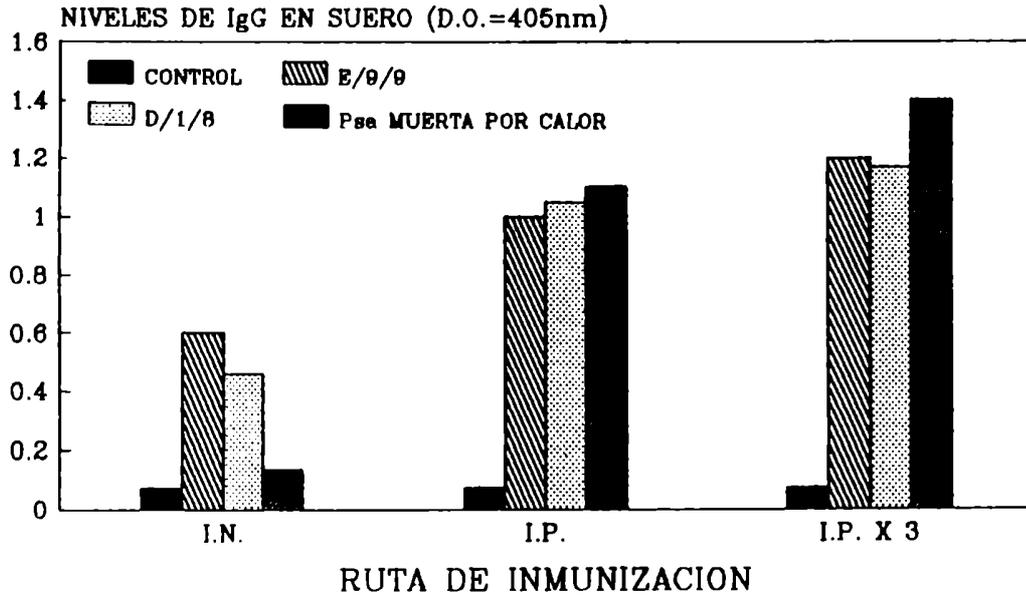


Figura 11. Determinación de los niveles séricos de IgG luego de inmunización local o sistémica con los mutantes ts o con P. aeruginosa muerta por calor. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre plasma obtenido a partir de 8 ratones de un experimento representativo.

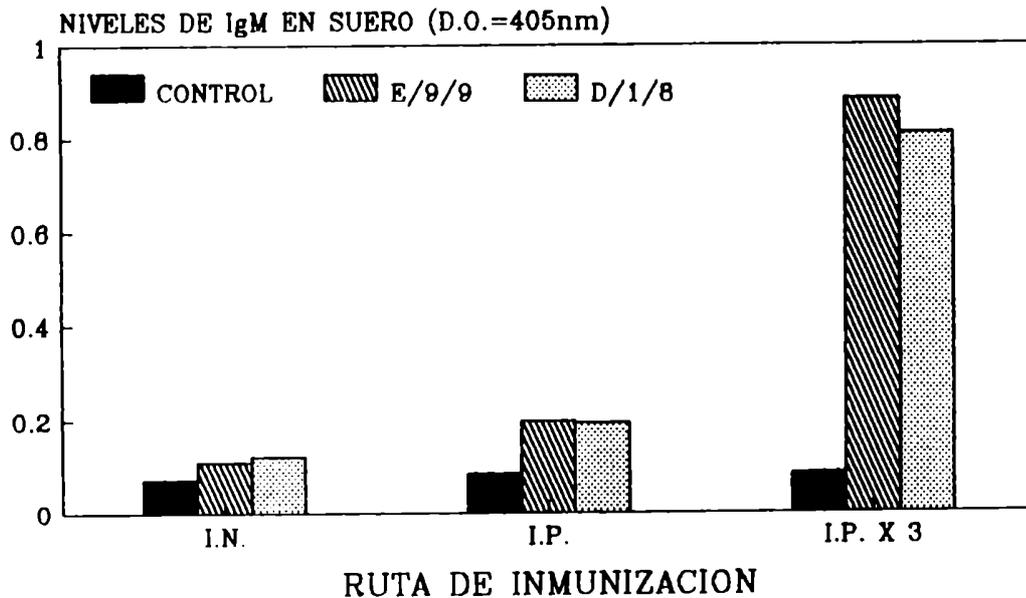


Figura 12. Determinación de los niveles séricos de IgM luego de inmunización local o sistémica con los mutantes ts o con P. aeruginosa muerta por calor. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre plasma obtenido a partir de 8 ratones de un experimento representativo.

Además, no se hallaron diferencias entre los niveles de anticuerpo en plasma de animales que recibieron una o tres inoculaciones i.p. de los mutantes ts. No se detectaron niveles medibles de IgM anti-P. aeruginosa en plasma de los animales inmunizados por ruta i.n. o i.p. el día 21 del protocolo de inmunización, mientras que se detectaron altos niveles de este anticuerpo en el plasma de los ratones que recibieron dos inoculaciones más de los mutantes ts por ruta i.p. (Figura 12).

3.19. DETERMINACION DE CELULAS PRODUCTORAS DE IgG ANTI-P. aeruginosa.

Con el objeto de determinar si parte de los niveles de IgG medidos en los concentrados de los líquidos de lavado pulmonar de ratones inmunizados por vía i.n. eran producidos localmente, se extrajeron los nódulos linfáticos mediastinales y poplíteos a fin de determinar si contenían células productoras de IgG específicas anti-P. aeruginosa. Para este objetivo se utilizó el método de ELISPOT. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Los nódulos linfáticos mediastinales de ratones inmunizados localmente contenían células productoras de IgG anti-P. aeruginosa, mientras que los nódulos linfáticos poplíteos de los mismos animales contenían un número mucho menor de células productoras de este anticuerpo, en forma similar a los nódulos linfáticos poplíteos de animales no inmunizados. Estos resultados, conjunta-

Tabla 12. Células de nódulos linfáticos productoras de IgG anti-P. aeruginosa.

DOSIS DE INMUNIZACION (UFC intrapulmonar)	NODULOS LINFATICOS	NUMERO DE CELULAS SECRETORAS DE IgG (por 10 ⁶ células) ^a
5 X 10 ⁵	Mediastinal	108
5 X 10 ⁵	Poplíteo	16
NO INMUNIZADOS	Mediastinal	ND ^b
NO INMUNIZADOS	Poplíteo	4

^a Las células de los nódulos linfáticos de seis ratones fueron colocadas juntas y el ensayo de ELISPOT fue realizado por duplicado. Estos datos pertenecen a un experimento representativo que fue realizado cuatro veces y que arrojó resultados similares.

^b ND, no determinado. El tamaño de los nódulos linfáticos fue demasiado pequeño (<0.1mg), por que el número de células obtenido insuficiente para la realización del ELISPOT.

=====

mente con hallazgos de otros investigadores (96), confirman que algo de IgG es sintetizada localmente en pulmón.

3.20. ESTUDIO DE LA DEPURACION PULMONAR DE P. aeruginosa EN FUNCION DE LA EDAD EN UN MODELO MURINO.

Los experimentos anteriormente descriptos fueron realizados con ratones de la cepa Swiss adultos. Está bien establecida la susceptibilidad existente a ciertas infecciones bacterianas en dependencia con la edad, y ha sido sugerido que la principal causa determinante en el establecimiento de estas infecciones es

una respuesta inflamatoria inmadura (97). A fin de determinar la dependencia de la edad con la depuración pulmonar de P. aeruginosa, se realizaron experimentos con ratones de la cepa Swiss de 10, 20 y 35 días. Los animales fueron expuestos a aerosoles que contenían P. aeruginosa en una concentración de 10^9 UFC/ml. La dosis bacteriana depositada en los pulmones de los ratones resultó la misma para todos los grupos de animales de diferentes edades, y ésta fue de 10^6 UFC/g de pulmón (peso seco). Un grupo de ratones fue sacrificado inmediatamente luego de la exposición al aerosol bacteriano (tiempo 0 horas), para establecer el número de UFC depositadas en los pulmones (UFC_0). Los animales restantes, fueron sacrificados cuatro horas después del desafío bacteriano. Los pulmones fueron removidos y homogeneizados en agua destilada estéril, y se realizaron siembras cuantitativas en placa de los homogenatos para establecer el número de UFC remanentes a cuatro horas (UFC_4). Los resultados se presentan como la proporción de P. aeruginosa no depurada, es decir, UFC_4/UFC_0 . La velocidad de depuración pulmonar es recíprocamente proporcional a la cantidad de P. aeruginosa no depurada. Asimismo, se determinó la migración de los leucocitos polimorfonucleares (PMN) en los pulmones mediante recuento diferencial de células obtenidas de lavados pulmonares y por medición de la actividad de mieloperoxidasa (MPO) en los sobrenadantes de los homogenatos de pulmón. Los leucocitos fueron contados en cámara de Neubauer, y se determinó el porcentaje de PMN en preparados de sangre teñidos con Giemsa. Los resultados se muestran en las Figuras 13, 14 y 15.

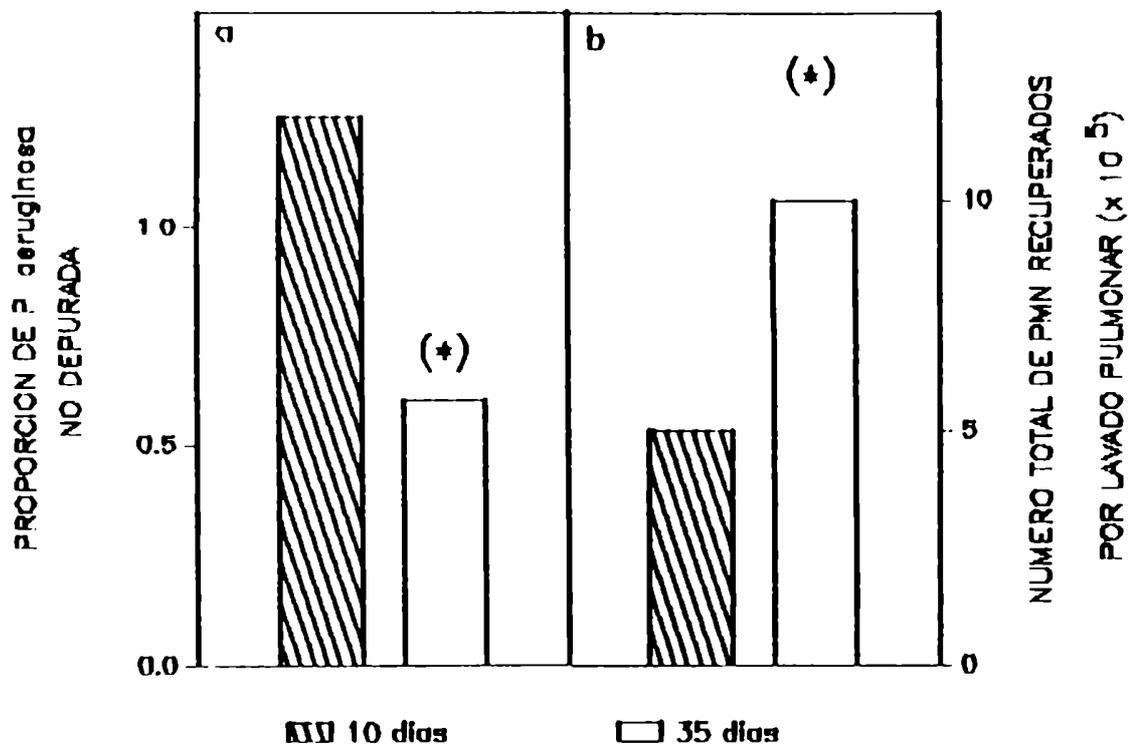


Figura 13. Proporción de P. aeruginosa no depurada (a) y número total de PMN recuperados por lavado pulmonar (b) 4 horas después que ratones Swiss de 10 y 35 días de edad fueron desafiados con un aerosol conteniendo el microorganismo. (a) *, diferencia significativa en la proporción de P. aeruginosa no depurada ($P < 0.01$, test de suma de rangos). Cada barra representa la mediana de grupos de 6 ratones de un experimento representativo. (b) *, diferencia significativa en el número total de PMN recuperados por lavado pulmonar ($P < 0.01$, test t de Student). Cada barra representa la media aritmética \pm el error standard de la media de grupos de 6 ratones de un experimento representativo.

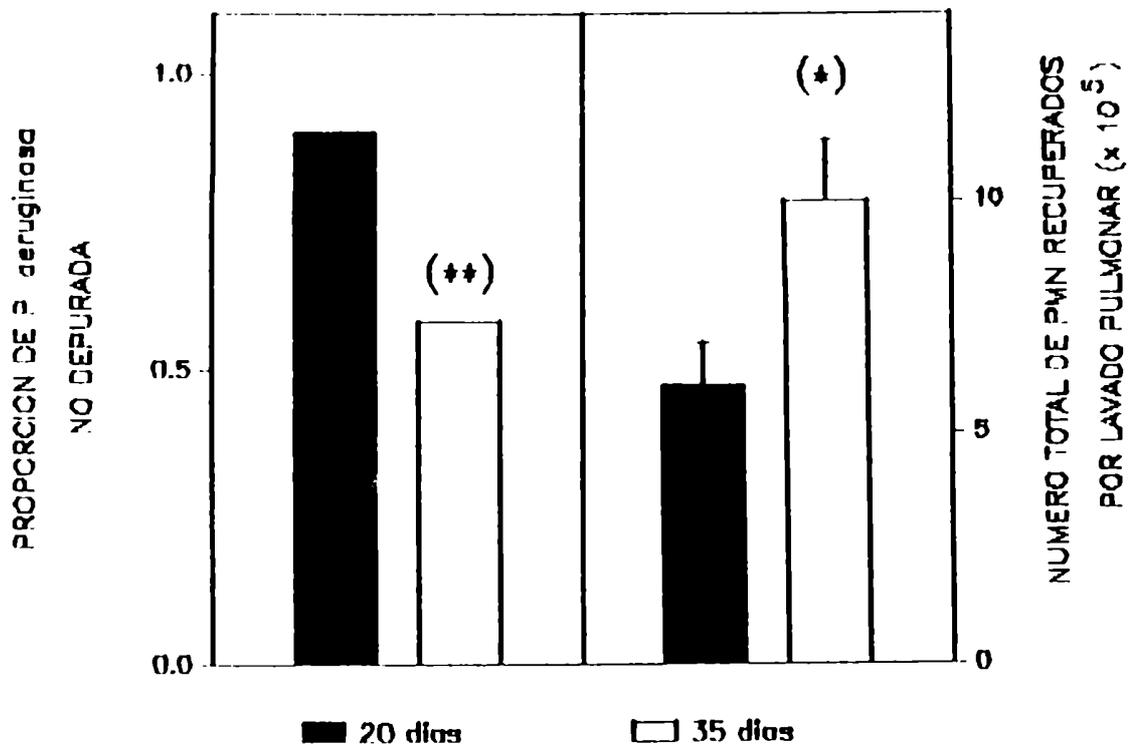


Figura 14. Proporción de *P. aeruginosa* no depurada (a) y número total de PMN recuperados por lavado pulmonar (b) 4 horas después que ratones Swiss de 20 y 35 días de edad fueron desafiados con un aerosol conteniendo el microorganismo. (a) **, diferencia significativa en la proporción de *P. aeruginosa* no depurada ($P < 0.05$, test de suma de rangos). Cada barra representa la mediana de grupos de 8 ratones de un experimento representativo. (b) *, diferencia significativa en el número total de PMN recuperados por lavado pulmonar ($P < 0.01$, test t de Student). Cada barra representa la media aritmética \pm el error standard de la media de grupos de 8 ratones de un experimento representativo.

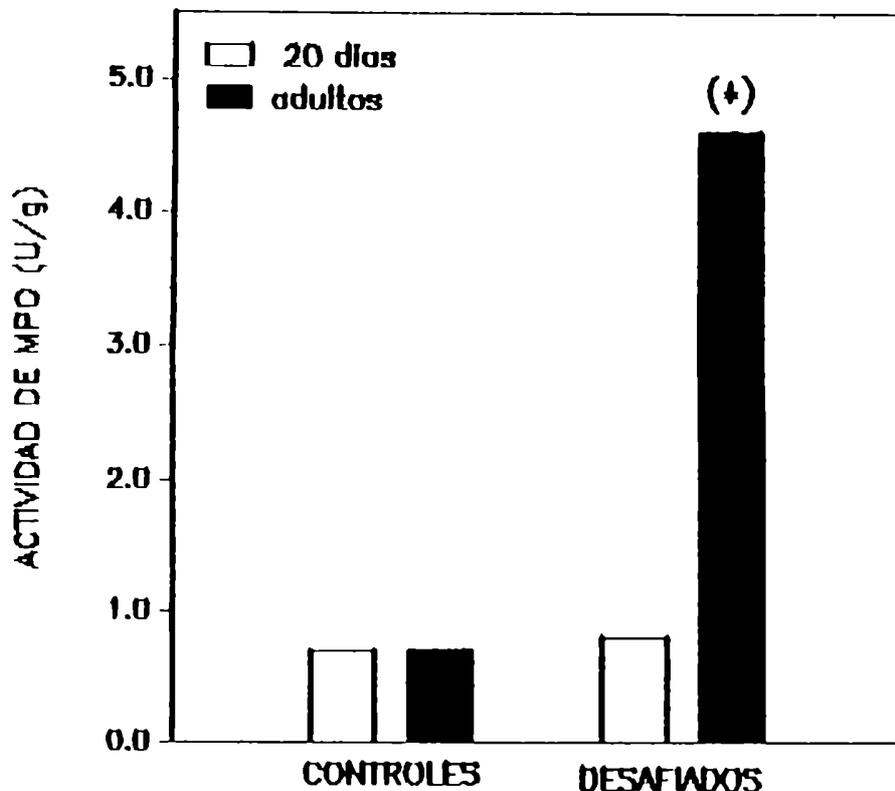


Figura 15. Actividad de MPO en sobrenadante de homogenato de pulmón de ratones de 20 y 35 días desafiados con P. aeruginosa. Los animales no desafiados recibieron un aerosol conteniendo salina. *, diferencia significativa ($P < 0.01$, test de suma de rangos). Cada barra representa la mediana de un grupo de 6 ratones.

La proporción de P. aeruginosa no depurada de los pulmones de ratones Swiss de 10 días de edad resultó significativamente superior que la de animales de 35 días (Figura 13a). Asimismo, la migración de PMN en las vías aéreas de ratones Swiss de 10 días resultó significativamente disminuída en comparación con la

de ratones de 35 días (Figura 13b). Se obtuvieron diferencias significativas similares en la proporción de P. aeruginosa no depurada y en el número de PMN en pulmón entre ratones 20 y 35 días de edad (Figura 14a y 14b, respectivamente). Aproximadamente el 40% del inóculo de P. aeruginosa fue depurado de los pulmones de ratones Swiss de 35 días de edad (Figura 13a y 14a). Estos resultados muestran que la depuración pulmonar de P. aeruginosa y la migración de PMN a pulmón se encuentran aún dificultadas a los 20 días del nacimiento del ratón. No se hallaron diferencias entre ratones de 35 días y adultos respecto a la depuración pulmonar y migración de PMN.

Se determinó la actividad de MPO en los sobrenadantes de los homogenatos de pulmón a fin de estimar el número total de PMN retenidos en los pulmones. En los ratones no desafiados, la actividad de MPO resultó menor que 1.0 U/g de tejido pulmonar. Luego del desafío por aerosol de P. aeruginosa, la actividad de MPO se incrementó significativamente en los pulmones de ratones de 35 días, pero permaneció inalterada en animales de 20 días de edad (Figura 14). Estos resultados muestran nuevamente que la marginación pulmonar de PMN, en ratones de 20 días estaba significativamente disminuída. Con el fin de descartar la posibilidad que el número reducido de PMN en los pulmones de ratones de 20 días se debiera a un número reducido de PMN circulantes, se determinó el número total de PMN en muestras de sangre periférica de ratones de 10, 20 y 35 días de edad. El número total de PMN circu-

lantes resultó significativamente menor ($P= 0.011$; test t de Student) en ratones de 10 días respecto a los animales de 35 días de edad $[(1.6 \pm 0.3) \times 10^6$ versus $(2.7 \pm 0.4) \times 10^6]$. Sin embargo, no se hallaron diferencias ($P= 0.202$; test t de Student) entre el número de PMN circulantes en ratones de 20 y 35 días de edad $[(2.1 \pm 0.3) \times 10^6$ versus $(2.7 \pm 0.4) \times 10^6]$.

Como el principal objetivo del presente trabajo de investigación fue desarrollar métodos que contribuyan a la prevención y tratamiento del grave problema que representan las neumonías bacterianas, tomando como base los resultados anteriormente presentados con mutantes ts de P. aeruginosa, decidimos ampliar nuestro estudio a infecciones respiratorias causadas por microorganismos gram-positivos. Teniendo en cuenta datos epidemiológicos locales que revelan que Streptococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae son los agentes etiológicos bacterianos más comunes en niños con neumonía típica (58), realizamos estudios con cepas de S. pneumoniae de origen local.

3.21. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS DE S. pneumoniae.

Para este estudio se utilizaron cepas de S. pneumoniae provenientes de pacientes con infección respiratoria aguda. La edad de los pacientes osciló alrededor de los cinco años, utilizándose muestras provenientes de niños de ambos sexos. A partir de dichas muestra se procedió al aislamiento e identificación de S.

pneumoniae. Se identificaron las colonias por crecimiento en agar sangre al 5%, luego de incubación durante 24 horas a 37°C. Se observaron colonias redondas con bordes enteros y aproximadamente de 1 mm de diámetro, rodeadas por una zona de alfa hemólisis. Se realizó la tinción de los preparados por el método de Gram. La observación microscópica mostró diplococos gram-positivos.

Asimismo, se realizó el test de sensibilidad a la optoquina (etilhidrocupreína) sembrando en estría a partir de una placa de agar sangre de 24 horas de incubación a 37°C. Se colocó un disco conteniendo 5 microgramos de optoquina en el centro de la placa de agar sangre. Se incubó por 24 horas a 37°C. Posteriormente se midió el halo de inhibición que resultó mayor a 16 mm en todas las muestras testeadas (organismos sensibles a la optoquina). Se realizó la prueba de solubilidad en bilis, mediante el agregado de desoxicolato de sodio en solución al 10% directamente a colonias en cultivo de 24 horas en agar sangre, observándose la disolución de la colonia en todos los casos ensayados. Esta prueba también fue realizada en medio líquido, observándose solubilidad. Para realizar la reacción de Quellung, se utilizó antisuero polivalente para S. pneumoniae. Se realizó la observación microscópica de los preparados, considerándose como positivo el test cuando la bacteria aparecía rodeada por un halo capsular brillante. Las cepas utilizadas en los experimentos posteriores fueron aquellas que dieron positiva la reacción de Quellung.

3.22. CURVA DE CRECIMIENTO DE S. pneumoniae.

Se realizaron curvas de crecimiento de las cepas previamente caracterizadas de S. pneumoniae, 37°C, a fin de establecer el TGM y de estudiar dichas cepas respecto a la propiedad de esta bacteria de sufrir autólisis. Este último punto resultaba de gran importancia para nuestros experimentos, especialmente en aquellos donde se estudió la sensibilidad de S. pneumoniae a distintos antibióticos, de modo de asegurarnos que a la D.O. donde se le adicionaba el antibiótico, la autólisis era mínima.

El crecimiento bacteriano se evaluó espectrofotométricamente. A partir de una placa de S. pneumoniae de 24 horas de incubación, se tomó un inóculo con ansa y se sembró con ansa un inóculo en medio TSB suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. El cultivo fue realizado en estufa, a 37°C. A distintos intervalos se midió la D.O. de los cultivos a 600 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. El TGM máximo a 37°C fue de 45 minutos. La porción lineal de la curva logarítmica de crecimiento se mantuvo hasta una D.O. de 0.450.

3.23. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD DE S. pneumoniae A PENICILINA-G y a D-CICLOSERINA.

Se ensayó la sensibilidad de S. pneumoniae a 2 antibióticos: Penicilina-G y D-cicloserina, con la finalidad de determinar

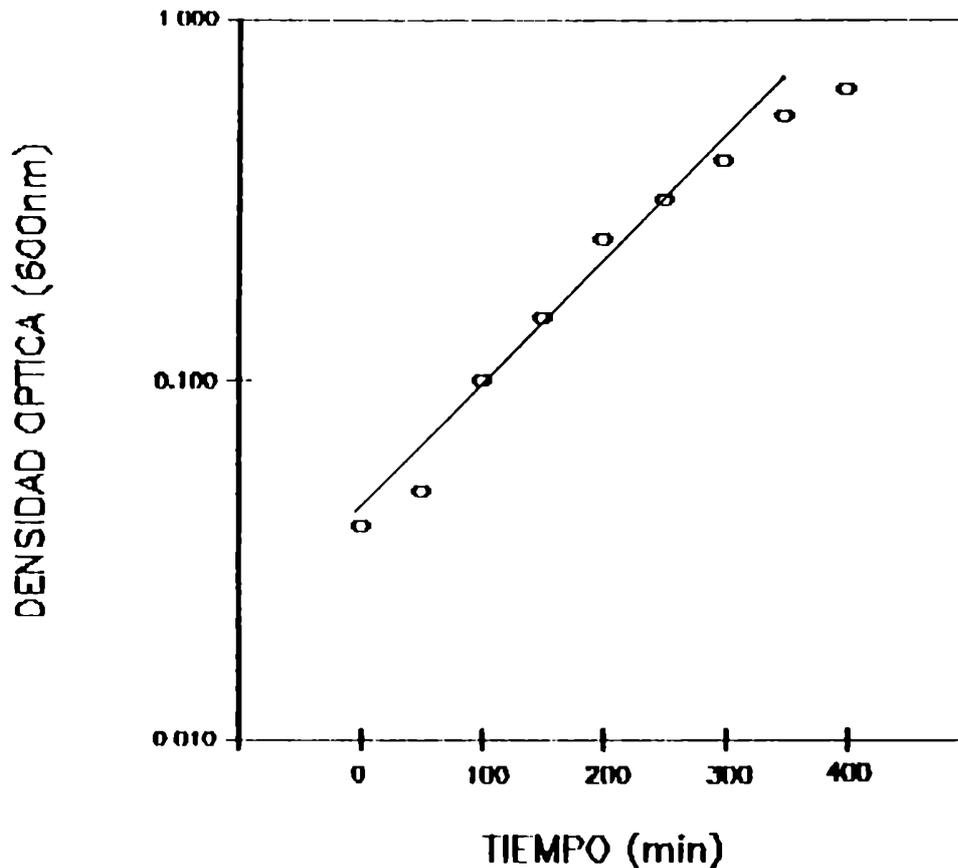


Figura 16. Curva de crecimiento de S. pneumoniae en TSB suplementado con SFB al 10%. El TGM fue de 45 minutos. Cada punto representa la D.O. del cultivo medida a 600 nm.

si podían ser utilizados posteriormente en los ciclos de enriquecimiento a realizar luego del proceso de mutagénesis. Se probaron 10 y 100 U de Penicilina-G. La D-cicloserina se utilizó en concentraciones 10 y 30 mM. Se realizó el cultivo de S. pneumoniae en caldo TSB suplementado con SFB al 10%. Cuando el cultivo alcanzó una D.O. de 0.1, se adicionó el antibiótico. Se siguió el control de D.O. durante 2.5 horas. Posteriormente se realizaron 3 lavados por centrifugación para eliminar el antibiótico y

se sembró en placas en distintas diluciones para establecer el porcentaje de mortalidad. Los resultados se muestran en la Tabla 13 y se representan en la Figura 17.

Tabla 13. Sensibilidad de *S. pneumoniae* a Penicilina G y a D-cicloserina.

ANTIBIOTICO	% MORTALIDAD
CONTROL	-
PENICILINA G 10 U	70
PENICILINA G 100U	100
D-CICLOSERINA 10 mM	100
D-CICLOSERINA 30 mM	100

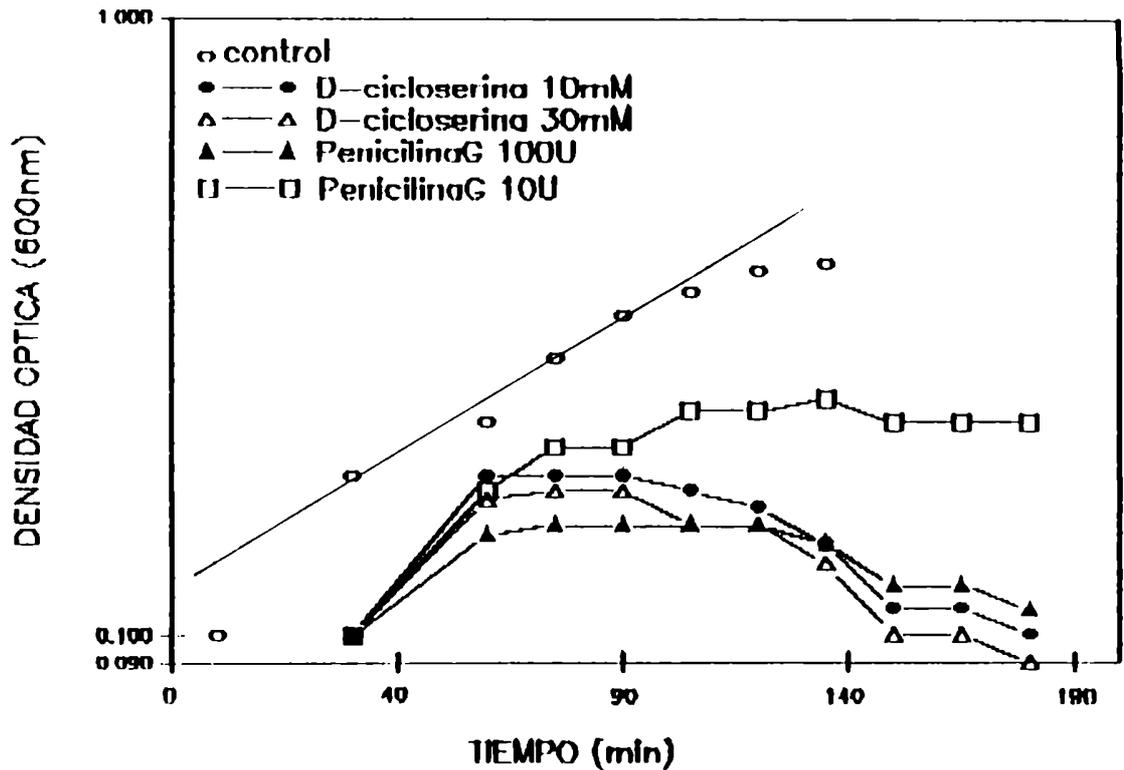


Figura 17. Sensibilidad de *S. pneumoniae* a Penicilina-G y D-cicloserina.

3.24. OBTENCION DE MUTANTES TERMOSENSIBLES DE S. pneumoniae .

El propósito de esta serie de experimentos fue la obtención de mutantes ts de S. pneumoniae. A partir de un cultivo realizado en 40 ml de caldo TSB suplementado con SFB al 10%, se cultivó en incubador de aire sin agitación, a 37°C, hasta una D.O. de 0.26 (fase logarítmica), lo cual correspondió a 1.7×10^8 UFC/ml. Este cultivo fue dividido en 4 alícuotas: control, 1, 2 y 3. Al cultivo 1 se le adicionaron 10 ug/ml de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG), al 2 20 ug/ml y al 3 30 ug/ml de la droga. Luego de 10 minutos a temperatura ambiente sin aereación, se adicionaron 20 ml de solución salina estéril a cada cultivo y se realizaron 3 lavados. Luego del último lavado, se resuspendió en caldo TSB suplementado con SFB al 10% y se sembró en placa para determinar el porcentaje de mortalidad inducida por el tratamiento (Tabla 14).

Tabla 14. Mortalidad inducida por nitrosoguanidina

	UFC/ml	% DE MORTALIDAD
CONTROL	1.7×10^8	-
1	4.0×10^7	76.5
2	3.0×10^7	82.3
3	2.5×10^7	85.3

En la Figura 18 se muestran las curvas de crecimiento de ca-

da cultivo luego de ser tratado con NG y de un cultivo control sin tratar. Pudo observarse que cada cultivo siguió un crecimiento exponencial hasta la D.O. medida, no alcanzándose la zona de autólisis.

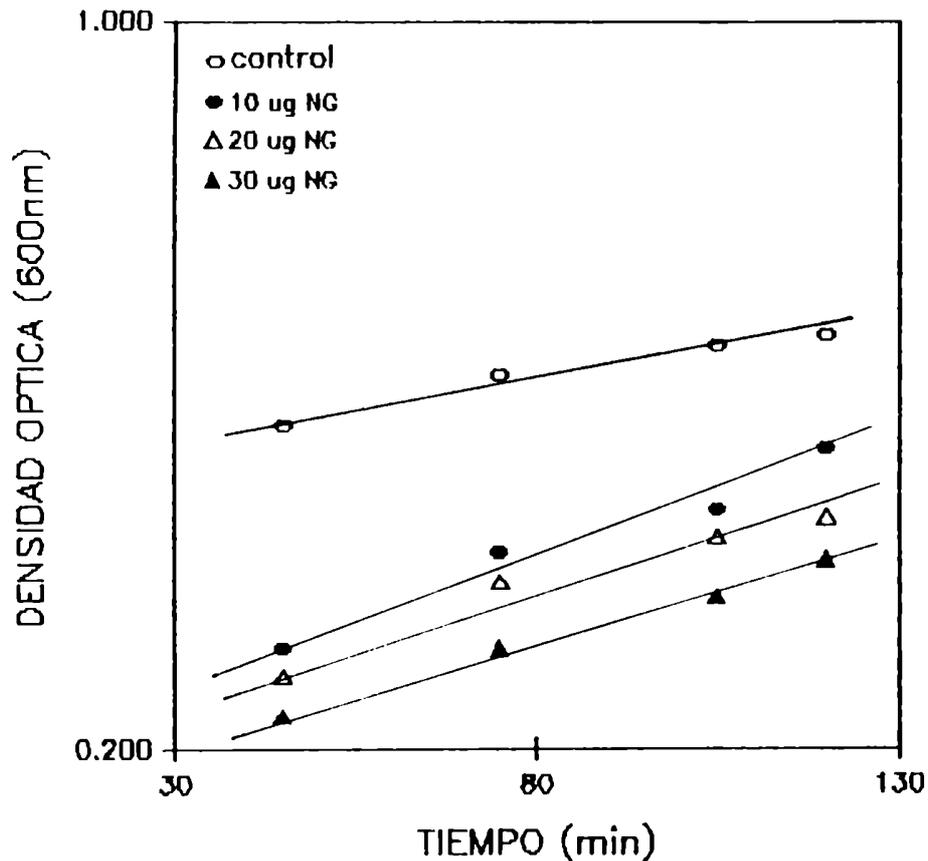


Figura 18. Cultivos a 28°C post-tratamiento con NG.

Para determinar la frecuencia de mutación, luego del tratamiento con NG, a partir de cada cultivo, se sembró un inóculo de

200 ul en placas de agar sangre que contenían 100 ug/ml de rifampicina (la cepa salvaje de S. pneumoniae es sensible a este antibiótico) (Tabla 15). El control utilizado fue el cultivo no tratado con NG.

=====
 Tabla 15. Frecuencia de mutación inducida por nitrosoguanidina

	UFC/ml	FRECUENCIA DE MUTACION
CONTROL	-	-
1	415	8×10^{-6}
2	815	1×10^{-5}
3	450	1.5×10^{-5}

=====
 Se continuó el experimento con el cultivo que presentó un porcentaje de mortalidad por el tratamiento con NG de entre 70 y 90%, que es lo recomendado (94). Luego de cultivar durante 3,5 horas a 28°C, se diluyó el cultivo y se dividió en 6 alícuotas para amplificar la posible recuperación de mutantes ts (Figura 19). Luego de 2 horas de incubación se pasaron los cultivos a 37°C, se adicionaron 100 unidades de Penicilina-G y se continuó la incubación a esta última temperatura, sin agitación. La curva de D.O. en función del tiempo se muestra en la Figura 20.

De este experimento de mutagénesis-enriquecimiento, se obtuvieron 1180 sobrevivientes, realizándose réplica plate de 250 colonias que produjeron siete mutantes ts relativamente estables. Por lo tanto, el rendimiento fue de 2.8%. Se determinó el fenotipo

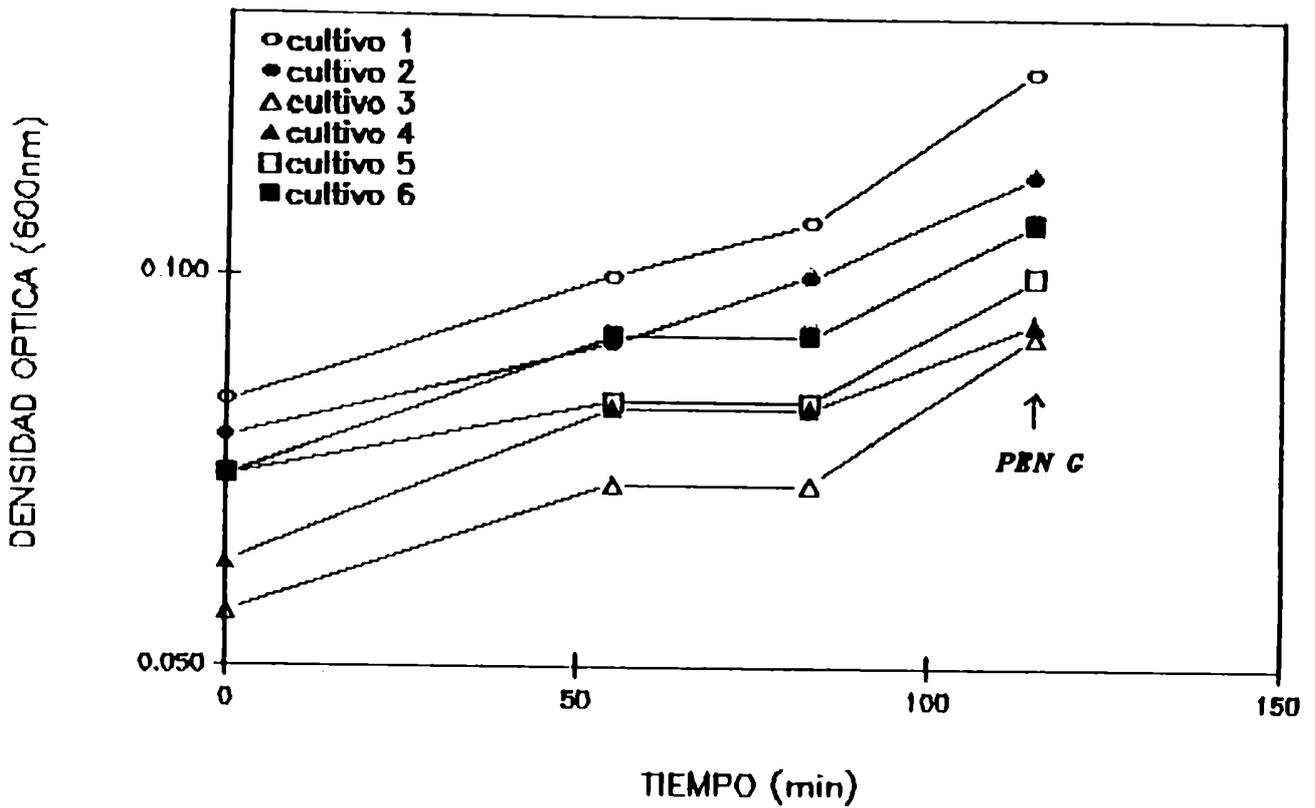


Figura 19. Amplificación de los cultivos de *S. pneumoniae* luego del tratamiento con NG.

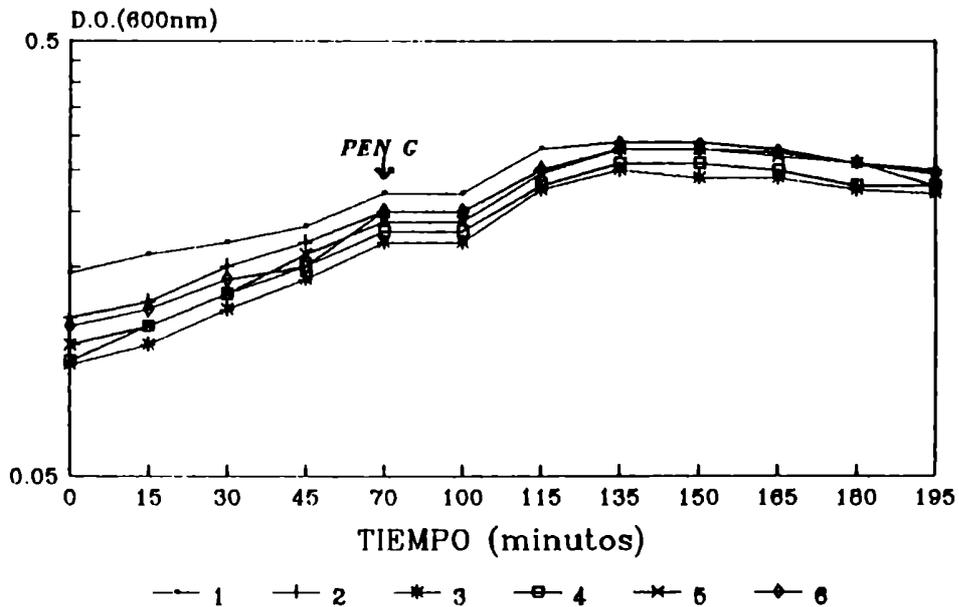


Figura 20. Enriquecimiento de los cultivos de *S. pneumoniae* con Penicilina-G.

tipo de cada uno de estos mutantes ts en medio sólido, mediante réplica plate a 28 y 37°C. De estos mutantes, dos fueron clasificados como "replicantes" y cinco como mutantes "de replicación limitada" (Tabla 16).

=====

Tabla 16. Mutantes ts de S. pneumoniae.

MUTANTE	FENOTIPO
1/7 RIF	replicante
3/1	replicante limitado
E/11	"
B/3	"
H/31	"
J/3	"
I/22	replicante

=====

El mutante 1/7 rif, fue obtenido antes de someter los cultivos al ciclo de enriquecimiento con Penicilina-G, de la siembra en placas con rifampicina. Se comprobó que este mutante era ts en placas con el mencionado antibiótico. Presentó crecimiento tenue pero parejo a 37°C.

3.25. CARACTERIZACION DE LOS MUTANTES TS OBTENIDOS.

Se realizó la reacción de Quellung sobre todos los mutantes ts obtenidos, utilizando antisuero polivalente para S. pneumoniae. Se realizó la observación microscópica de preparados obtenidos a partir de placas de 24 horas de incubación a 28°C. En

todos los casos, se observaron las células bacterianas rodeadas por el halo capsular brillante, por lo cual, el test fue considerado positivo. También se realizó el test de solubilidad en bilis, resultando éste positivo para todos los mutantes ts.

3.25.1. MEDIO SOLIDO.

El crecimiento de los mutantes ts en agar sangre, al igual que la cepa parental, mostró en todos los casos, colonias redondas, con bordes enteros y un diámetro aproximado de 1 mm, rodeadas por una zona de alfa hemólisis. El test de Optoquina resultó también positivo para todos los mutantes ts.

3.25.2. MEDIO LIQUIDO.

Se realizó el estudio del crecimiento en medio líquido de los mutantes ts obtenidos para determinar el TGM a la temperatura permisiva (28°C), la frecuencia de reversión de cada mutante, el fenotipo en medio líquido y el número de duplicaciones que cada uno de ellos experimentaba al ser transferido a la temperatura no permisiva (37°C) durante el crecimiento en medio líquido. Cada mutante ts fue cultivado en medio TSB suplementado con SFB al 10%, a 28°C sin agitación. Para la determinación del número de duplicaciones post-transferencia a la temperatura no permisiva, se cultivó a 28°C cada mutante hasta un determinado momento del crecimiento exponencial. Se dividió al cultivo en dos; con

una de las partes se continuó el seguimiento del crecimiento a 28°C y la otra parte del cultivo fue transferida a 37°C. El número de duplicaciones fue determinado en base a la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de duplic.} = \frac{\log \text{D.O. final} - \log \text{D.O. inicial}}{\log 2}$$

La frecuencia de reversión fue determinada realizando un cultivo de cada mutante hasta D.O. de 0.45. Se sembraron diluciones apropiadas del cultivo en medio sólido en placas duplicadas, y se incubaron 24 horas a 28°C o a 37°C. La frecuencia de reversión fue determinada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia de reversión} = \frac{\text{UFC/ml a } 37^{\circ}\text{C}}{\text{UFC/ml a } 28^{\circ}\text{C}}$$

En la Tabla 17 se muestra un resumen de las características estudiadas para cada mutante ts, en medio líquido. Las Figuras 21, 22, 23 y 24 muestran el crecimiento en medio líquido para cada mutante ts a 28 y 37°C. Asimismo, en la Figura 25 se muestra tra en forma comparativa, el crecimiento en medio líquido a 37°C, de la cepa parental y de uno de los mutantes ts obtenidos.

Tabla 17. Caracterización de mutantes ts de *S. pneumoniae*.

	FENOTIPO (MEDIO LIQUIDO)	TGM A 28°C (min)	DUPLICACION A 37°C	FRECUENCIA DE REVERSION
J/3	Replic. lim	120	1-2	1.0×10^{-6}
3/1	"	90	1	2.5×10^{-6}
E/11	"	90	2-3	2.0×10^{-5}
B/3	"	120	1	5.0×10^{-4}
H/31	Replicante	N.D.	N.D.	N.D.
I/22	"	N.D.	N.D.	N.D.

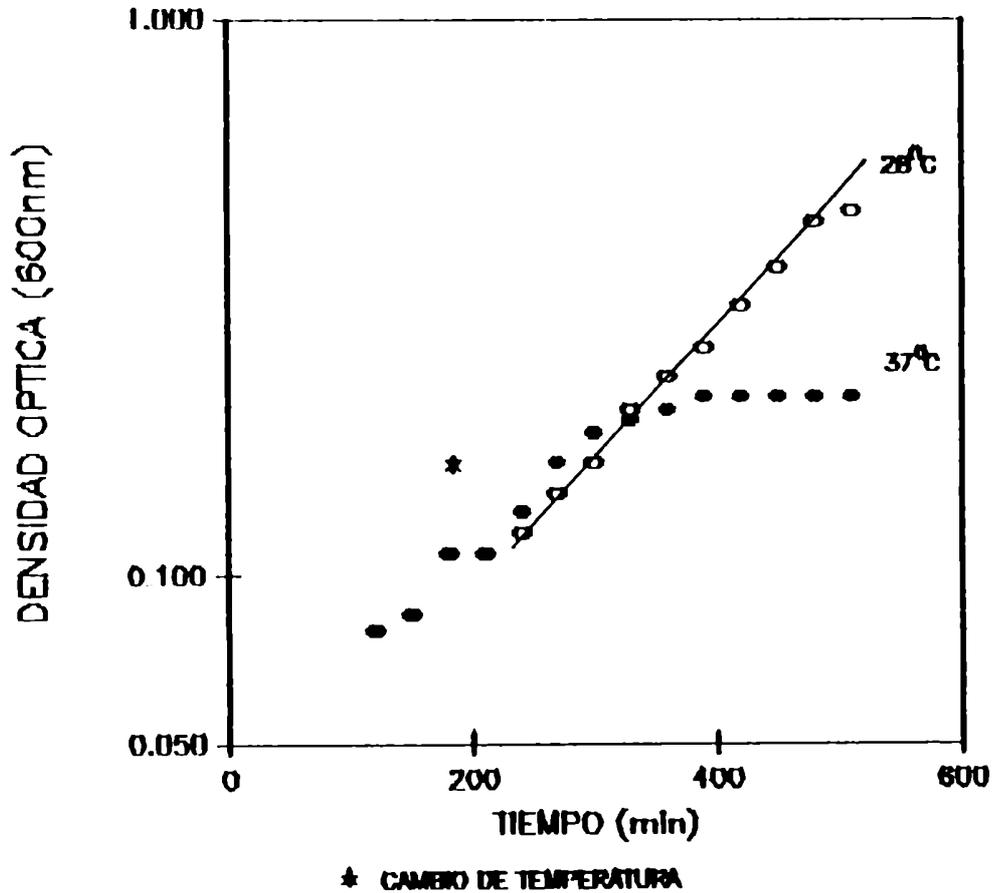


Figura 21. Crecimiento del mutante ts J/3 a 28 y 37°C en TSB suplementado con SFB al 10%. El TGM a 28°C fue de 120 minutos.

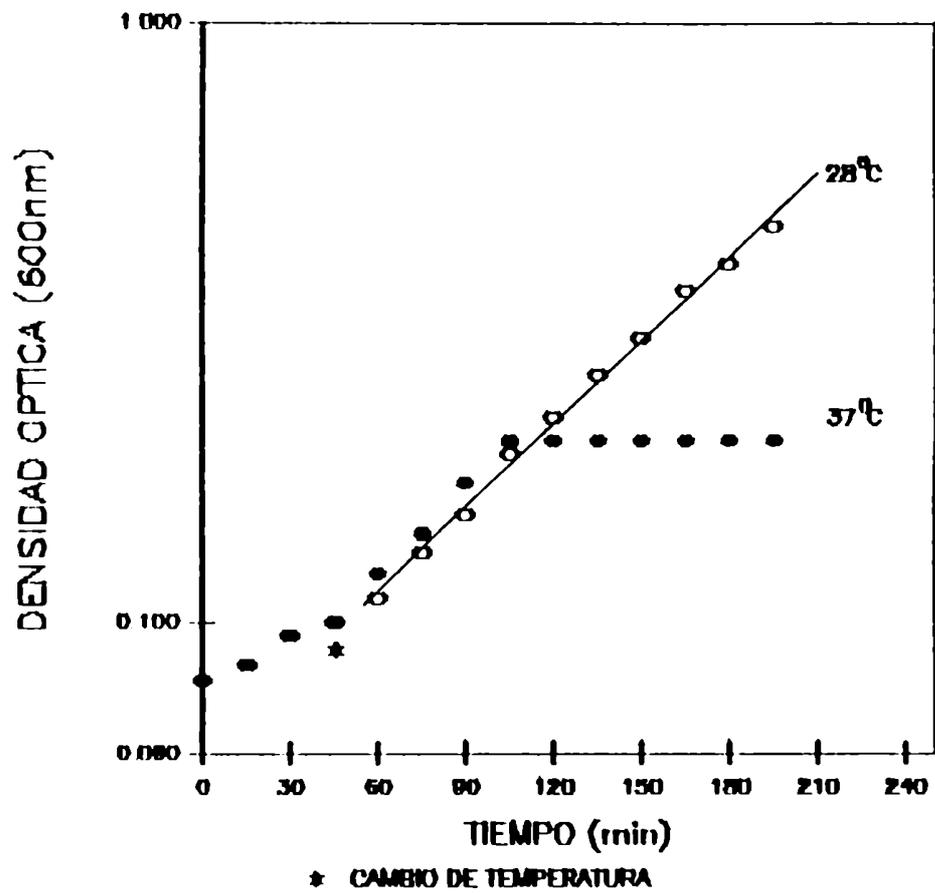


Figura 22. Crecimiento del mutante ts 3/1 a 28 y 37°C en TSB suplementado con SFB al 10%. El TGM a 28°C fue de 90 minutos.

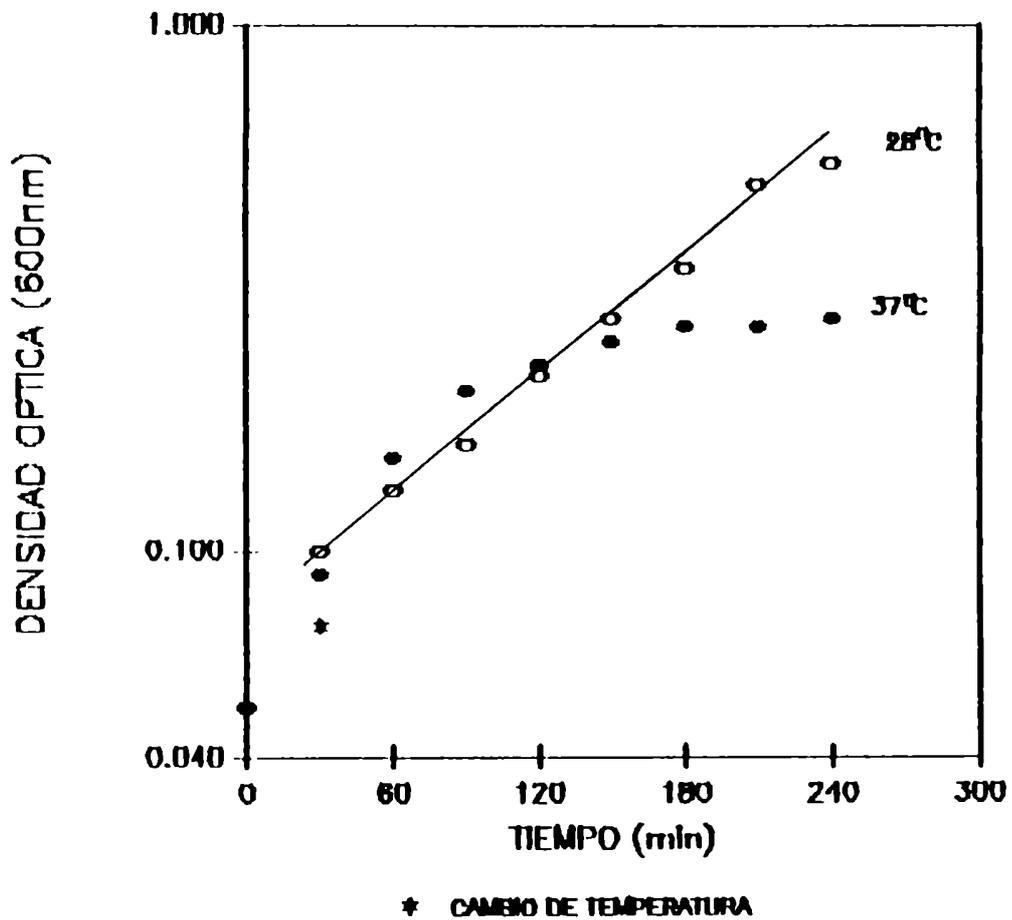


Figura 23. Crecimiento del mutante ts E/11 a 28 y 37°C en TSB suplementado con SFB al 10%. El TGM a 28°C fue de 90 minutos.

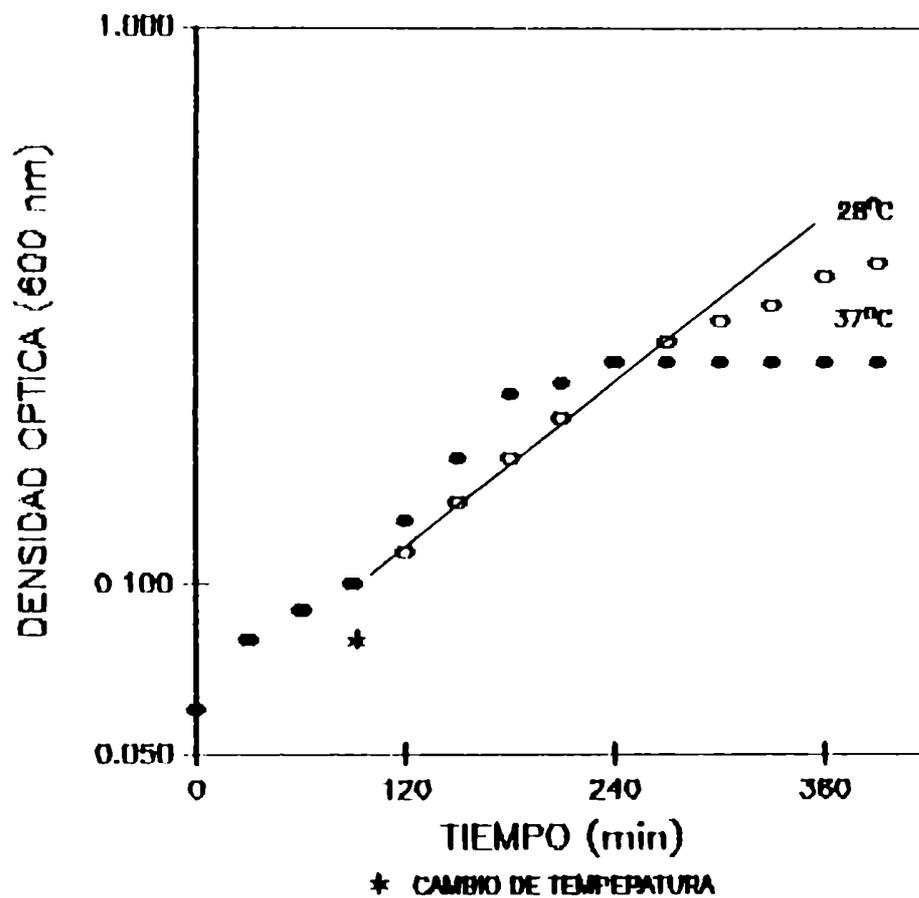


Figura 24. Crecimiento del mutante ts B/3 a 28 y 37°C en TSB suplementado con SFB al 10%. El TGM a 28°C fue de 120 minutos.

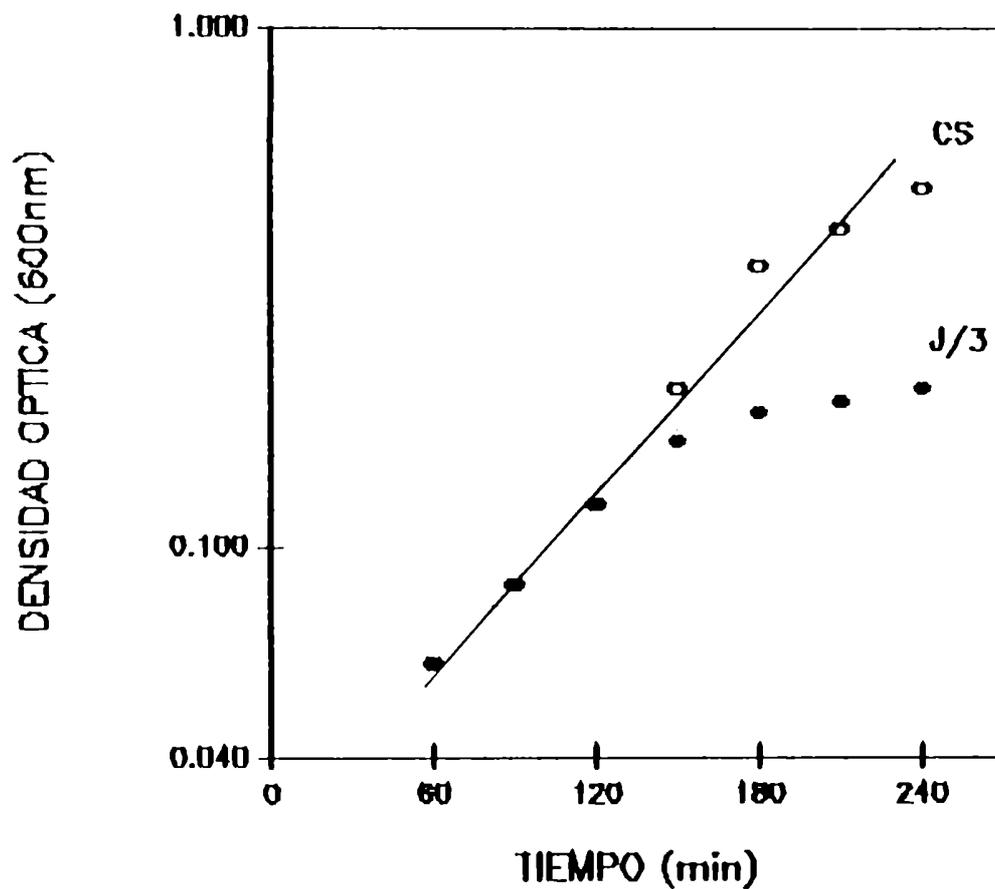
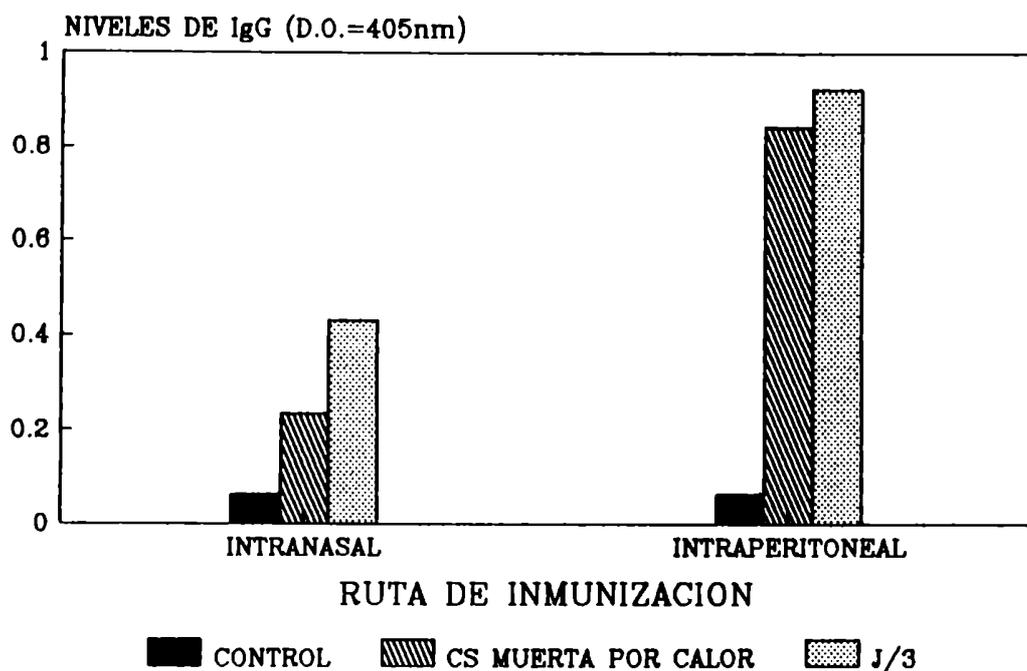


Figura 25. Crecimiento de la cepa salvaje y del mutante ts J/3 a 37°C en TSB suplementado con SFB al 10%. El TGM del mutante J/3 a 28°C fue de 120 minutos y el TGM de la cepa salvaje a 37°C fue de 45 minutos.

3.26. DETERMINACION DE ANTICUERPOS EN SUERO LUEGO DE LA INMUNIZACION CON S. pneumoniae.

Estos experimentos fueron realizados con el propósito de determinar si la inmunización con mutantes ts o con la cepa salvaje de S. pneumoniae muerta por calor inducían niveles de anticuerpos específicos medibles en suero de ratones Swiss. Grupos de ratones fueron inmunizados por ruta i.p. o i.n. con la cepa de S. pneumoniae muerta por calor o con uno de los mutantes ts (J/3). Los animales recibieron tres inóculos i.n. o i.p. de la suspensión bacteriana correspondiente, espaciados entre sí por siete días, con dosis que oscilaron entre 10^7 y 10^8 UFC/ratón. Veintiún días después de la primera inmunización, se obtuvo suero de los ratones inmunizados y de animales control. Sobre estos sueros se determinó la presencia de IgG específica anti-S. pneumoniae por ELISA. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 26.

Tanto la cepa salvaje muerta por calor como el mutante J/3 indujeron altos niveles de IgG específico en suero luego de inmunización sistémica. No se observaron diferencias entre ambos inmunógenos. Sin embargo, por ruta local, los niveles de IgG inducidos por el mutante ts J/3 resultaron marcadamente superiores a los inducidos por la cepa parental muerta por calor.



CS - CEPA SALVAJE
 DEL SUERO-1/186

Figura 26. Determinación de los niveles séricos de IgG luego de inmunización local o sistémica con el mutante ts J/3 o con *S. pneumoniae* muerto por calor. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre plasma obtenido a partir de 8 ratones de un experimento representativo.

En experimentos separados, y con el fin de establecer las diferencias que pudieran existir en el patrón de anticuerpos producidos luego de inmunización local o sistémica con el mutante ts J/3, se realizaron experimentos en los cuales grupos de ratones de la cepa Swiss fueron inmunizados por vía i.p. o i.n. Los animales recibieron tres inóculos del mutante ts espaciados entre sí por siete días, con dosis que oscilaron entre 10^7 y 10^8 UFC/ratón. Siete días después de cada inoculación bacteriana y antes de administración de la nueva dosis del inmunógeno, se extrajo

sangre de los animales y sobre el plasma obtenido, se determinó la presencia de IgG e IgM específicas anti-S. pneumoniae por ELISA. Los resultados se muestran en las Figuras 27 y 28.

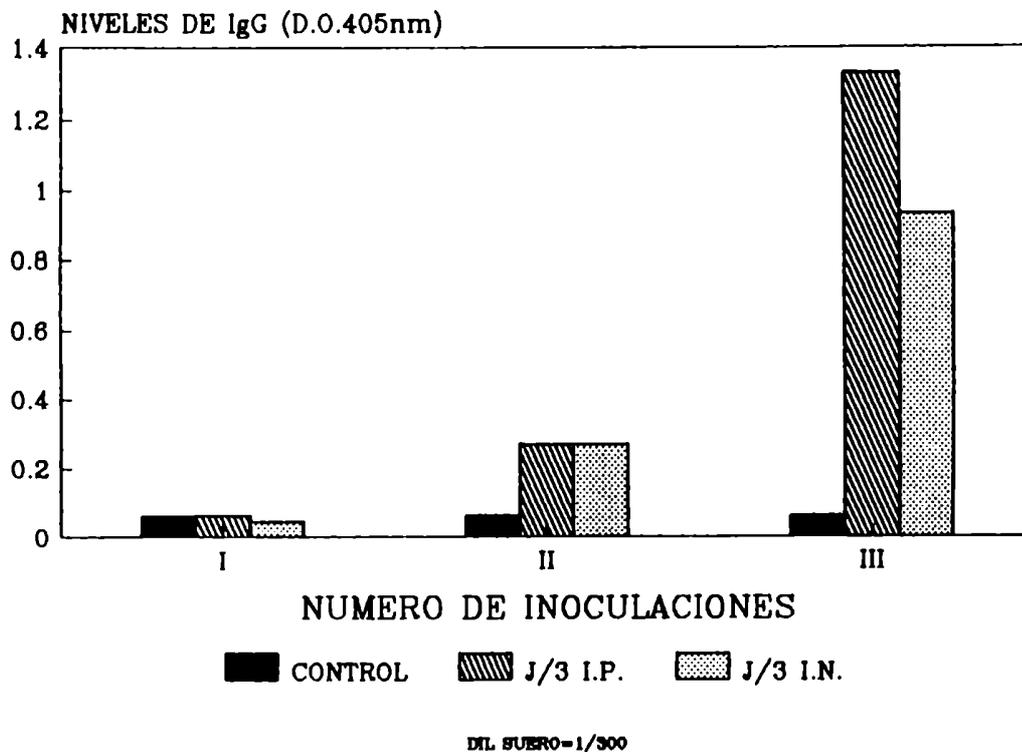
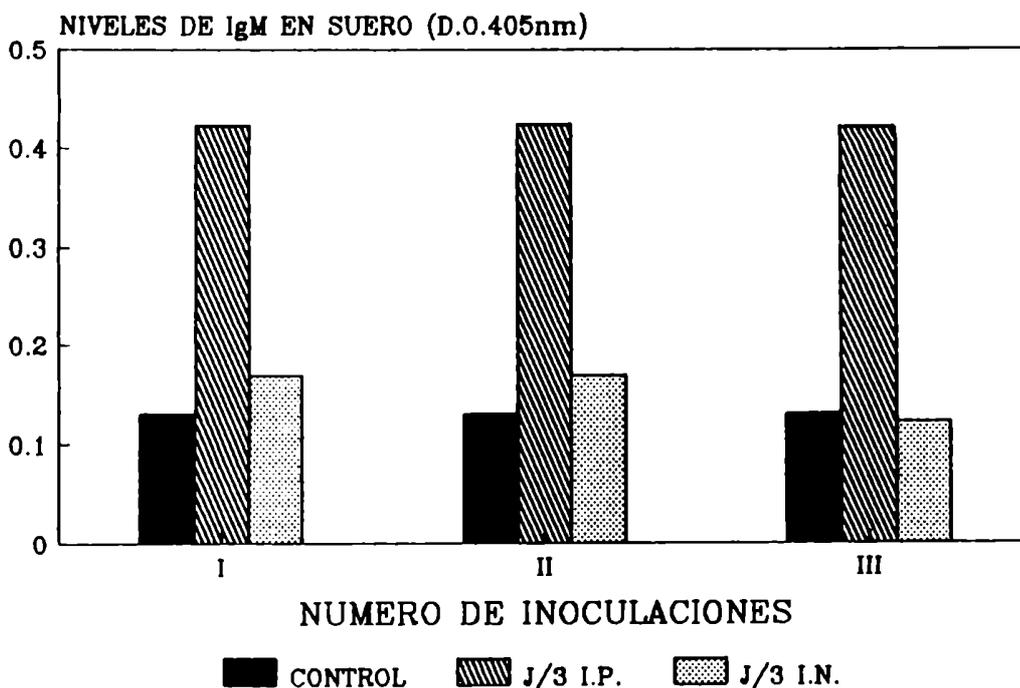


Figura 27. Determinación de IgG en suero de ratones Swiss inmunizados por vía i.p. o i.n. con el mutante ts J/3 de S. pneumoniae. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre plasma obtenido de grupos de 6 ratones de un experimento representativo.

Pudo observarse que con una única inoculación bacteriana, no se detectaron niveles medibles de IgG específica anti-S. pneumoniae. En ratones que recibieron dos inoculaciones del mutante J/3, se detectaron bajos niveles de IgG en suero de ratones inmunizados por ambas rutas, no existiendo diferencias medibles entre ambas. Sin embargo, repitiéndose los resultados anteriormente



DL SUERO=1/16

Figura 28. Determinación de IgM en suero de ratones Swiss inmunizados por vía i.p. o i.n. con el mutante ts J/3 de *S. pneumoniae*. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre plasma obtenido de grupos de 6 ratones de un experimento representativo.

obtenidos, en animales que recibieron tres inoculaciones del inmunógeno por vía i.p., los niveles de IgG específicos detectados en plasma resultaron mayores que los medidos en suero de ratones inmunizados con tres dosis del mutante por ruta i.n. Se concluye que existirían diferencias apreciables en los niveles de IgG específico producidos por el mutante ts J/3, tanto por ruta local como sistémica, según los animales reciban una, dos o tres inoculaciones del inmunógeno.

En el caso de la determinación de IgM específica anti-S. pneumoniae, pudo observarse que en los animales inmunizados localmente con el mutante ts los niveles medidos de este anticuerpo en suero de ratones que recibieron una o dos inoculaciones bacterianas fueron apenas diferentes a los controles, mientras que con tres inoculaciones de J/3 no existieron diferencias respecto al control. Sin embargo, en ratones inmunizados por ruta sistémica, el patrón de IgM en plasma resultó totalmente diferente: los niveles de este anticuerpo medidos resultaron altamente diferentes a los controles, observándose los mismos niveles para animales que recibieron una, dos o tres inoculaciones del mutante ts.

3.27. DETERMINACION DE ANTICUERPOS EN LIQUIDO DE LAVADO PULMONAR LUEGO DE INMUNIZACION CON S. pneumoniae.

Este experimento fue realizado en forma similar al descrito en el punto 3.26. Veintiún días después de la primera inmunización, se realizaron lavados pulmonares en los todos los grupos de animales. Los líquidos de lavado así obtenidos fueron concentrados en concentradores Amicon, a 300rpm durante 12 horas. Sobre los concentrados de los líquidos de lavado se determinó la presencia de IgG e IgA específicas anti-S. pneumoniae mediante el método de ELISA. Los resultados de este experimento se muestran en las Figuras 29 y 30.

La inmunización i.n. con el mutante ts J/3 indujo niveles de

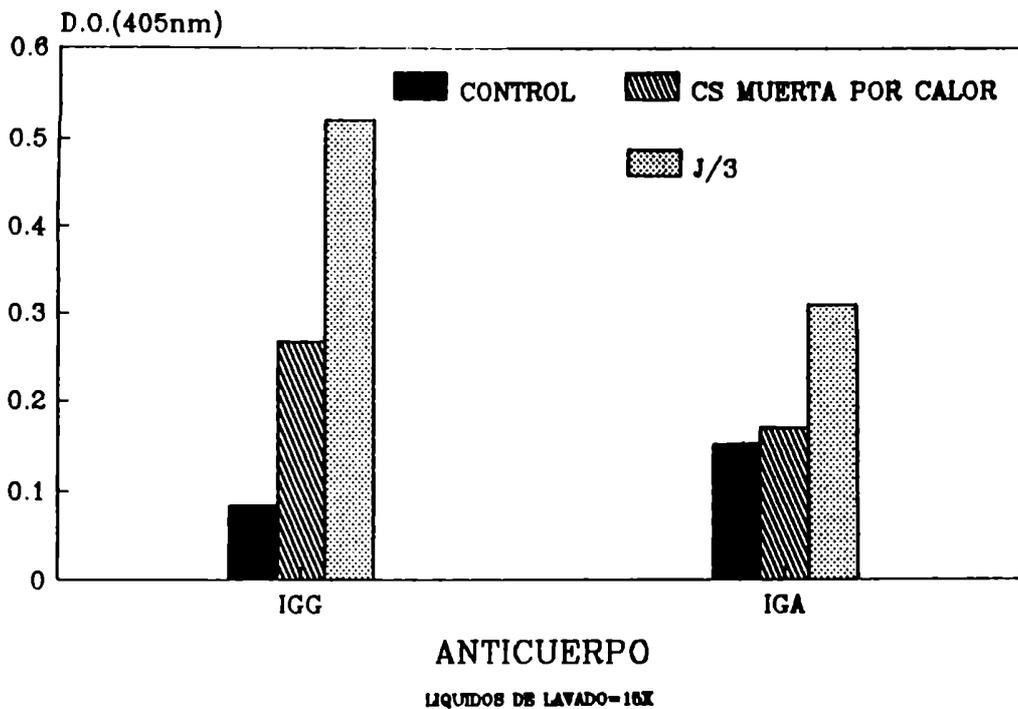


Figura 29. Determinación de anticuerpos líquido de lavado pulmonar luego de inmunización i.n. con *S. pneumoniae* muerto por calor o con el mutante ts J/3. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre concentrados de líquidos de lavado pulmonar obtenidos de grupos de 8 ratones de un experimento representativo.

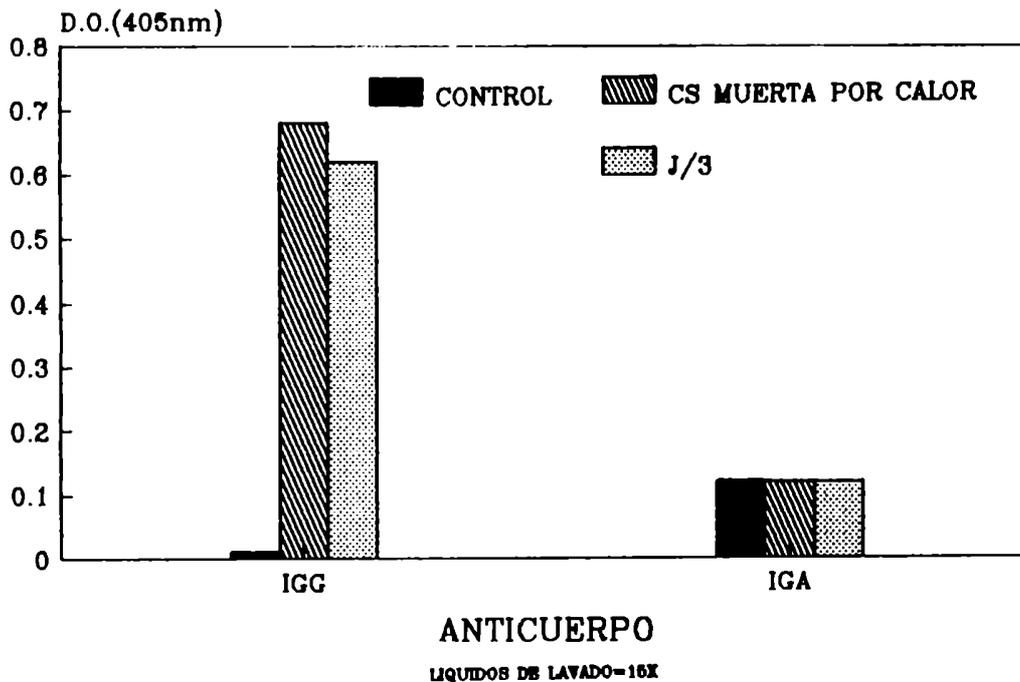


Figura 30. Determinación de anticuerpos líquido de lavado pulmonar luego de inmunización i.p. con *S. pneumoniae* muerto por calor o con el mutante ts J/3. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre concentrados de líquidos de lavado pulmonar obtenidos de grupos de 8 ratones de un experimento representativo.

IgG específicos en líquido de lavado pulmonar marcadamente superiores a los producidos por la cepa parental muerta por calor. Asimismo, el mutante J/3 indujo niveles de IgA específica anti-S. pneumoniae medibles respecto al control, mientras que no se detectaron niveles de este anticuerpo en los líquidos de lavado de animales inmunizados localmente con la cepa salvaje muerta por calor.

La inmunización sistémica también indujo niveles medibles de IgG anti-S. pneumoniae en líquido de lavado pulmonar, no observándose diferencias apreciables entre los niveles producidos por el mutante y aquellos inducidos por la cepa parental muerta por calor. Sin embargo, ni el mutante ts J/3 ni la cepa de S. pneumoniae muerta por calor, indujeron niveles medibles de IgA en los concentrados de líquido de lavado pulmonar de animales vacunados sistémicamente. Nuevamente, al igual que en el caso de P. aeruginosa, se establecen claras diferencias en el patrón de anticuerpos producidos en respuesta a inmunización con mutantes ts por vía local respecto a sistémica.

En los grupo de ratones que fueron utilizados para determinar si existían diferencias en la producción de anticuerpos luego de una, dos o tres inoculaciones con el mutante ts J/3, se realizaron lavados pulmonares luego de la tercera inoculación bacteriana, a fin de reconfirmar los resultados obtenidos en el patrón de anticuerpos producidos luego de inmunización local y sistémica

con el mutante ts. Sobre los concentrados de los líquidos de lavado obtenidos, se determinó la presencia de IgG e IgA específica anti-S. pneumoniae por ELISA. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 31.

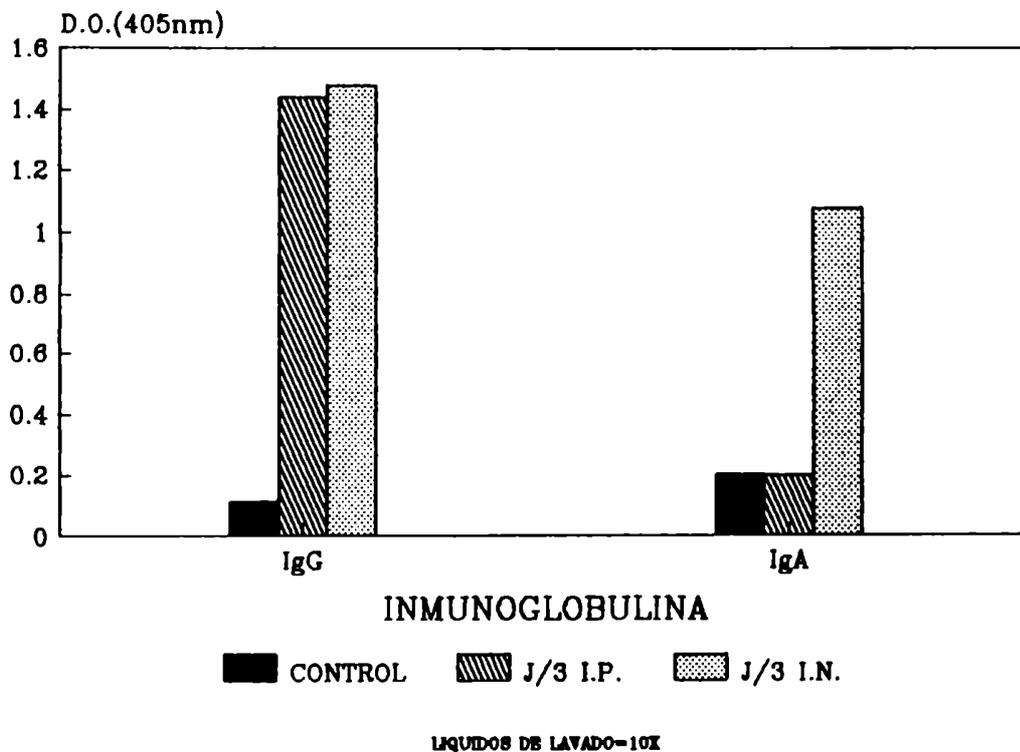


Figura 31. Determinación de anticuerpos líquido de lavado pulmonar luego de inmunización i.p. e i.n. con el mutante ts J/3. Cada barra representa la D.O. medida a 405 nm sobre concentrados de líquidos de lavado pulmonar obtenidos de grupos de 6 ratones de un experimento representativo.

Nuevamente, pudo observarse, que no existieron diferencias en los niveles de IgG específicos medidos en líquidos de lavado pulmonar obtenidos de animales inmunizados por ruta i.n. o i.p., siendo éstos en ambos casos muy altos. Los niveles de IgA específicos anti-S. pneumoniae detectados en concentrados de líquidos

de lavado pulmonar de ratones inmunizados localmente con el mutante J/3 fueron altamente diferentes al control. No se detectaron niveles medibles de este anticuerpo en concentrados de líquidos de lavado obtenidos de animales inmunizados sistémicamente.

3.28. DOSIS LETAL 50 PARA S. pneumoniae.

Se realizó un cultivo en medio líquido de la cepa salvaje de S. pneumoniae, sin agitación, a 37°C, hasta una D.O. 0.25 (1.6×10^8 UFC/ml). Con esa suspensión bacteriana se realizó el desafío i.p. de ratones Swiss, machos y hembras, de 8 semanas de vida. Las dosis administradas fueron: 1×10^8 , 1×10^7 , 1×10^6 y 1×10^5 UFC por animal. A los 10 días del desafío se dió por finalizado el experimento por no haber mortalidad. Este experimento fue repetido observándose los mismos resultados. En base a estos resultados, se supuso que la cepa parental de S. pneumoniae había perdido su cápsula de polisacárido, a pesar de los cuidados tomados para evitarlo. Por este motivo, se procedió a pasar dicha cepa por ratones con el fin de estimular la expresión de la cápsula.

3.29. PASAJE DE LA CEPA SALVAJE DE S. pneumoniae POR RATON.

Se realizó el procedimiento de pasaje de la cepa salvaje de S. pneumoniae por ratones de la cepa Swiss con el fin de que el microorganismo recuperara su virulencia en base a la propiedad de

esta bacteria de elaborar cápsula in vivo. Para esto se realizó un cultivo de S. pneumoniae hasta D.O.=0.45 (1×10^9 UFC/ml) y con esa suspensión bacteriana se inocularon intraperitonealmente los ratones. Luego de 4 horas se extrajo sangre de los animales por punción cardíaca y se cultivó a 37°C en estufa por 24 horas. Posteriormente se sembró en placas de agar sangre para el recuento cuantitativo. Los resultados fueron negativos, no pudiendo recuperarse microorganismos por este procedimiento.

Se observó que la cepa de S. pneumoniae utilizada en este estudio, no recuperaba su virulencia con el tiempo. Esto fue comprobado al inocular en sucesivos experimentos, ratones de la cepa Swiss con este microorganismo.

Mediante el ensayo de la reacción de Quellung, se comprobó que tanto la cepa de S. pneumoniae parental utilizada en este estudio, como los mutantes ts obtenidos a partir de la misma, perdieron la cápsula de polisacárido. En el caso de la cepa salvaje de S. pneumoniae, dicha cápsula es la responsable de la virulencia de este microorganismo, motivo por el cual, no pudieron realizarse los experimentos de protección inducida por inmunización con los mutantes ts obtenidos. Sin embargo, en base a los resultados de anticuerpos medidos por ELISA luego de inmunización local y sistémica con la cepa de S. pneumoniae muerta por calor y con el mutante ts J/3, se demuestra la mayor capacidad inmunogénica del mutante respecto a la cepa parental. Estos resultados

permitieron elaborar una hipótesis respecto a la posible protección que inducirían los mutantes ts que perdieron su cápsula de polisacárido contra el desafío por cepas capsuladas de S. pneumoniae. Este punto está actualmente en estudio.

3.30. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA POBLACION CELULAR DEL PULMON MURINO LUEGO DE AEROSOLIZACION CON S. pneumoniae.

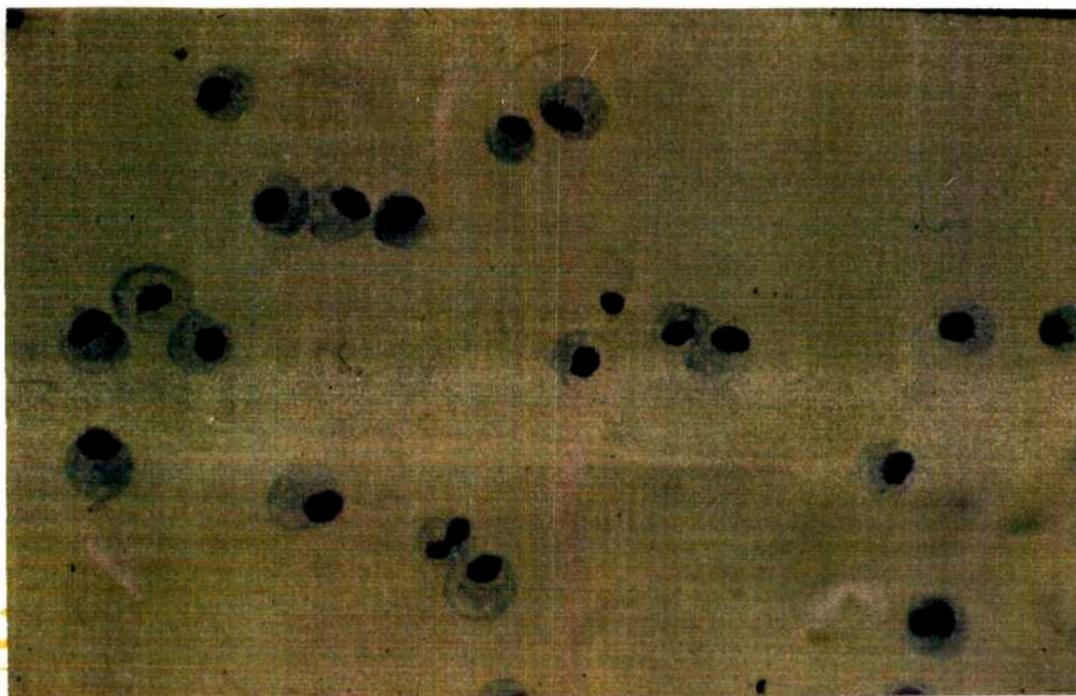
Se estudiaron los cambios en la población celular del pulmón murino en respuesta a un aerosol que contenía 1×10^8 UFC/ml de S. pneumoniae. La exposición fue realizada a 22-24°C y a una presión de agua relativa de -2 mm. Bajo estas condiciones, 5000 UFC de S. pneumoniae fueron recuperadas inmediatamente luego de la exposición, mediante cultivos realizados a partir de homogenatos de pulmón, en placas de agar tripticase soya suplementado con sangre humana al 5%. Los homogenatos de pulmón fueron realizados con 5 ml de agua destilada estéril para cada animal. Se utilizaron grupos de ratones aerosolizados con P. aeruginosa como controles positivos y grupos de animales aerosolizados con Staphylococcus aureus como controles negativos, realizándose los lavados pulmonares a los mismos tiempos que los animales aerosolizados con S. pneumoniae. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18 (ver fotografías 4 y 5).

El número de PMN recuperados siguió un patrón similar al de S. aureus, mostrando marcadas diferencias en ambos casos respecto

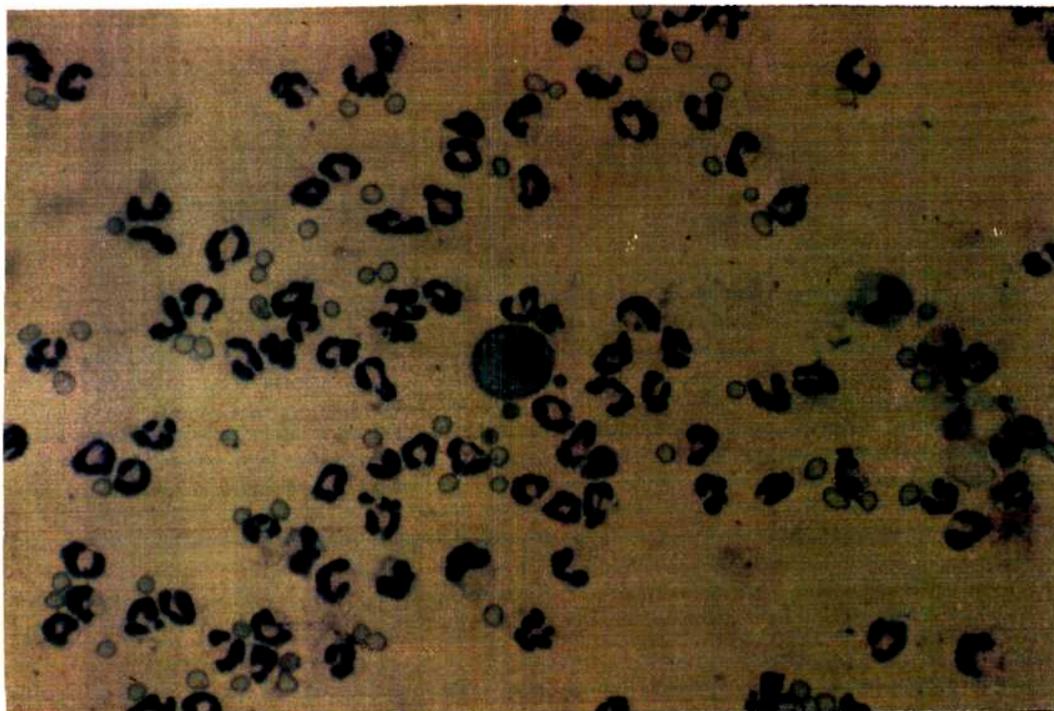
al número de PMN recuperados luego del desafío con P. aeruginosa.

Tabla 18. Número de PMN recuperados luego del desafío.

Nº DE PMN RECUPERADOS LUEGO DEL AEROSOL CON:			
	<u>P. aeruginosa</u>	<u>S. aureus</u>	<u>S. pneumoniae</u>
BASAL	< 5.000	< 5.000	< 5.000
4 HORAS	2 X 10 ⁶	< 5.000	< 5.000
24 HORAS	1.5 X 10 ⁶	< 5.000	< 5.000



Fotografía 4. Células recuperadas por lavado pulmonar de ratones desafiados con un aerosol de S. aureus. La gran mayoría de las células eran macrófagos alveolares. Resultados similares se obtuvieron por estudio de los líquidos de lavado de ratones desafiados con S. pneumoniae (reproducida con permiso de la Dra. M. C. Cerquetti).



Fotografía 5. Células recuperadas por lavado pulmonar de ratones desafiados con un aerosol de P. aeruginosa. La gran mayoría de las células eran PMN (reproducida con permiso de la Dra. M. C. Cerquetti).

3.31. ESTUDIO DE LA DEPURACION PULMONAR DE S. pneumoniae EN RATONES LUEGO DE LA AEROSOLIZACION.

Este experimento fue realizado para estudiar la depuración de S. pneumoniae del pulmón murino luego aerosolización. Se realizó un cultivo de S. pneumoniae hasta D.O. = 0.45 en condiciones estándar. Con esa suspensión bacteriana se aerosolizaron ratones de la cepa Swiss, durante 40 minutos. Inmediatamente luego del aerosol bacteriano y a tiempos 2 y 4 horas, se sacrificaron animales, se extrajeron sus pulmones y se realizaron los homoge-

natos en agua destilada. Las suspensiones homogeneizadas fueron sembradas en placas de agar sangre para recuento cuantitativo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32.

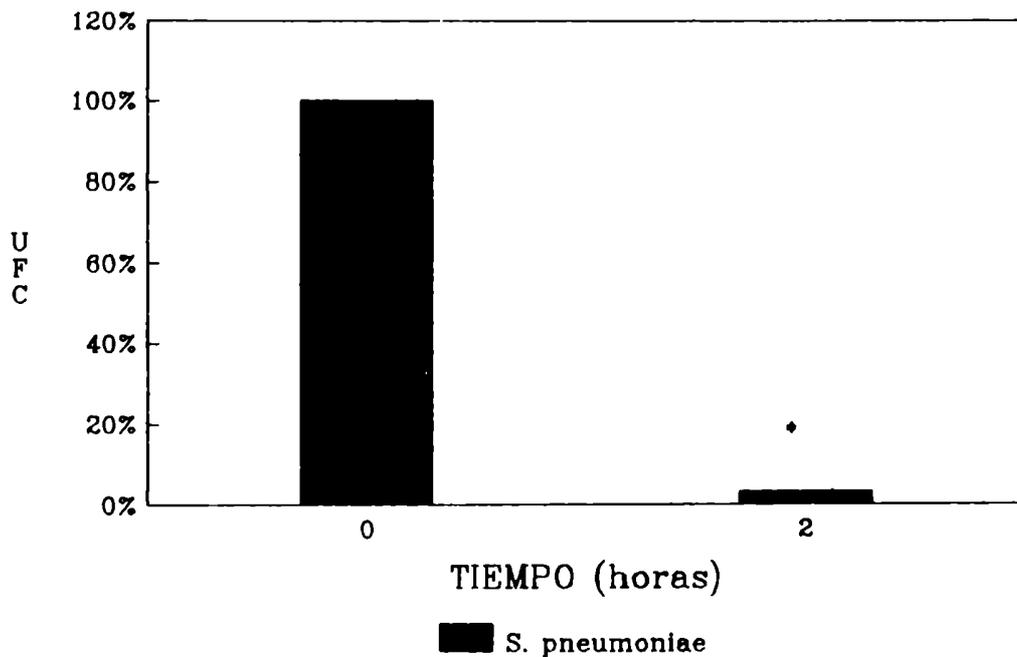


Figura 32. Depuración de S. pneumoniae del pulmón murino. Cada barra representa la mediana de grupos de 6 ratones de un experimento representativo. (*) diferencia significativa en la proporción de S. pneumoniae no depurado ($P < 0.001$, test de suma de rangos).

La cepa salvaje de S. pneumoniae fue depurada del pulmón murino rápidamente, en un período menor a las cuatro horas y con una caída significativa en el número de UFC/pulmón en las primeras dos horas ($P < 0.001$, test de suma de rangos), con sólo un 3%

de bacteria remanente en pulmón a ese tiempo. En base a estos resultados se infirió que la rápida depuración del pulmón murino de la cepa salvaje se debió a la pérdida de la cápsula de polisacárido de esta bacteria.

3.32. ESTUDIO DE LA DEPURACION PULMONAR DE P. aeruginosa EN RATONES LUEGO DE AEROSOLIZACION.

Este experimento fue realizado para estudiar la depuración de P. aeruginosa del pulmón murino luego aerosolización. Se realizó un cultivo de este microorganismo hasta D.O. = 0.90 en condiciones estándar. La suspensión bacteriana que fue utilizada para la nebulización, contenía 1.4×10^9 UFC/ml. Con dicha suspensión se realizó la aerosolización de ratones de la cepa Swiss, durante 30 minutos. Inmediatamente luego del aerosol bacteriano y a tiempo 4 horas, se sacrificaron animales, se extrajeron sus pulmones y se realizaron los homogenatos en agua destilada estéril. Las suspensiones bacterianas así obtenidas fueron sembradas en placas de TSA para recuento cuantitativo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 33.

Los recuentos obtenidos de las suspensiones sembradas a tiempo cero indicaron que los animales recibieron 2.65×10^5 UFC en pulmón. La depuración de P. aeruginosa del pulmón murino experimentó una caída significativa ($P < 0.001$, test de suma de rangos) a las cuatro horas del aerosol bacteriano. El porcentaje de bac-

teria remanente en pulmón murino a las cuatro horas del desafío fue de 17%.

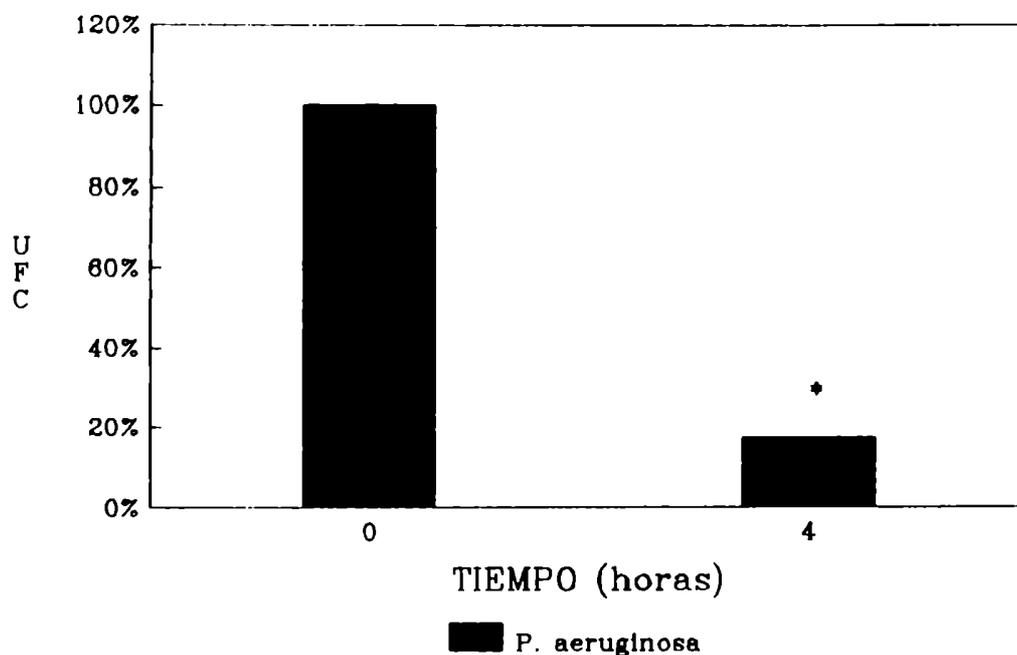


Figura 33. Depuración de P. aeruginosa del pulmón murino. Cada barra representa la mediana de grupos de 6 ratones de un experimento representativo. (*) diferencia significativa en la proporción de P. aeruginosa no depurada ($P < 0.001$, test de suma de rangos).

3.33. ESTUDIO DE LA DEPURACION PULMONAR DE S. aureus EN RATONES LUEGO DE AEROSOLIZACION.

Este experimento fue realizado para estudiar la depuración de S. aureus del pulmón murino luego aerosolización. Se realizó un cultivo de este microorganismo hasta D.O.= 0.30 en condiciones estándar. La suspensión bacteriana utilizada para la nebuliza-

ción, contenía 1×10^8 UFC/ml. Con dicha suspensión se realizó la aerosolización de ratones de la cepa Swiss, durante 30 minutos. Inmediatamente luego del aerosol bacteriano y a tiempo 4 horas, se sacrificaron animales, se extrajeron sus pulmones y se realizaron los homogenatos en agua destilada estéril. Las suspensiones bacterianas así obtenidas fueron sembradas en placas de TSA para recuento cuantitativo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 34.

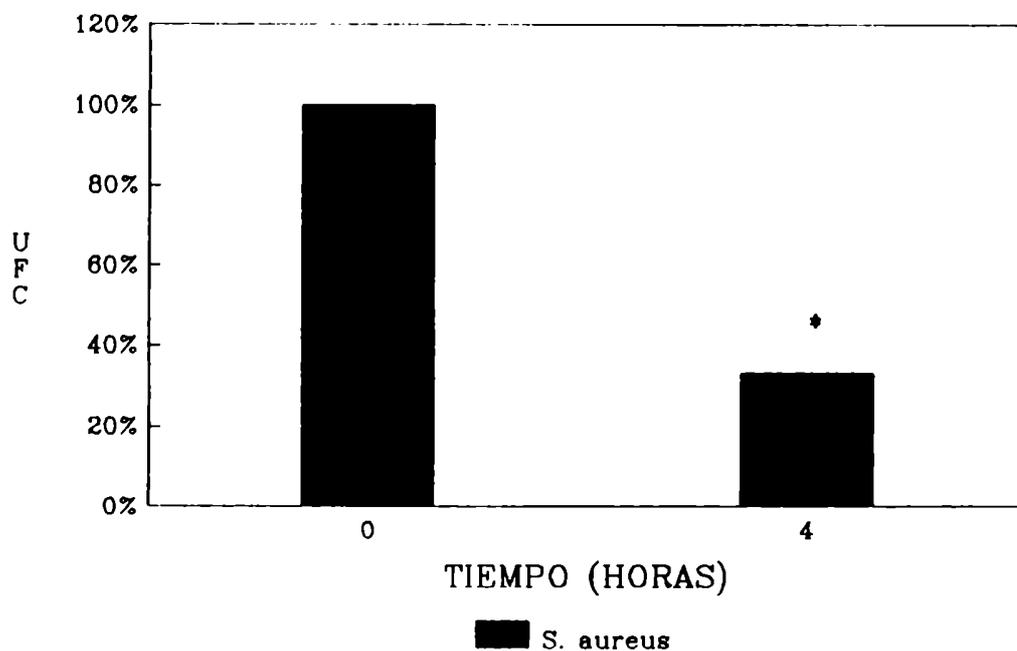


Figura 34. Depuración de S. aureus del pulmón murino. Cada barra representa la mediana de grupos de 6 ratones de un experimento representativo. (*) diferencia significativa en la proporción de S. aureus no depurado ($P < 0.001$, test de suma de rangos).

Los recuentos obtenidos de las suspensiones sembradas a tiempo cero indicaron que los animales recibieron 2.3×10^4 UFC en

pulmón. La depuración de S. aureus del pulmón murino experimentó una caída significativa ($P < 0.001$, test de suma de rangos Wilcoxon) a las cuatro horas del aerosol bacteriano. El porcentaje de bacteria remanente en pulmón murino a las cuatro horas del desafío bacteriano fue de 33%.

3.34. ESTUDIOS DE DESAFIO MIXTO CON P. aeruginosa Y S. aureus.

Con el objeto de determinar si existía interferencia de un microorganismo gram-negativo sobre la exacerbación de los mecanismos de defensa contra un microorganismo gram-positivo y viceversa, se inmunizaron ratones de la cepa Swiss con mutantes ts de P. aeruginosa o de S. aureus. Se realizaron dos experimentos por separado, utilizando un plan de trabajo similar. Este plan consistió en tres inmunizaciones i.n. del mutante ts E/9/9 de P. aeruginosa o del mutante ts 17 de S. aureus (1×10^7 UFC), por animal, espaciadas entre sí por siete días. Veintiún días después de la primera inoculación con cada microorganismo, se realizó un desafío por aerosol con una suspensión mezcla que contenía P. aeruginosa y S. aureus. En el primer experimento, la relación P. aeruginosa/ S. aureus del aerosol desafiante fue de 1:1; mientras que en el segundo experimento, esta relación fue de 4:1.

Inmediatamente luego de la aerosolización y a las cuatro horas de la misma, se sacrificaron grupos de animales (6 ratones por grupo), se les extrajeron los pulmones y se realizaron homo-

genatos en agua destilada estéril. Posteriormente se realizaron cultivos cuantitativos de los homogenatos y se determinó el número total de UFC de P. aeruginosa y de S. aureus presentes. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 35 y 36.

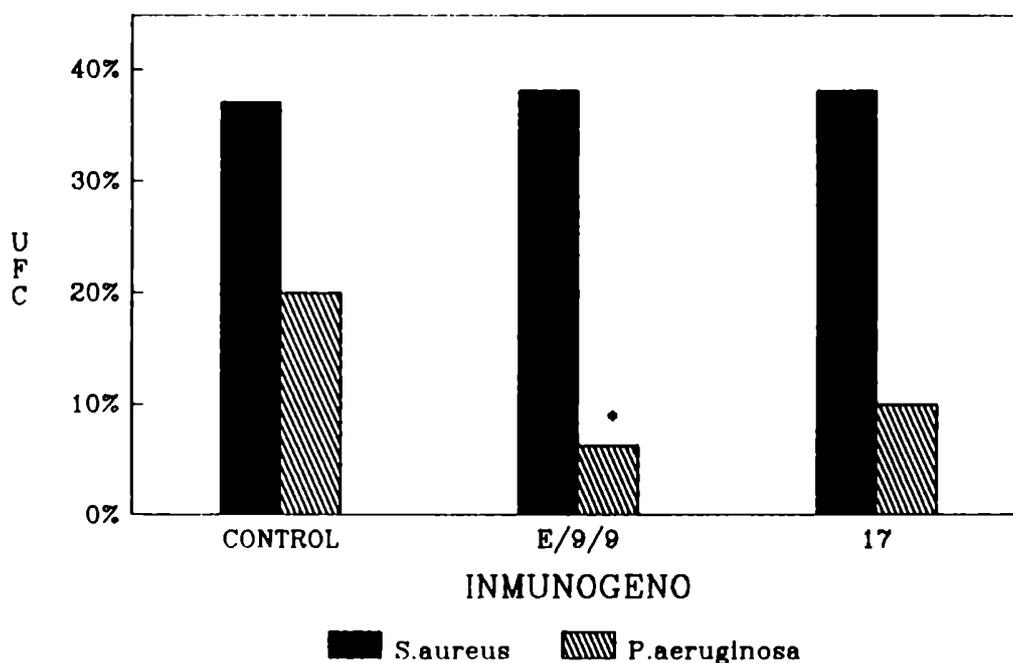


Figura 35. Desafío mixto con P. aeruginosa y S. aureus en proporción 1:1. Cada barra representa el porcentaje de la proporción de bacteria remanente en pulmón a las 4 horas del aerosol bacteriano. (*), diferencia significativa en el porcentaje de P. aeruginosa remanente a las 4 horas respecto al control ($P < 0.05$, test de suma de rangos).

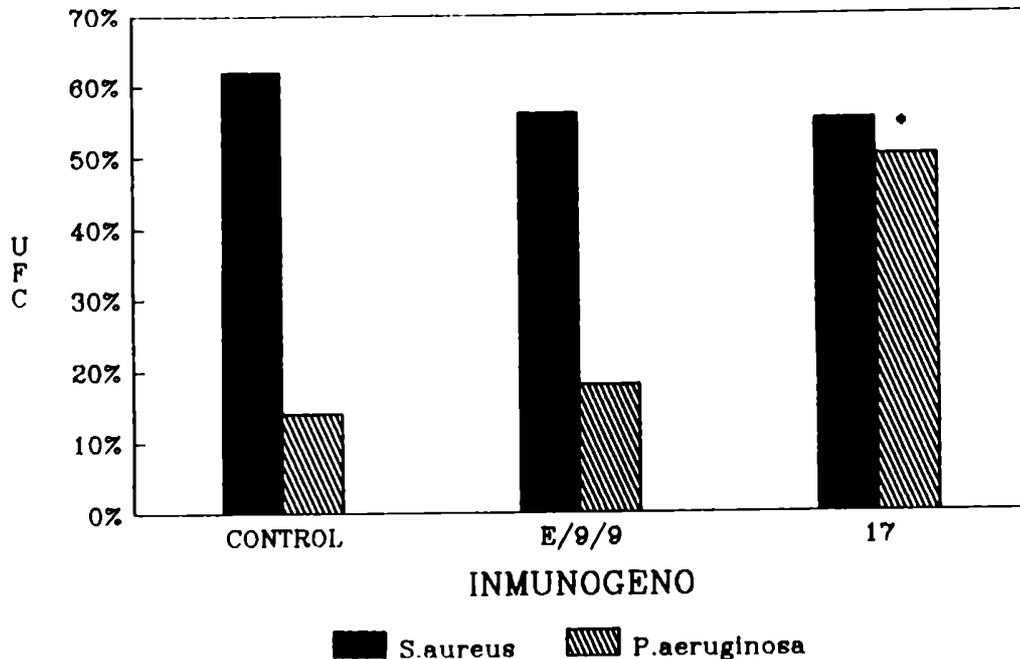


Figura 36. Desafío mixto con P. aeruginosa y S. aureus en proporción 4:1. Cada barra representa el porcentaje de la proporción de bacteria remanente en pulmón a las 4 horas del aerosol bacteriano. (*), diferencia significativa en el porcentaje de P. aeruginosa remanente a las 4 horas respecto al control y a los animales inmunizados con E/9/9 ($P < 0.05$, test de suma de rangos).

En ambos experimentos pudo observarse que el patrón de depuración de S. aureus fue similar, permaneciendo constante en animales inmunizados con uno u otro mutante ts y en animales control. En el caso de P. aeruginosa pudo observarse que, en el caso en que el aerosol desafiante contenía la misma proporción de este microorganismo que de S. aureus, la depuración se vió aumentada en animales inmunizados con los mutantes ts. Cuando el ae-

rosol desafiante contenía más Pseudomonas que Staphylococcus, la depuración en animales inmunizados con el mutante ts E/9/9 no mostró diferencias significativas respecto al control, mientras que la depuración en animales inmunizados con el mutante ts 17 resultó significativamente menor que en los otros dos grupos de analizados.

Cuando la proporción de P. aeruginosa: S. aureus aerosolizada fue de 1:1, pudo observarse que la proporción de Staphylococcus remanente en los pulmones de ratones inmunizados con mutantes ts y de animales control, resultó similar a la proporción de bacteria remanente cuando se aerosolizó S. aureus únicamente (37% versus 33%). Este resultado indicaría que la presencia de P. aeruginosa en baja proporción no alteraría la depuración pulmonar de S. aureus, aún en animales inmunizados. En el caso del segundo experimento, donde la proporción de P. aeruginosa: S. aureus fue de 4:1, la proporción de S. aureus remanente en los pulmones de los animales, resultó significativamente mayor que en el caso de la depuración de S. aureus únicamente (58% versus 33%). En este caso, aparentemente, la presencia de P. aeruginosa estaría afectando significativamente la depuración de S. aureus del pulmón murino.

De ambos experimentos se concluye que la presencia y cantidad de P. aeruginosa parecería influir en la depuración pulmonar de este microorganismo durante un desafío mixto con S. aureus.

4. DISCUSSION

4.1. DISCUSION

Las infecciones respiratorias agudas constituyen una de las principales causas de mortalidad infantil, y causan la muerte de 4,5 millones de niños cada año, con máxima incidencia en países en vías de desarrollo y subdesarrollados. Los responsables de estas muertes son tanto patógenos virales como bacterianos. Los neonatos y los niños hospitalizados constituyen los dos grupos con mayor riesgo. En los infantes, las infecciones ocurren con mayor frecuencia, tienden a ser más severas y a durar más tiempo. Además de las infecciones que aparecen en estos grupos infantiles, existen otras no menos graves asociadas a niños con al menos una condición predisponente, como por ejemplo fibrosis quística, anomalías congénitas de varias clases, especialmente cardíacas y pulmonares, inmunodeficiencias congénitas y enfermedades malignas, entre otras (37).

Datos epidemiológicos revelan que S. pneumoniae y Haemophilus influenzae son los agentes etiológicos más comunes en niños con neumonía típica (38). En los huéspedes con compromiso de sus defensas pulmonares se observa una alta incidencia de bacilos gram-negativos, especialmente P. aeruginosa y enterobacterias. La frecuencia relativa de las infecciones respiratorias nosocomiales representan un 16%, siendo P. aeruginosa, S. aureus y Klebsiella sp. las especies más frecuentemente aisladas (36).

En este trabajo de investigación se puso especial énfasis en el estudio de las infecciones respiratorias agudas provocadas por dos microorganismos en particular: P. aeruginosa y S. pneumoniae, con el fin último de contribuir al logro de métodos inmunoprofilácticos apropiados para el tratamiento del grave problema que representan las neumonías bacterianas en países aún no desarrollados.

La eficacia de la vacunación para prevenir la infección por P. aeruginosa ha sido probada en diferentes modelos animales, así como también en seres humanos, con diferente grado de éxito (70). Basados en los conocimientos actuales sobre la patogénesis de las infecciones por este microorganismo, no ha podido establecerse con certeza aún qué antígeno o combinación de ellos es capaz de proveer la mayor protección contra esta bacteria. Por este motivo, la conservación de la mayor cantidad de antígenos bacterianos en la composición de una vacuna podría ser fundamental para promover una respuesta favorable del huésped contra las infecciones por P. aeruginosa. Así, entre los inmunógenos probados, nosotros hemos utilizado cepas de P. aeruginosa que contienen una única mutación ts como prototipos de una vacuna viva atenuada (77-79, 98,99). Una vacuna a germen vivo contiene todas las determinantes antigénicas del patógeno, resultando por lo tanto un candidato promisorio para ser utilizado en la prevención de las infecciones contra P. aeruginosa. Vale la pena recordar el axioma que asegura que la infección natural confiere la mejor protección en

comparación con cualquier otro inmunógeno.

Aunque existen varias vacunas que llegaron a ser patentadas, no existe hasta el presente ningún producto de probada utilidad práctica para prevenir las infecciones por P. aeruginosa. Respecto a las vacunas actualmente disponibles, varias son las desventajas que éstas presentan. Puede por ejemplo citarse las reacciones adversas que ocasiona, producto de su reactogenicidad, la preparación a base de lipopolisacárido bacteriano (Pseudogen): estados febriles, induraciones en el sitio de la inoculación, dolor, malestares generales, etc., son algunos de los síntomas más frecuentes que presentan los individuos vacunados (70). Otro de los problemas asociados a las vacunas disponibles es que no brindan una protección duradera, o no brindan niveles reproducibles de protección. Los pacientes cancerosos, por ejemplo, resultan ser los más sensibles a la vacunación. Mientras algunas de estas vacunas producen un aumento de la sobrevida y reducen la incidencia de septicemia en los individuos vacunados, otras no disminuyen significativamente la incidencia de infección ni ofrecen protección contra la infección bacteriémica. En cualquiera de los casos no existen conclusiones firmes respecto a la utilidad de ninguna de estas vacunas (70).

Un punto importante para discutir es la causa de la elección de la inmunización local para la construcción de la vacuna a germen vivo. Varios fueron los ensayos ya realizados con el método

de inmunización sistémica y muy poco alentadores los resultados obtenidos, principalmente a causa de la corta duración de la inmunidad que confiere. Dunn y Kamp estudiaron la depuración pulmonar de la cepa salvaje de P. aeruginosa luego de haber realizado inmunización sistémica con el microorganismo muerto. Se utilizaron en el trabajo ratones normales y ratones granulocitopénicos. Los resultados mostraron que si bien existía un aumento significativo en la depuración pulmonar en huéspedes normales, la inmunización sistémica no ofrecía beneficio alguno a huéspedes granulocitopénicos (100). Algo semejante ocurrió con los pacientes con fibrosis quística, en donde además se observaron un número de reacciones adversas luego de la inmunización sistémica (101). Más aún, existe evidencia indirecta que la inmunización sistémica puede ser netamente perjudicial pues favorece la formación de inmunocomplejos, cuyo depósito en pulmón agravaría la enfermedad respiratoria, lo que podría llegar a producir la muerte del paciente (102).

Pennington y Kuchmy sugirieron que la inmunización sistémica es suficiente para proveer opsoninas locales adecuadas contra P. aeruginosa durante la neumonía aguda (103). Como los autores muestran, esto ocurre siempre y cuando se establezca un fenómeno inflamatorio pulmonar que desencadene el pasaje de opsoninas de circulación a las vías aéreas. El criterio de estos autores es brindar defensas una vez que comenzó la invasión por P. aeruginosa del tracto respiratorio. Este criterio no es compartido por

nuestro grupo de investigación, como discutiremos más adelante.

La inmunización local pulmonar, inducida con una gran variedad de antígenos en humanos normales y en animales, mostró excelentes respuestas de Ac en las secreciones respiratorias. La respuesta inmune, evaluada en estas secreciones luego de la inmunización local, a menudo es superior a la respuesta concomitante en suero, y la inmunización sistémica es a menudo menos eficiente en la producción de una respuesta de Ac en secreciones pulmonares (104). La estimulación de las defensas locales contra patógenos respiratorios y entéricos por el agente vivo, ya sea a través de infección natural o a través de inmunización con una cepa atenuada, ha sido reconocido como el más efectivo inductor de inmunidad duradera (105). Esta hipótesis de trabajo se ve corroborada por los recientes adelantos en el desarrollo de vacunas para enfermedades entéricas como el cólera (106).

La potencialidad de los mutantes ts bacterianos ha sido ampliamente investigada y la eficacia de tales cepas para inducir protección contra el desafío por la cepa virulenta ha sido establecida. Las cepas ts ofrecen varias ventajas específicas sobre otras cepas atenuadas, ya sea por medios genéticos o fisicoquímicos. En primer lugar, los mutantes ts con lesiones en genes que codifican para productos esenciales no pueden crecer a la temperatura restrictiva en ningún ambiente nutricional pues no tienen manera de corregir el defecto de la mutación. En segundo lugar,

los antígenos de superficie permanecen intactos y la inmunogenicidad no está comprometida. Tercero, el método utilizado para aislar mutantes ts puede ser manipulado para producir cepas que replican hasta un grado limitado (mutantes de replicación limitada) en la vacuna, reproduciendo de esta manera los estadios iniciales de la infección natural y prolongando la estimulación del sistema inmune.

Un problema potencial, inherente a la cepas bacterianas ts es la posibilidad de reversión, es decir, el peligro de aparición de un número significativamente alto de organismos virulentos (revertantes), que pongan en riesgo la utilización de estos mutantes en humanos. El problema de la inestabilidad genética puede ser superado mediante una combinación en una cepa de dos o más mutaciones de idéntico fenotipo, produciendo de esta manera, una reducción de la frecuencia de reversión hasta niveles no significativos (10^{-21}) (78). Es decir, que estos mutantes ts pueden denominarse "verdaderos", diferenciándose claramente de aquellos mutantes auxotróficos a determinadas temperaturas.

Los estudios de permanencia nasofaríngea, tanto de la cepa salvaje de P. aeruginosa como de las cepas mutantes D/1/8 y E/9/9, indicaron que, en ambos casos, ésta no superaba los 14 días. Más aún, los mutantes ts permanecieron sólo 7 días en dicha cavidad, no hallándose diferencias significativas entre mutantes de los dos fenotipos estudiados. Este corto lapso de

permanencia del microorganismo en la cavidad de inoculación permite asegurar que los mutantes ts no producen infección local en la zona. Tampoco se observaron signos clínicos compatibles con algún tipo de infección en los animales de experimentación. Es decir, se demostró que la permanencia de los mutantes ts en los canales aéreos superiores es transitoria, sin signos de enfermedad o peligro tanto en ratones normales como en granulocitopénicos. Esto es de gran importancia pues si un mutante ts de P. aeruginosa va a ser utilizado como vacuna viva, podría requerirse que la colonización en huéspedes normales fuese limitada. Más aún, si la granulocitopenia se desarrollara antes que los mutantes ts administrados como vacuna sean depurados, éstos serían eventualmente eliminados.

Asimismo, la permanencia de los mutantes ts en el tracto gastrointestinal también resultó transitoria. El hecho que los mutantes ts hallan sido encontrados en heces demuestra que una parte del inóculo administrado por ruta i.n. fue deglutido por los animales y alcanzó el tracto gastrointestinal bajo. Así, la inmunización i.n. estimularía no sólo la inmunidad respiratoria local sino que podría a su vez impactar el tejido linfoide asociado a intestino (GALT). Aún debe ser dilucidado hasta qué punto la estimulación del GALT con mutantes ts de P. aeruginosa podría conducir a protección contra el desafío intrapulmonar con la cepa virulenta, pero la inmunización oral de ratones normales con los mismos mutantes ts produce un aumento de la depuración de la

cepa virulenta de pulmón (21).

Teniendo en cuenta el tiempo de permanencia intranasofaríngea, se diseñaron los planes de inmunización. Se compararon tres planes de inmunización para determinar cuál era el más efectivo para ser posteriormente utilizado en experimentos de inmunización. Así, se repitió la inoculación i.n. a fin de asegurar niveles de protección significativos. Este plan de inmunización fue utilizado en un estudio anterior, y se demostró que puede inducir un aumento de los mecanismos de defensa pulmonar en animales normocíticos (81).

Mediante el estudio del tiempo de permanencia esplénica de los mutantes D/1/8 y E/9/9 en huéspedes predispuestos a las infecciones por P. aeruginosa, pudo comprobarse que no existe riesgo aparente de infección pues no se encontraron diferencias significativas respecto a los huéspedes normales. Para asegurar la inocuidad de los mutantes ts se realizaron inoculaciones de grandes dosis i.p. de ambos mutantes ts a ratones tratados con ciclofosfamida y controles. Los resultados demostraron que la permanencia de D/1/8 y E/9/9 en bazo es de corta duración aún en huéspedes predispuestos, con lo que se demuestra que las mutaciones en estudio no son auxotróficas, sino que se trata de mutaciones ts verdaderas. En ambos casos ensayados, la supervivencia resultó del 100%, confirmando la anterior afirmación que no se producirían microorganismos revertantes a partir de los mutantes ts.

Como se discutió anteriormente, el plan de inmunización i.n. con los mutantes D/1/8 y E/9/9 se estableció en base al tiempo de permanencia intranasofaríngea previamente determinado. Por esta causa, en los ensayos de protección, los animales recibieron tres inóculos de los mutantes ts previos al desafío con la cepa salvaje de P. aeruginosa. Este experimento de protección inducida por inmunización i.n. con los mutantes, permitió observar que el mutante de replicación limitada (E/9/9), confirió mayor protección que el mutante no replicante (D/1/8), aún a las dosis de inmunización más bajas.

La verdadera causa de la potencialidad protectora de los mutantes de distinto fenotipo en estudio no está íntegramente conocida. El leve incremento en el número de UFC del mutante ts E/9/9 recuperadas luego de vacunación i.n. no explica la significativamente superior protección inducida por este mutante de replicación limitada respecto a la protección inducida por D/1/8, el mutante que no se replica in vivo. Sin embargo, se cree que la ventaja del mutante de replicación limitada sobre el mutante no replicante en la inducción de protección podría residir en la habilidad del primero para replicarse limitadamente in vivo (78, 107), permitiendo de esta manera la expresión de determinantes antigénicos solamente sintetizados durante el crecimiento en ese ambiente, aunque no pueden descartarse otras posibles explicaciones.

Por ejemplo, aún no se sabe si alguno de los mutantes o ambos producen cantidades equivalentes de factores de virulencia importantes en la patogénesis de la cepa virulenta. Más aún, no se conoce si estos mutantes *ts* producen alguno de los factores de virulencia a la temperatura no permisiva, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Además, en principio, E/9/9 tiene la capacidad de replicarse por aproximadamente 5 generaciones luego de la transferencia a la temperatura no permisiva (*in vitro*) o a la temperatura corporal del ratón (*in vivo*) (98). De esta forma, la mayor protección conferida por E/9/9, podría estar dada por el simple hecho que habrá un mayor número de microorganismos del fenotipo "replicante limitado" que del "no replicante". Así, sería un efecto semejante al que se lograría simplemente inoculando una dosis mayor del microorganismo. Esta explicación habla de los aspectos cuantitativos de los antígenos de superficie. Los resultados del ensayo de protección por inmunización con D/1/8 o con E/9/9 corroboran los trabajos previos de Morris Hooke y col. (98), quien demostró que E/9/9 induce mejor inmunidad que el fenotipo no replicante (D/1/8). El mutante *ts* de replicación limitada indujo la formación de niveles significativamente más altos de Ac séricos en comparación con el mutante no replicante (98).

Aquellos animales que en el experimento de protección inducida no resultaron protegidos, murieron por neumonía causada por *P. aeruginosa*, como pudo verificarse al examinar sus pulmo-

nes, los cuales mostraban lesiones hemorrágicas confluyentes en la mayor parte de la superficie pulmonar. Si bien el mutante E/9/9 confirió protección a las dosis baja y media, se observó que con la dosis mayor (10^8 UFC) los animales no resultaban protegidos (mortalidad del 75%). Esta disminución en la protección inducida por altas dosis podría estar reflejando la generación de un mecanismo de inflamación localizada que, por sus características agudas, haya conducido a la muerte de los animales. A este respecto debe hacerse referencia a varios hechos. El primero es que un fenómeno semejante se observó luego de la inmunización i.p. y posterior desafío por la misma vía con E/9/9 (77). Los autores sugirieron que podría deberse a un fenómeno semejante a una reacción de Schwartzman, aunque no profundizaron en una explicación de su mecanismo. Otro hecho importante es que antígenos de *P. aeruginosa* pueden inducir un fenómeno de Arthus en el ratón (108), es decir, daño de tejido mediado por acumulación de inmunocomplejos. Por último, existen evidencias que en el hombre, pueden producirse enfermedades pulmonares con marcado daño de tejido a través de una reacción de Arthus. Los pacientes que presentan niveles séricos elevados de Ac contra Aspergillus o contra los mohos usados para la producción de quesos, sufren lesiones pulmonares graves localizadas del tipo de Arthus, luego de la inhalación de estos hongos o sus esporas. Las alteraciones producidas en un fenómeno de Arthus se manifiestan como inflamación local y eritema, produciéndose luego hemorragias puntiformes. Macro y microscópicamente la reacción de Arthus se asemeja

a la reacción de Schwartzman, en la cual las lesiones inflamatorias hemorrágicas y necróticas son provocadas por endotoxinas de bacterias gram-negativas (109).

En los experimentos descritos en este trabajo, no pueden ser ignoradas dos posibles causas respecto al agravamiento de la enfermedad pulmonar luego del desafío por aerosol. Una de ellas es el desarrollo de daño pulmonar ocasionado por ciclofosfamida (110). La inducción de daño a los pulmones ya injuriados por ciclofosfamida por por parte de la cepa salvaje de P. aeruginosa, podría favorecer la mortalidad en ratones inmunizados con altas dosis de E/9/9. Otra posibilidad es que cantidades significativas de IgG "local" estuvieran presentes en los pulmones de ratones inmunizados i.n. con altas dosis de mutantes ts. El desafío por aerosol con altas dosis de P. aeruginosa virulenta podría atraer en los pulmones en forma conjunta cantidades considerables de anticuerpo y antígeno, disparando una reacción local tipo III. Sin embargo, la contribución, de existir, de estos dos mecanismos a la incrementada mortalidad observada a muy altas dosis inmunizantes en este modelo murino, permanece indeterminada.

La vacunación i.n. con ambos mutantes ts de P. aeruginosa confirió una protección significativamente superior a la otorgada por inmunización i.p.. En trabajos previos realizados por otros autores, se demostró que la inmunización sistémica aumentaba la depuración pulmonar de P. aeruginosa en ratones desafiados por

instilación transtraqueal. La inactivación mediada por anticuerpos de los microorganismos en los pulmones de estos ratones requiere una reacción local inflamatoria, permitiendo a la IgG circulante alcanzar los canales aéreos inferiores. Los microorganismos encontrarían muy pocos impedimentos para crecer sobre la superficie del epitelio respiratorio si los anticuerpos no estuvieran presentes en las secreciones pulmonares. De hecho, la inmunización sistémica no altera la depuración pulmonar de P. aeruginosa administrada en pequeña cantidad, lo cual induce sólo una respuesta inflamatoria suave (79,86). Más aún, los anticuerpos circulantes no resultarían efectivos hasta después que la infección hubiese progresado. Recientemente, Johansen y Hoiby, realizaron experimentos inmunizando ratas intratraquealmente con P. aeruginosa sonicada para inducir una alta respuesta de anticuerpos sistémicos y locales. Los resultados obtenidos por estos autores mostraron altos niveles de IgA en saliva, detectando sólo trazas de IgG, mientras que en suero los resultados fueron los opuestos: altos niveles de IgG y trazas de IgA (111).

Nuestra hipótesis es que los anticuerpos anti-P. aeruginosa producidos luego de inmunización local pero no luego de inmunización parenteral, en el tracto respiratorio, neutralizarían las relativamente pocas P. aeruginosa que pudieran ganar acceso a los canales aéreos inferiores luego de exposición natural, previniendo de esta forma la colonización. Grandes dosis de P. aeruginosa o el crecimiento de un pequeño inóculo inducirían inflamación y

atraerían anticuerpos circulantes a los canales aéreos inferiores, pero esto significaría que la infección ya ha comenzado en el huésped comprometido, una situación que podría prevenirse por inmunización local. Una vez que llegan al pulmón de un individuo con una situación predisponente un número de P. aeruginosa capaz de desencadenar una respuesta inflamatoria, perdería sentido el valor de la inmunización sistémica. En este estadio de la infección sería más conveniente, por ejemplo, inmunizar pasivamente al huésped (112,113). La prevención de la colonización respiratoria por vacunación local podría beneficiar grandemente a los pacientes con fibrosis quística, que aún no están colonizados con este microorganismo. Mediante inmunización local por aerosolización puede producirse un aumento de los mecanismos específicos de defensa pulmonar contra P. aeruginosa (79).

En estudios previos se demostró que la inmunización i.n. con mutantes ts de P. aeruginosa induce un aumento de la depuración de la cepa salvaje virulenta de los pulmones de ratones normales (98,114). Con los resultados expuestos anteriormente en este trabajo se ha demostrado que la inmunización local con los mutantes ts de P. aeruginosa aumenta la protección contra la infección con la cepa salvaje en ratones granulocitopénicos. Se realizaron experimentos para proveer información respecto a la importancia relativa de los anticuerpos locales y sistémicos en la protección inducida por administración de mutantes ts a ratones a través de diferentes rutas.

Las inmunoglobulinas A y G son importantes constituyentes del fluido subyacente del tracto respiratorio inferior, mientras que la IgM, si es detectada, está presente en baja proporción. Como se ha descrito anteriormente, la inmunoglobulina A es producida in situ por las células residentes del sistema inmune local en respuesta a estimulación local, aunque existe evidencia que la inducción de la inmunidad de mucosas puede ocurrir luego de estimulación de otros tejidos mucosos distantes (8,20,21,115, 116) o en la vecindad de tejido mucoso (42). La IgG en las secreciones del tracto respiratorio inferior puede provenir de dos fuentes potenciales: i) transudación desde plasma a través de la interfase sangre-aire (117), y ii) síntesis local por células plasmáticas intrínsecas al pulmón, localizadas en o debajo de la submucosa, o de linfocitos libres en la luz de los canales aéreos (118). Aunque la mayoría de la IgG hallada en el fluido de lavados broncoalveolares de humanos normales probablemente se origina en suero, otros estudios indican que la IgG sérica no se movería dentro del fluido pulmonar subyacente en cantidades apreciables a menos que ocurriera una reacción inflamatoria (8). La presencia de células secretoras de IgG en lavados bronquialveolares (96) y nuestros resultados con células secretoras de IgG anti-P. aeruginosa en nódulos linfáticos locales confirma, sin embargo, que una proporción de IgG es sintetizada localmente en el pulmón. Esta hipótesis es reforzada por el hallazgo que la inmunización intra-traqueal con antígenos timo-independientes induce la aparición de células formadoras de placas en el pulmón y en nódulos linfáticos

hiliares, y que la inflamación tal como la inducida por las condiciones de nuestros experimentos (86), aumenta la inducción de estas células formadoras de anticuerpos (119).

Las contribuciones de IgG e IgA en las secreciones del tracto respiratorio a la defensa del pulmón probablemente varíe de acuerdo al patógeno encontrado en el área. La inmunoglobulina A, por ejemplo, puede ser importante en la prevención de la adherencia de virus y bacterias a células epiteliales, mientras que la IgG es más probable que esté involucrada en opsonización y, en menor grado, la lisis mediada por complemento. Ambas inmunoglobulinas podrían ser responsables de la neutralización de toxinas producidas por varios patógenos bacterianos y la inactivación de otros factores de virulencia tales como flagelos. Estudios sobre los mecanismos para la depuración pulmonar de P. aeruginosa han provisto evidencia sobre la importancia de la opsonofagocitosis que involucra leucocitos polimorfonucleares (PMN) e IgG (120, 121). Poco es sabido respecto a la contribución de la IgA a la protección contra la infección pulmonar por P. aeruginosa, sin embargo, los resultados ántes expuestos mostraron que la protección puede ser inducida en ratones granulocitopénicos y estudios previos indicaron que la depuración pulmonar de P. aeruginosa puede ser mantenida en ratones C5-deficientes (81). Estos resultados podrían sugerir la participación de otros mecanismos diferentes a aquellos mediados por IgG. El hecho que la IgA-S juega un rol protectorio contra la infección bacteriana es indiscutido.

Además de prevenir la adherencia de microorganismos a células epiteliales, la IgA puede también participar en los mecanismos de defensa de la mucosa pulmonar mediante una transformación de linfocitos y células fagocíticas en células citotóxicas específicas contra bacterias (122). Los mecanismos involucrados en la protección mediada por IgA, sin embargo, permanecen muy poco conocidos y necesitan una más intensa investigación.

Los ratones inmunizados por ruta i.p. con los mutantes ts E/9/9 y D/1/8 respondieron con niveles significativos de IgG anti-P. aeruginosa tanto en suero como en secreciones del tracto respiratorio inferior; ratones inmunizados en forma similar, en experimentos previos, sucumbieron al desafío por aerosol con la cepa salvaje virulenta. En contraste, los ratones inmunizados intranasalmente con los mutantes ts resultaron protegidos del desafío, y estos animales tenían, además de IgG respiratoria local, niveles significativos de IgA-S. La posibilidad que la IgG, ya sea producida localmente o importada por transudación, pudiera contribuir a la eliminación de P. aeruginosa del tracto respiratorio no puede ser ignorada, pero el hecho que los ratones inmunizados por ruta i.p., con altos niveles tanto de IgG sérica como respiratoria, no son protegidos, podría sugerir que esta IgG es insuficiente o bien menos eficiente que la IgA inducida por inmunización i.n. La IgA podría funcionar previniendo la adherencia de los organismos al epitelio respiratorio, permitiendo la opsonización por IgG y la depuración subsecuente por los macrófa-

gos alveolares residentes, o bien esta inmunoglobulina podría armar linfocitos y macrófagos alveolares, volviéndolos citotóxicos contra el microorganismo. El mecanismo preciso a través del cual la inmunoglobulina A puede producir el aumento de las defensas pulmonares contra P. aeruginosa luego de inmunización local, sin embargo, debe aún ser dilucidado.

Los experimentos discutidos anteriormente se llevaron a cabo con ratones de la cepa Swiss adultos (ocho semanas de vida). Está bien establecida la susceptibilidad existente a ciertas infecciones bacterianas en dependencia con la edad, y se ha sugerido que el principal determinante en el establecimiento de estas infecciones es una respuesta inflamatoria inmadura (97). Asimismo, se sabe que la principal causa de mortalidad infantil en recién nacidos y en infantes prematuros es la infección bacteriana (123). Estudios realizados en humanos recién nacidos han mostrado que los leucocitos PMNs tienen una expresión reducida de receptores C3bi en su superficie (124) y exhiben una quimiotaxis disminuída (125), la cual permanece marcadamente deprimida hasta los dos años de edad (126). Más aún, la quimiotaxis de los PMNs aumenta pero permanece significativamente más baja que en adultos hasta los 16 años, sugiriendo que la maduración de la movilidad de los PMNs es un proceso de larga duración. Estudios realizados en ratón han demostrado que la depuración bacteriana del pulmón infectado 12 y 24 horas después del nacimiento se ve severamente reducida, y que la migración de los PMNs a los canales aéreos se

halla dificultada (127). Además, los altos porcentajes de infección observados en infantes prematuros y niños recién nacidos, podrían ciertamente estar relacionados con la migración dificultada de PMNs. Sin embargo, no se sabe en qué momento del desarrollo la depuración bacteriana del pulmón humano o animal, alcanza el nivel normal. Por este motivo, se realizaron experimentos en un modelo murino para determinar por cuánto tiempo la depuración bacteriana permanecía reducida. Se utilizó P. aeruginosa como organismo infectante, ya que se sabe que la depuración de esta bacteria del huésped es altamente dependiente del número y función de los PMNs (45).

Los resultados obtenidos mostraron que la proporción de P. aeruginosa no depurada de pulmón de ratones Swiss de 10 días de edad fue significativamente superior a la de animales de 35 días. Al mismo tiempo se observó que la migración de PMNs a las vías aéreas de animales de 10 días estaba significativamente disminuida en comparación con la de ratones de 35 días. Se encontraron diferencias significativas similares en la proporción de P. aeruginosa no depurada y en el número de PMNs presentes en pulmón de ratones de 20 días respecto a animales de 35 días. Estos resultados fueron obtenidos con ratones de la cepa Swiss C5- suficientes. Resultados similares fueron obtenidos utilizando ratones C5-deficientes de la cepa DBA/2, de 20 y 35 días de edad (128).

Aproximadamente el 40% del inóculo de P. aeruginosa fue depurado de los pulmones de ratones de 35 días. En ratones DBA/2 C5-deficientes, de la misma edad, la depuración fue menor: el número de organismos encontrados 4 horas después del desafío no difirió del número presente en el inóculo inicial, transformando la depuración bacteriana en cero, probablemente debido al bajo número de PMNs encontrado en los lavados pulmonares de ratones C5-deficientes (128). Tales diferencias entre ratones C5-suficientes y C5-deficientes también fueron observadas en animales de 20 días de edad. Sin embargo, la dependencia con la edad de la proporción de P. aeruginosa no depurada fue significativa en ambas cepas de ratones. Estos resultados muestran que la depuración pulmonar de P. aeruginosa y la migración de PMNs permanecen alteradas hasta los 20 días posteriores al nacimiento. No se hallaron diferencias significativas entre ratones de 35 días y adultos, ni en la depuración pulmonar ni en la migración de PMNs (128).

Para estimar el número total de PMNs en pulmón se midió la actividad de MPO en los sobrenadantes de los homogenatos de pulmón. En los animales no desafiados, la actividad de esta enzima fue menor que 1.0 U/g de tejido pulmonar. Luego del desafío por aerosol con P. aeruginosa, la actividad de MPO se incrementó significativamente en los pulmones de ratones de 35 días de edad, pero permaneció inalterada en animales de 20 días. Estos resultados mostraron nuevamente que la migración pulmonar de PMNs en

ratones de 20 días estaba significativamente disminuída. Los resultados obtenidos al medir el número de PMNs en muestras de sangre periférica de ratones de 10, 20 y 35 días mostraron que el número total de PMNs era significativamente menor en animales de 10 días respecto a los de 35 días. Sin embargo, no se hallaron diferencias en el número de PMNs circulantes en ratones de 20 y 35 días. Los bajos numeros de PMNs circulantes podrían haber contribuido a limitar el número de PMNs presente en los líquidos de lavado pulmonar de ratones de 10 días pero no en animales de 20 días de edad.

Los resultados obtenidos permitieron concluir que la depuración pulmonar de P. aeruginosa en respuesta a un aerosol desafiante, resultó menor en ratones de 10 y 20 días de edad y que esta deficiencia estaba acompañada por una disminución en la migración de PMNs a las vías respiratorias bajas. Asimismo, se observó que la respuesta quimiotáctica de PMNs al oligopéptido sintético N-formyl-methionyl-leucyl-phenyalanine (FMLP) estaba disminuída en animales de 20 días de edad, y se ha relacionado este hecho con una respuesta dependiente de la edad (128).

Gran parte de nuestro conocimiento sobre la patogénesis de la infección pulmonar humana por P. aeruginosa ha provenído de datos experimentales obtenidos a partir de una gran variedad de modelos animales (129). Este microorganismo no causa neumonía en roedores a menos que exista una condición predisponente. Como se

ha demostrado en los experimentos realizados en este trabajo, la falla en la depuración de P. aeruginosa dentro de las 4 horas posteriores al desafío por aerosol, no es suficiente para permitir una franca infección en ratones jóvenes, probablemente debido a que las funciones de los PMNs, aunque significativamente disminuidas, no están suprimidas en animales sanos. Como la ontogenia de las defensas pulmonares antibacterianas podrían seguramente diferir en duración entre humanos y roedores, es bastante difícil establecer una comparación directa entre ellos. Se sabe que la respuesta inmune humana contra antígenos polisacarídicos no madura completamente hasta los dos años de edad, mientras que la respuesta inmune de ratón ya está completamente madura a las ocho semanas de vida (130). Como los experimentos que se describen en este trabajo fueron realizados en un modelo animal, se requieren más estudios en humanos para poder asegurar la duración de la afección madurativa encontrada en las defensas pulmonares infantiles contra las infecciones bacterianas.

Como se mencionó anteriormente, el principal objetivo de este trabajo de investigación fue desarrollar métodos que contribuyan a la prevención y tratamiento del grave problema que representan las neumonías bacterianas. Las infecciones del tracto respiratorio bajo, comunmente clasificadas como bronquitis o neumonía, están asociadas con una extremadamente alta morbilidad en la comunidad, así como con una alta mortalidad en aquellos pacientes que requieren hospitalización. Por tal motivo, estas

infecciones resultan una gran carga, tanto económicamente como en el uso de los servicios de salud (131). Asimismo, se sabe que las infecciones bacterianas constituyen una complicación bien establecida del síndrome de inmunodeficiencia humano (SIDA). Los mecanismos de defensa comprometidos del huésped, incluyendo la pérdida de la integridad de mucosas, defectos en la inmunidad humoral y celular y anormalidades cuali o cuantitativas de los leucocitos, pueden predisponer a pacientes infectados con el virus HIV a infecciones por P. aeruginosa (132). El Centro para el Control de Enfermedades (CDC, Atlanta, EEUU) ha recomendado que, debido a una susceptibilidad altamente incrementada a la infección por S. pneumoniae, todas las personas infectadas con el virus HIV reciban la vacuna anti-neumocócica existente en el mercado (133).

Tomando como base los resultados anteriormente discutidos con mutantes ts de P. aeruginosa y con la información obtenida respecto a la importancia relativa de los anticuerpos locales y sistémicos en la protección inducida por inmunización de ratones, decidimos ampliar nuestro estudio a infecciones respiratorias causadas por microorganismos gram-positivos.

Se ha establecido la eficacia de una vacuna polivalente de polisacáridos capsulares de S. pneumoniae que contiene polisacárido de 23 serotipos. Aunque la eficacia de esta vacuna contra este microorganismo en adultos sanos no se cuestiona, aún no se

han hallado vías adecuadas para inmunizar en forma efectiva a niños de menos de dos años de edad con los polisacáridos de neumococos. Los niños vacunados tuvieron una respuesta de anticuerpos pobre contra la mayoría de los serotipos de esta vacuna (66). Esto no es más que una consecuencia natural de la ontogenia del sistema inmune, que no está capacitado para responder a la inmunización con antígenos polisacarídicos antes de los dos años de edad. Por este motivo, mutantes vivos atenuados de S. pneumoniae administrados localmente podrían resultar un método alternativo para la inmunoprofilaxis de la enfermedad pediátrica por neumococos (134).

Se realizaron experimentos de mutagénesis-enriquecimiento para la obtención de mutantes ts de S. pneumoniae. Luego del aislamiento de varios mutantes ts, estas cepas fueron sometidas a evaluación inmunológica preliminar. De los experimentos de mutagénesis-enriquecimiento realizados, se obtuvieron siete mutantes ts de S. pneumoniae relativamente estables, con un rendimiento de 2.8%. Se determinó el fenotipo de cada uno de estos mutantes ts en medio sólido y en medio líquido. De estos mutantes, dos fueron clasificados como "replicantes" y cinco como mutantes "de replicación limitada".

Si bien las pruebas bioquímicas e inmunológicas realizadas a los mutantes ts y a la cepa parental de S. pneumoniae, indicaron en principio que conservaban la cápsula de polisacárido, no fue

posible obtener un modelo de infección pulmonar letal murino con la cepa de origen. En los sucesivos pasajes en medio sólido, la cepa original de S. pneumoniae parece haber perdido su cápsula, la cual no pudo ser recuperada por pasaje de la bacteria por el ratón. Debido a esto, no pudo estudiarse la capacidad de los mutantes ts de inducir protección contra un desafío con la cepa parental. Por este motivo, se decidió evaluar otros parámetros inmunológicos de estas cepas mutantes.

Se realizaron experimentos de inmunización local y sistémica con el mutante ts de menor frecuencia de reversión, J/3, y con la cepa de S. pneumoniae muerta por calor. Tanto el mutante J/3 como la cepa salvaje muerta por calor indujeron niveles detectables de IgG específica anti-S. pneumoniae en suero de animales vacunados por ruta sistémica, no detectándose diferencias entre ambos inmunógenos. Sin embargo, los niveles de IgG específicos inducidos por el mutante ts en ratones vacunados por vía i.n. resultaron superiores a los de la cepa salvaje muerta por calor. Estos resultados muestran diferencias importantes con aquellos obtenidos por Charles y Helms quienes inmunizaron hamsters con mutantes ts de S. pneumoniae. En este caso estos autores reportaron que con esas cepas ts no se indujeron anticuerpos séricos específicos vacunando a los animales por ruta i.n. (134). Asimismo, la vacunación local con J/3 indujo niveles de IgG específicos en líquido de lavado pulmonar superiores a los inducidos por la cepa salvaje muerta por calor. Sólo el mutantes ts indujo nive-

les de IgA detectables en líquido de lavado pulmonar luego de inmunización local. La vacunación sistémica indujo niveles detectables de IgG específica anti-S. pneumoniae en líquidos de lavado pulmonar en animales inmunizados con ambos inmunógenos. Estos resultados se asemejan a los obtenidos inmunizando localmente con mutantes ts de P. aeruginosa, donde, como anteriormente se describió, los ratones inmunizados intranasalmente con los mutantes ts tenían, además de IgG respiratoria local, niveles importantes de IgA-S.

Dado que una de las funciones de la IgG local es su capacidad opsonizante, y que los mecanismos efectores anti-bacterianos están constituidos preponderantemente por células fagocíticas, se determinó el rol de los fagocitos residentes y migratorios en las defensas del pulmón contra la cepa S. pneumoniae utilizada en los experimentos de mutagénesis. Normalmente, los factores mecánicos son suficientemente eficientes como para prevenir o erradicar la mayor parte de las partículas inhaladas o aspiradas. Sin embargo, cuando estas partículas penetran estas barreras mecánicas, usualmente son removidas por células fagocíticas de los canales aéreos: macrófagos alveolares y leucocitos PMNs. Los macrófagos alveolares son las células primarias residentes de los canales aéreos, mientras que la participación de los PMNs depende en gran medida de su migración hacia el pulmón (9). Se ha descrito que macrófagos y PMNs pueden tener acción sinérgica (135). Los resultados indicaron que la erradicación de nuestra cepa de S.

pneumoniae estaría controlada por macrófagos alveolares solamente, sin intervención de PMNs. Estos resultados se asemejan a los descriptos para estudios realizados con S. aureus, mientras que la erradicación de P. aeruginosa y Klebsiella pneumoniae, requiere tanto macrófagos como leucocitos PMN (83,9). La eficiencia de la función de ambos tipos de células fagocíticas está aumentada por la presencia de anticuerpos específicos contra la bacteria invasora, la cual produce una partícula opsonizante para una más eficiente fagocitosis. La actividad microbicida del macrófago es similar a la del PMN (9).

Los resultados obtenidos luego de desafío mixto con P. aeruginosa y S. aureus indicaron que la presencia y cantidad de la primera parecería influir en la depuración pulmonar de este microorganismo durante un desafío mixto, mientras que la depuración de S. aureus no se vería afectada por la presencia de P. aeruginosa, siguiendo el mismo patrón de depuración pulmonar de una infección simple por este microorganismo. S. aureus es usualmente el patógeno bacteriano inicial en los pulmones de niños con fibrosis quística. Cuando el individuo va creciendo, comienza a predominar P. aeruginosa. Aunque la terapia de antibióticos sea probablemente el principal factor que contribuya a la declinación del estafilococo, el antagonismo bacteriano podría también jugar un importante rol en el establecimiento de P. aeruginosa en los pulmones de estos pacientes. La capacidad de P. aeruginosa para antagonizar a otras bacterias fue demostrada por primera vez en

1899. Los mecanismos de inhibición del crecimiento de los estafilococos podrían deberse a una depleción de nutrientes en el medio de crecimiento mixto con P. aeruginosa, a la producción de inhibidores metabólicos específicos, o a enzimas líticas (136). En el caso de los resultados obtenidos en el modelo experimental descrito en este trabajo, probablemente, el efecto antagónico de P. aeruginosa no haya sido observado debido al corto lapso en que se llevaron a cabo los experimentos, los cuales fueron diseñados para el estudio de depuración pulmonar bacteriana temprana.

A diferencia de lo ocurrido con S. aureus, la depuración de la cepa de S. pneumoniae del pulmón murino ocurrió en un período menor a las cuatro horas. Esta rápida depuración podría estar relacionada con la pérdida de la cápsula de polisacárido, confirmando así la inocuidad de la cepa para ratón. Sin embargo, es claro que, además del control por macrófagos alveolares, otros mecanismos inmunológicos estarían involucrados en cada caso, en la depuración pulmonar de S. pneumoniae y S. aureus.

4.2.1. CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados de este trabajo permiten concluir:

a. No existen diferencias significativas en el tiempo de permanencia nasofaríngea entre los mutantes ts de P. aeruginosa de

fenotipo "no replicante" (D/1/8) y "replicante limitado" (E/9/9).

b. El tiempo de permanencia nasofaríngea de ambos mutantes ts de P. aeruginosa fue menor que el de la cepa parental de fenotipo salvaje.

c. La permanencia de los mutantes ts de P. aeruginosa en los canales aéreos superiores y en el tracto gastrointestinal inferior resultó transitoria, sin mostrar signos de enfermedad tanto en huéspedes normales como granulocitopénicos.

d. Ambas cepas ts de P. aeruginosa, a pesar de contener una única mutación, resultaron igualmente inocuas para huéspedes normales y para granulocitopénicos. El tiempo de permanencia esplénica en los individuos granulocitopénicos fue ligeramente superior que en los individuos normales.

e. La inmunización local con mutantes ts de P. aeruginosa confirió protección en una relación dosis-respuesta en un huésped granulocitopénico.

f. La inmunización con el mutante ts de P. aeruginosa de fenotipo "replicante limitado" confirió una protección significativamente mayor que la inducida por el mutante de fenotipo "no replicante".

g. La administración mutantes ts de P. aeruginosa por ruta i.p. no confirió protección significativa a huéspedes granulocitopénicos.

h. Los ratones inmunizados por ruta i.p. con mutantes ts de P. aeruginosa respondieron con niveles significativos de IgG específica anti-P. aeruginosa tanto en suero como en secreciones del tracto respiratorio inferior.

i. Los ratones inmunizados por ruta i.n. con mutantes ts de P. aeruginosa presentaron además de IgG respiratoria específica anti-P. aeruginosa, niveles importantes de IgA-S específica.

j. Los nódulos linfáticos mediastinales de ratones inmunizados localmente con el mutante ts E/9/9 de P. aeruginosa contenían células productoras de IgG anti-P. aeruginosa.

k. Se obtuvieron mutantes ts de S. pneumoniae.

l. Tanto el mutante ts de S. pneumoniae J/3 como la cepa salvaje muerta por calor indujeron niveles detectables de IgG específica anti-S. pneumoniae en suero de animales vacunados por ruta i.p. e i.n..

m. Los niveles de IgG específicos inducidos por el mutante ts de S. pneumoniae en ratones vacunados por vía i.n. resultaron su-

periores a los de la cepa salvaje muerta por calor.

n. La vacunación local con el mutante ts de S. pneumoniae J/3 indujo niveles de IgG específicos en líquido de lavado pulmonar superiores a los inducidos por la cepa salvaje muerta por calor.

ñ. Sólo el mutantes ts de S. pneumoniae indujo niveles de IgA detectables en líquido de lavado pulmonar luego de inmunización local, no así la cepa salvaje de este microorganismo muerta por calor.

o. La vacunación sistémica indujo niveles detectables de IgG específica anti-S. pneumoniae en líquidos de lavado pulmonar en animales inmunizados con ambos inmunógenos, no detectándose niveles medibles de IgA.

p. El mutante ts J/3 indujo niveles considerables de IgA en líquido de lavado pulmonar de animales inmunizados localmente, no detectándose niveles medibles de este anticuerpo luego de la inmunización sistémica con dicho mutante.

q. El mutante ts J/3 indujo niveles medibles de IgM específica anti-S. pneumoniae sólo luego de inmunización sistémica, notándose que dichos niveles fueron similares luego de dos y tres inocu- ciones bacterianas intraperitoneales.

r. La erradicación de la cepa de S. pneumoniae que se estudió estaría controlada por macrófagos alveolares solamente, sin intervención de PMNs.

s. En estudios de desafío mixto con P. aeruginosa y S. aureus la presencia y cantidad de la primera parecería influir en la depuración pulmonar de este microorganismo durante un desafío mixto, mientras que la depuración de S. aureus no se vería afectada por la presencia de P. aeruginosa, siguiendo el mismo patrón de depuración pulmonar de una infección simple por este microorganismo.

t. La depuración de la cepa de S. pneumoniae del pulmón murino ocurrió en un período menor a las cuatro horas, pudiendo quizá estar esto relacionado con la pérdida de la cápsula de polisacárido de esta cepa.

4.2.2. CONCLUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación realizado con distintos patógenos bacterianos del sistema respiratorio son promisorios respecto al desarrollo de métodos inmunoproliféricos para el tratamiento de neumonías bacterianas. Estos métodos deberán estar dirigidos a estimular la inmunidad de la mucosa respiratoria antes que la sistémica. Es importante hacer notar que son varios los factores que influyen el desa-

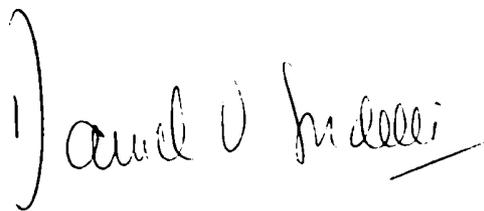
rrollo de la neumonía bacteriana: el huésped, la respuesta inmune, el ambiente y el patógeno. El establecimiento de métodos para impedir el desarrollo de la neumonía bacteriana requiere, entoces, no sólo un amplio conocimiento de la respuesta inmune local, sino también un conocimiento profundo de la interacción primaria entre un patógeno dado y el huésped que ha de sufrir la infección. Será así necesario tener un vasto conocimiento de la patogénesis de la neumonía que se trata de prevenir (9).

4.3. FUTURO

Nuestros estudios referentes a P. aeruginosa se centrarán en adelante en la obtención de una cepa triple mutante, con la finalidad última de construir una vacuna a germen vivo atenuado contra este microorganismo que presente una frecuencia de reversión con valores insignificantes. Asimismo, consideramos que es de fundamental importancia un completo entendimiento de la respuesta inmune a polisacáridos para el desarrollo de vacunas que idealmente aseguren una inmunidad duradera en infantes y adultos en riesgo de neumonía por S. pneumoniae. Por este motivo, si bien no está en este momento a nuestro alcance el desarrollo de una vacuna de uso en humanos contra S. pneumoniae, nuestro objetivo es contribuir al esclarecimiento de algunos de las cuestiones aún no resueltas e investigar los mecanismos que producen una exacerbación de las defensas pulmonares luego de la inmunización local contra este microorganismo. A este respecto, son varios los

grupos de investigación que se hallan actualmente trabajando sobre posibles alternativas a la vacunación con la preparación de polisacárido de S. pneumoniae (137). Nos proponemos obtener nuevos mutantes ts de S. pneumoniae a partir de los ya obtenidos, mediante procedimientos de transferencia génica (transformación y electroporación) con cepas capsuladas de esta bacteria. Se contempla la evaluación de distintos parámetros de inmunidad local humoral y celular pulmonar luego de la inmunización local con mutantes ts de S. pneumoniae capsuladas, de serotipo frecuente.

En base a estos resultados, nuestros estudios continuarán centrándose en la determinación del rol de las defensas locales contra S. pneumoniae, luego de la inmunización con cepas vivas atenuadas.



Dr. DANIEL O. SORDELLI
PROFESOR REGULAR ADJUNTO
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
PARASITOLÓGICA E INMUNOLOGÍA

5. BIBLIOGRAFIA

5. BIBLIOGRAFIA CITADA.

1. Tomasi TB. Mechanisms of immune regulation at mucosal surfaces. *Rev. Infect. Dis.*, 5 (suppl.4):784, 1983.
2. Abraham SN, Beachey EH. Host defenses against adhesion of bacteria to mucosal surfaces. *Adv. Host Def. Mech.*, 4:63, 1985.
3. Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm AM. Mucosal Immunity. Implications for vaccine development. *Immunobiology*, 184:157, 1992.
4. Bienenstock J, Blennerhassett MG, Croitoru K, Ernst PB, Gauldie J, Jordana M, Marshall JS, Perdue MH, Stanisiz AM, Stead RH. Advances in host defense mechanisms. Molecular aspects of immune response and infectious diseases. pp. 55. Editado por Kiyono, Jirillo y DeSimone, Raven Press, Nueva York, 1990.
5. Lascelles AK. The immune system of the ruminant mammary gland and its role in the control of mastitis. *J. Dairy Sci.*, 62:154, 1979.
6. Russell RW, Mestecky J. Induction of the mucosal immune response. *Rev. Infect. Dis.*, 10(suppl.2):440, 1988.
7. Weisz-Carrington P, Grimes SR, Lamm ME. Gut-associated tissue as source of an IgA immune response in respiratory tissues after oral immunization and intrabronchial challenge. *Cellular Immunol.*, 106:132, 1987.
8. Bienenstock J. Mucosal immunological protection mechanisms in the airways. *Eur. J. Respir. Dis.*, 69(suppl.147):62, 1986.
9. Busse WW. Pathogenesis and sequelae of respiratory infections. *Rev. Infect. Dis.*, 13(suppl.6):477, 1991.
10. Huxley EJ, Virolar J, Gray WR, y col. Pharyngeal aspiration in normal adults and patients with depressed consciousness. *Am. J. Med.*, 61:564, 1978.
11. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP, y col. Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Ann. Intern. Med.*, 77:701, 1972.
12. Pierce AK, Sandford JP, Thomas GD. Long term evaluation of the contamination of inhalatory therapy equipment and the occurrence of necrotizing pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 282:528, 1970.

13. Green GM, Jakab GJ, Low RB, y col. Defense mechanisms of the respiratory membrane. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 115:479, 1977.
14. Henson PM, McCarthy K, Larsen GL, y col. Complement fragments, alveolar macrophages and alveolitis. *Am. J. Pathol.*, 97:93, 1979.
15. Kaltreider HB. State of the Art. Expression of immune mechanisms in the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 113:347, 1976.
16. Nagaishi C. Functional anatomy and histology of the lung. pp.102. Editado por University Park Press, Baltimore, 1972.
17. Gould VE. The endocrine lung. *Lab. Invest.*, 48:507, 1983.
18. Marchevsky A, Carrol WL, Jacobs J, y col. Quantitative studies of APUD cells in airways and gut of guinea pigs. A comparison of various histochemical stains and different fixatives. *Lung*, 161: 245, 1983.
19. Rudzik R, Clancy RL, Perey DYE, y col. Repopulation with IgA containing cells of bronchial and intestinal lamina propria after transfer of homologous Peyer's patch and bronchial lymphocytes. *J. Immunol.*, 114:1599, 1975.
20. Nedrud JG, Liang X, Hague N, Lamm ME. Combined oral/nasal immunization protects mice from Sendai virus infection. *J. Immunol.*, 139:3484, 1987.
21. Morris Hooke A, Cerquetti MC, Wan KS, Wang Z, Sordelli DO. Oral immunization of mice with temperature-sensitive Pseudomonas aeruginosa enhances pulmonary clearance of the wild-type. *Vaccine*, 9:294, 1991.
22. Bell DY, Haseman JA, Spock A, y col. Plasma proteins of bronchoalveolar surface of the lung of smokers and non-smokers. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 124:72, 1981.
23. Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, y col. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Pathol.*, 149:206, 1979.
24. Kaltreider HB, Cham MKL. The class-specific immunoglobulin composition of fluids obtained from various levels of the canine respiratory tract. *J. Immunol.*, 116:423, 1976.

25. Kaltreider HB, Byrd PK, Daughety TW, y col. The mechanism of appearance of specific antibody-forming cells in the lungs of inbred mice after intratracheal immunization with sheep erythrocytes. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 127:316, 1983.
26. Liu PV. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. En: RG Dogget. pp.63. Editado por: Academic Press Inc, New York, 1979.
27. McLeod E, Caldwell JL, Kaltreider HB. Pulmonary immune response in inbred mice. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 118:561, 1978.
28. Reynolds HY. Pulmonary host defenses in rabbits after immunization with *Pseudomonas* antigens: the interaction of bacteria, antibodies, macrophages and lymphocytes. *J. Infect. Dis.*, 130(S):134, 1974.
29. Reynolds HY, Thompson RE, Devlin HB. Development of cellular and humoral immunity in the respiratory tract of rabbits to *Pseudomonas* lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.*, 53:1351, 1974.
30. Rosenstreich DL, Wahl SM. Cellular sources of lymphokines. En: *Biology of lymphokines*. Editado por: S. Cohen, Academic Press Inc., New York, 1979.
31. Pier GB, Markham RB. Induction in mice of cell mediated immunity to *Pseudomonas aeruginosa* by high molecular weight polysaccharide and vinblastine. *J. Immunol.*, 128:2121, 1982.
32. Powderly WG, Pier GB, and Markham RB. T lymphocyte-mediated protection against *Pseudomonas aeruginosa* infections in granulocytopenic mice. *J. Clin. Invest.*, 78:375, 1986.
33. Powderly WG, Pier GB, and Markham RB. In vitro T cell mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*. V. Generation of bactericidal T cells in nonresponder mice. *J. Immunol.*, 138: 2272, 1987.
34. Markham RB, Powderly WG. Exposure of mice to live *Pseudomonas aeruginosa* generates protective cell-mediated immunity in the absence of an antibody response. *J. Immunol.*, 140:2039, 1988.
35. Jazairy HA. Proceedings of the First Middle East Symposium, "Hospital infections and its control", Kuwait, 14-16 november, 1981, pp. 3. Editado por Sadad Sabri and J.R. Tittensor, Kuwait, 1981.

36. Brachman PS, Emori TG, Garner JS and Haley RW. Proceedings of the First Middle East Symposium, "Hospital infections and its control", Kuwait, 14-16 november, 1981, pp. 11. Editado por: Sadad Sabri and J.R. Tittensor, Kuwait, 1981.
37. Barr DGD. Hospital Infection and its Control. Proceedings of the First Middle East Symposium, "Hospital infections and its control", Kuwait, 14-16 november, 1981, pp. 81. Editado por: Sadad Sabri and J.R. Tittensor, Kuwait, 1981.
38. Jacobs NM and Harris VJ. Acute Haemophilus pneumonia in childhood. Am. J. Dis. Child., 133:603, 1979.
39. Wayne CL, Bennett M, Lu YS, Pakes SP. Biological evaluation of Mycoplasma pulmonis temperature-sensitive mutants for use as possible rodent vaccines. Infect. Immun. 58:2289, 1990.
40. Osterhaus AME, Devries P. Vaccination against respiratory virus infections and measles in man. Immunobiology, 184:180, 1992.
41. Jackson S, Mestecky J, Childers NK, Michalek SM. Liposomes containing anti-idiotypic antibodies: an oral vaccine to induce protective secretory immune responses specific for pathogens of mucosal surfaces. Infect. Immun., 58:1932, 1990.
42. Thapar MA, Parr EL, Parr MB. Secretory immune responses in mouse vaginal fluid after pelvic, parenteral or vaginal immunization. Immunology, 70:121, 1990.
43. Cryz Jr. SJ, Sadoff JC, Furer E, y col. Pseudomonas aeruginosa polysaccharide tetanus toxoid conjugate vaccine: safety and immunogenicity in humans. J. Infect. Dis., 154:682, 1986.
44. Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, y col. Inflammatory and immune processes in the human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. Am. J. Pathol., 149:206, 1979.
45. Bodey GP, Bolívar R, Fainstein V, y col. Infections caused by Pseudomonas aeruginosa. Rev. Infect. Dis., 5:279, 1983.
46. Cryz Jr. SJ. Pseudomonas aeruginosa infections. pp.317. En: R. Germanier: Bacterial vaccines. Editado por: Academic Press Inc, Orlando, Florida, 1984.
47. Pruitt Jr. BA, Lindberg RB. Pseudomonas aeruginosa infections in burn patients. pp.339. En: RG Dogget: Pseudomonas aeruginosa. Editado por: Academic Press Inc, New York, 1979.

48. Rodríguez V, Bodey GP. Epidemiology, clinical manifestations, and treatment in cancer patients. pp.368. En: RG Dogget: Pseudomonas aeruginosa. Editado por: Academic Press Inc, New York, 1979.
49. Vasil ML. Pseudomonas aeruginosa: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. J. Pediatr., 108:800, 1986.
50. Sanai Y, Takeshi K, Homma JY, y col. Production of exotoxin, protease and elastase of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients' and environmental specimens. Jpn. J. Exp. Med., 48:553, 1978.
51. Woods DE, and Sakol PA. Role of Pseudomonas aeruginosa extracellular enzymes in lung disease. Clin. Invest. Med., 9:108, 1986.
52. Iglewski BH, Kabat D. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by Pseudomonas aeruginosa toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:2284, 1975.
53. Austrian R. Pneumococcal infections. pp.257. En: R. Germanier: Bacterial vaccines. Editado por: Academic Press Inc, Orlando, Florida, 1984.
54. Bruyn GAW, Zegers BJM, van Furth R. Mechanisms of host defense against infection with Streptococcus pneumoniae. Clin Infect Dis, 14:251, 1992.
55. Duncan JL. Group B and other Stretococci. pp.173. En: The biological and clinical basis of infectious diseases. Editado por Youmans, Paterson, Sommers; WB Saunders, Philadelphia, 1985.
56. Lawlor MY, Crowe HM, Quintiliani R. Cellulitis due to Streptococcus pneumoniae: case report and review. Clin. Infect. Dis., 14:247, 1992.
57. Berman S. Epidemiology of acute respiratory infections in children of developing countries. Rev. Infec. Dis., 13 (suppl.6):454, 1991.
58. Weissenbacher M, Carballal G, Avila M, Salomón H, Harisiadi J, Catalano M, Cerqueiro MC, Murtagh P. Hospital-based studies on acute respiratory tract infections in young children. Rev. Infect. Dis., 12 (suppl.8):889, 1990.
59. Streptococcus pneumoniae. pp.477. En: Zinsser Microbiology. Editado por Joklik, Willett, Amos. Chapter 27, Appleton-Century-Crofts, norwalk, Connecticut, 1984.

60. Mufson MA. Streptococcus pneumoniae. pp.1539. En: Principles and practice of infectious diseases. Editado por: Mandel, Douglas, Bennet. Churchill Livingstone, New York, 1990.
61. Pollack M, Young LS. Protective activity of antibodies to exotoxin A and lipopolysaccharide at the onset of Pseudomonas aeruginosa septicemia in man. J. Clin. Invest., 63:276, 1979.
62. Sawada S, Suzuki M, Kawamura T y col. Protection against infection with Pseudomonas aeruginosa by passive transfer of monoclonal antibodies to lipopolysaccharides and outer membrane proteins. J. Infect. Dis., 150:570, 1984.
63. Pennington JE, Small GJ. Passive immune therapy for experimental Pseudomonas aeruginosa pneumonia in the neutropenic host. J. Infect. Dis., 155:973, 1987.
64. Alavi JB, Root RK, Djerassi I, y col. A randomized clinical trial of granulocyte transfusion for infection in acute leukemia. N. Eng. J. Med., 296:706, 1977.
65. Johnston RB. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. Rev. Infect. Dis., 13(suppl.6):509, 1991.
66. Shann F. Modern vaccines. Pneumococcus and influenza. The Lancet, 335:898, 1990.
67. Feller I, Pierson C. Pseudomonas vaccine and hyperimmune plasma of burned patients. Arch. Surg. (Chicago), 97:225, 1968.
68. Sachs A. Active immunoprophylaxis in burns with a new multivalent vaccine. Lancet, 2:959, 1970.
69. Pennington JE, Miller JJ. Evaluation of a new polyvalent pseudomonas vaccine in respiratory infections. Infect. Immun., 25:1029, 1979.
70. Cryz Jr. SJ. Pseudomonas aeruginosa infections. pp.317. En: R. Germanier: Bacterial vaccines. Academic Press Inc, Orlando, Florida, 1984.
71. Pennington JE, Menkes E. Type-specific vs. cross-protective vaccination for gram-negative bacterial pneumonia. J. Infect. Dis., 144:599, 1981.
72. Abe C, Tanamoto K, Homma JY. Infection protective property of common antigen (OEP) of Pseudomonas aeruginosa and its chemical composition. Jpn. J. Exp. Med., 47:393, 1977.

73. Okada K, Kawaharajo K, Kasai T, y col. Effects of somatic components of Pseudomonas aeruginosa on protective immunity in experimental mouse burn infection. Jpn. J. Exp. Med., 50:53, 1980.
74. Schaad UB, Lang AB, Wedgwood J, Ruedeberg A, Fuerer E, Que JU, Cryz SJ. Immunogenicity and safety of an octavalent Pseudomonas aeruginosa (PA) O-Polysaccharide (O-PS) toxin A conjugate vaccine in children with cystic fibrosis (CF). ICAAC and Japan Pseudomonas aeruginosa Society Meeting Abstracts, 15:7, 1990.
75. Peeters CCAM, Tenberger-Meekes AM, Poolman JT, Beurret M, Zegers BJM, Rijkers GT. Effect of carrier priming on immunogenicity of saccharide-protein conjugate vaccines. Infect. Immun., 59:3504, 1991.
76. Morris Hooke A. Genetically attenuated vaccines. pp.203. En: Pseudomonas aeruginosa infection. Antibiot Chemother. Editado por Hoiby, Pedersen, Shand, Doring, Holder, Basel, Karger, 1989.
77. Morris Hooke A, Arroyo PJ, Oeschger MP, y col. Temperature-sensitive mutants of Pseudomonas aeruginosa: isolation and preliminary immunological evaluation. Infect. Immun., 38:136, 1982.
78. Morris Hooke A, Bellanti JA, Oeschger MP. Live bacterial vaccines: new approaches for safety and efficacy. Lancet, 1:1472, 1985.
79. Sordelli DO, MC Cerquetti, A Morris Hooke, y col. Enhancement of Pseudomonas aeruginosa lung clearance after local immunization with temperature-sensitive mutants. Infect. Immun., 39:1275, 1983.
80. Sordelli DO, RA Rojas, MC Cerquetti, y col. Enzyme-linked immunosorbent assay antibody responses to a temperature-sensitive mutant of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun., 50:324, 1985.
81. Sordelli DO, Cerquetti MC, Bellanti JA, y col. Specific pulmonary defenses against Pseudomonas aeruginosa after local immunization with temperature-sensitive mutants. J. Gen. Microbiol., 133:2835, 1987.
82. Morris Hooke A, DO Sordelli, MC Cerquetti, y col. Quantitative determination of bacterial replication in vivo. Infect. Immun., 49:424, 1985.

83. Sordelli DO, MC Cerquetti and A Morris Hooke. Replication rate of Pseudomonas aeruginosa in the murine lung. *Infect. Immun.*, 50:388, 1985.
84. Sordelli DO, MC Cerquetti, A Morris Hooke, y col. The effect of chemotactins released by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa on the murine respiratory tract. *Infect. Immun.*, 49:265, 1985.
85. Bellanti JA, Zeligs BJ y Sordelli DO. Pulmonary immunodeficiency. *Intern. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, 76 (suppl.1):101,1985.
86. Sordelli DO, BJ Zeligs, MC Cerquetti, y col. Inflammatory responses to Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in the murine lung. *Eur. J. Respir. Dis.*, 66:31, 1985.
87. Sordelli DO, MC Cerquetti, G El-Tawil, y col. Ibuprofen modifies the inflammatory response of the murine lungs to Pseudomonas aeruginosa. *Eur.J. Respir. Dis.*, 67:118, 1985.
88. Cerquetti MC, DO Sordelli, JA Bellanti, y col. Lung defenses against Pseudomonas aeruginosa in C5-deficient mice with different genetic backgrounds. *Infect. Immun.*, 52:853, 1986.
89. Mayer P, Walzl H. Studies of lung infections caused by Pseudomonas aeruginosa in mice treated with cyclophosphamide. *Infection*, 11:87, 1983.
90. Henderson DW. An apparatus for the study of airborne infection. *J. Hygiene*, 50:53, 1953.
91. Sedgwick JD and Holt PG. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Met.*, 57:301, 1983.
92. National Institutes of Health. *Current Protocols in Immunology*, pp. 7.14.1. Editdo por Coligan, Krinsbeek, Margulies, Shevach, Strober, Nueva York, 1991.
93. Czerkinsky CC, Nilson LA, Nygren H, Ouchterlony O and Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J. Immunol. Met.*, 65:109, 1983.
94. Morris Hooke A, Oeschger MP, Zeligs BJ, Bellanti JA. Ideal target organism for quantitative bacterial assays. *Infect. Immun.*, 20:406, 1978.

95. Andrews PC, Krinsky NI. Human myeloperoxidase and hemi-myeloperoxidase. *Methods Enzymol.*, 132:369, 1986.
96. Berman JS, Beer DJ, Theodore AC, Kornfeld H, Bernardo J, Center DJ. Lymphocyte recruitment to the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 14:238, 1990.
97. Zeligs BJ, Armstrong CD, Walser JB, Bellanti JA. Age-dependent susceptibility of neonatal rats to group B streptococcal type III infection: correlation of severity of infection and response of myeloid pools. *Infect. Immun.*, 37:255, 1982.
98. Morris Hooke A, Sordelli DO, Cerquetti MC, y col. Differential growth characteristics and immunogenicity of tight and coating temperature-sensitive mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 55:99, 1987.
99. Sordelli DO, Cerquetti MC, Fontán PA, Meiss RP. Piroxicam treatment protects mice from lethal pulmonary challenge with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.*, 159:232, 1989.
100. Dunn MM, Kamp DW. Pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in neutropenic mice. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 135:1294, 1987.
101. Pennington JE, Reynolds HY, Wood RE y col. Use of a *Pseudomonas aeruginosa* vaccine in patients with acute leukemia and cystic fibrosis. *Am. J. Med.*, 58:629, 1975.
102. Moss RB, Hsu YP, Lewiston NJ, y col. Association of systemic immune complexes, complement activation, and antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and exotoxin A with mortality in cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 133:648, 1986.
103. Pennington JE, Kuchmy D. Mechanisms for pulmonary protection by lipopolysaccharide *Pseudomonas* vaccine. *J. Infect. Dis.*, 142:191, 1980.
104. Wood RE, Pennington JE, Reynolds HY. Intranasal administration of a *Pseudomonas* lipopolysaccharide vaccine in cystic fibrosis. *Pediat. Infect. Dis.*, 2:367, 1983.
105. Collins FM. Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriol. Rev.*, 38:371, 1974.
106. Boletín epidemiológico, Organización Mundial de la Salud. Evaluación de las vacunas contra el cólera., 12(2):11, 1991.

107. Baldrige JR, Thomashow MF, Hinrichs DJ. Induction of immunity with avirulent Listeria monocytogenes 19113 depends on bacterial replication. *Infect. Immun.*, 56:2109, 1988.
108. Maresz-Babczyszyn J, Kowalewska D, Sokalska M. Arthus and delayed type of hypersensitivity to Pseudomonas aeruginosa antigens in mouse. *Arch. Immunol. Ther. Experim.*, 31:217, 1983.
109. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, y col. Tratado de Microbiología. pp. 568. Editorial Salvat, Barcelona, España, 1983.
110. Cooper JAD Jr, Merryl WW, Reynolds HY. Cyclophosphamide modulation of bronchoalveolar cellular populations and macrophage oxidative metabolism. Possible mechanisms of pulmonary pharmacotoxicity. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 134:108, 1986.
111. Johansen HK, Hoiby N. Local IgA and IgG response to intratraqueal immunization with Pseudomonas aeruginosa antigens. *APMIS*, 100:87, 1992.
112. Zweerink HJ, Detolla LJ, Gammon MC, Hutchison CF, Puckett JM, Sigal NH. A human monoclonal antibody that protects mice against Pseudomonas-induced pneumonia. *J. Infect. Dis.*, 162:254, 1990.
113. Holder IA, Neely AN. Pseudomonas hyperimmune globulin: antibiotic treatment of experimental Pseudomonas sepsis in burned mice. En: Pseudomonas aeruginosa Infection. Antibiot. Chemother., editado por: Hoiby, Pedersen, Shand, Doring, Holder, Basel, Karger, 42:109-123, 1989.
114. Bellanti JA, Sordelli DO, Cerquetti MC, Wan KS, Arias G, Cereb N, Zubra D, Kulczycki, Morris Hooke A. Live, attenuated vaccines against Pseudomonas aeruginosa: observations in the experimental animal and the human. *Ann. Sclavo Coll. Monog.*, 1-2:247, 1986.
115. Freihorst J, Merrick JM, Ogra PL. Effect of oral immunization with Pseudomonas aeruginosa on the development of specific antibacterial immunity in the lungs. *Infect. Immun.*, 57:235, 1989.
116. Pichichero ME, Hall CB, Insel RA. A mucosal antibody response following systemic Haemophilus influenzae type B infection in children. *J. Clin. Invest.*, 67:1482, 1981.
117. Merrill WW, Goodenberger D, Strober W, Matthay RA, Naegel GP, Reynolds HY. Free secretory component and other proteins in human lung lavage. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 122:156, 1980.

118. Rankin JA, Naegel GP, Schrader CE, Matthay RA, Reynolds HY. Airspace immunoglobulin production and levels in bronchoalveolar lavage fluid of normal subjects and patients with sarcoidosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 127:442, 1982.
119. Goud SN, Kaplan AM, Subbarao B. Primary antibody responses to thymus-independent antigens in the lungs and hilar lymph nodes of mice. *Infect. Immun.*, 58:2035, 1990.
120. Pennington JE, Kuchmy D. Mechanisms for pulmonary protection by lipopolysaccharide *Pseudomonas* vaccine. *J. Infect. Dis.*, 142:191, 1980.
121. Pier GB, Saunders JM, Ames P, Edwards MS, Auerbach H, Goldfarb J, Speert DP, Hurwitch S. Opsonophagocytic killing antibody to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in older, non-colonized cystic fibrosis patients. *N. Engl. J. Med.*, 317:793, 1987.
122. Sestini P, Nencioni L, Villa L, Boraschi D, Tagliabue A. Iga-driven antibacterial activity against *Streptococcus pneumoniae* by mouse lung lymphocytes. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 137:138, 1988.
123. Ferrieri P. Neonatal susceptibility and immunity to major bacterial pathogens. *Rev. Infect. Dis.*, 12(suppl.4):394, 1990.
124. Bruce MC, Baley JE, Medvik KA, Berger M. Impaired surface membrane expression of C3bi but not C3b receptors on neonatal neutrophils. *Pediatr. Res.*, 21:306, 1987.
125. Anderson DC, Hughes BJ, Smith W. Abnormal mobility of polymorphonuclear leukocytes. Relation to impaired redistribution of surface adhesion sites by chemotactic factors or colchicine. *J. Clin. Invest.*, 68:863, 1981.
126. Klein RB, Fisher TJ, Gard SE, Biberstein M, Rich KC, Stiehm ER. decreased mononuclear and polymorphonuclear chemotaxis in human newborns, infants and young children. *Pediatrics*, 60:467, 1977.
127. Martin TR, Rubens CE, Wilson CB. Lung antibacterial defense mechanisms in infant and adult rats: implications for the pathogenesis of group B streptococcal infections in the neonatal lung. *J. Infect. Dis.*, 157:91, 1988.
128. Sordelli DO, Djafari M, García VE, Fontán PA, Doring G. Age-dependent pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse-model: diminished migration of polymorphonuclear leukocytes to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Infect. Immun.*, 60:1724, 1992.

129. Doring G, Dauner HM. Clearance of Pseudomonas aeruginosa in different rat lung models. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 138:1249, 1988.
130. Mosier DE, Finney AJ, Scherle P. The physiology of B lymphocytes capable of generating anti-polysaccharide antibody responses. pp.243. En: R. Bell and G. Torrigiani, *Towards better carbohydrates vaccines*. John Wiley and Sons, New York, 1987.
131. Winter JH. *Infection*, 19 (suppl.7):359, 1991.
132. Kielhofner M, Atmar RL, Hamill RJ, Musher DM. Life-threatening Pseudomonas aeruginosa infections in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.*, 14:403, 1992.
133. Rodriguezbarradas MC, Musher DM, Lahart C, Lacke C, Groover J, Watson D, Baughn R, Cate T, Crofoot G. Antibody to capsular polysaccharides of Streptococcus pneumoniae after vaccination of human immunodeficiency virus infected subjects with 23-valent pneumococcal vaccine. *J. Infect. Dis.*, 165:553, 1992.
134. Helms C, Grizzard MB, Chanock RM. Temperature-sensitive mutants of type I Streptococcus pneumoniae: preparation, characterization, and evidence for attenuation and immunogenicity. *J. Infect. Dis.*, 136 (suppl.):208, 1977.
135. Onofrio JM, Toews GB, Lipscomb MF, Pierce AK. Granulocyte-alveolar-macrophage interaction in the pulmonary clearance of Staphylococcus aureus. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 127:335, 1983.
136. Machan ZA, Pitt TL, White W, Watson D, Taylor GW, Cole PJ, Wilson R. Interaction between Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus: description of an anti-staphylococcal substance. *J. Med. Microbiol.*, 34:213, 1991.
137. Boulnois GJ. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by Streptococcus pneumoniae. *J. Gen. Microbiol.*, 138:249, 1992.

6. RESUMEN

6. RESUMEN

La estimulación antigénica local de las mucosas es el método más eficaz para producir una exacerbación de los mecanismos de defensa contra patógenos invasores y la mejor protección estaría inducida por la infección natural, motivo por el cual, la utilización de mutantes termosensibles (ts) como inmunógenos sería la mejor manera de mimetizar tal infección.

Se estudió el tiempo de permanencia nasofaríngea, esplénica y colónica de los mutantes ts D/1/8 (no replicante) y de E/9/9 (replicante limitado) de Pseudomonas aeruginosa luego de la inoculación intranasal (i.n.) e intraperitoneal (i.p.), respectivamente, en un modelo experimental murino. Los recuentos de unidades formadoras de colonia (UFC) de los mutantes ts disminuyeron logarítmicamente en los líquidos de lavado nasofaríngeo y en heces, tanto de animales normales como granulocitopénicos, luego de la inoculación i.n. Para ambos mutantes, los recuentos de UFC recuperadas de bazo cayeron debajo de los niveles de sensibilidad hacia el día 7 luego de la inoculación i.p. en ratones normales. Ambos mutantes fueron depurados por los ratones granulocitopénicos, aunque la colonización esplénica persistió 7 días más que en los controles. Se investigó si la inmunización local con los mutantes ts protegía a ratones granulocitopénicos de un desafío con P. aeruginosa de fenotipo salvaje. La inmunización i.n. con ambos mutantes protegió a los ratones contra el desafío letal producido por la cepa salvaje, en una relación dosis-respuesta. A-

simismo se observó que la inmunización i.n. con 10^7 UFC de cada mutante indujo una protección significativa superior a la inducida por ruta i.p. Se investigó la naturaleza de los mecanismos inmunes humorales involucrados en la protección inducida luego de inmunización local con los mutantes ts de P. aeruginosa. Se detectaron altos niveles de IgG anti-P. aeruginosa por ELISA, en el tracto respiratorio bajo tanto de animales inmunizados local como sistémicamente, mientras que sólo se detectaron niveles medibles de IgA en los líquidos de lavado pulmonar (LLP) de ratones inmunizados i.n. con los mutantes ts. Los niveles séricos de IgG detectados luego de inmunización i.n. resultaron menores que los observados por vía i.p. Se realizó la medición de células productoras de IgG anti-P. aeruginosa locales mediante el método de ELISPOT. Los nódulos linfáticos de ratones inmunizados localmente contenían células productoras de IgG, mientras que los nódulos poplíteos contenían un número de células similar al de los nódulos poplíteos de los controles, comprobándose que una parte de la IgG presente en tracto respiratorio bajo es sintetizada localmente en pulmón. A fin de determinar la dependencia de la edad con la depuración pulmonar de P. aeruginosa, ratones de 10, 20 y 35 días fueron expuestos a un aerosol conteniendo a este microorganismo. La depuración pulmonar de esta bacteria resultó disminuída en animales menores a 20 días. Esta deficiencia estuvo acompañada por una migración disminuída de leucocitos PMN a los canales aéreos en respuesta al desafío con P. aeruginosa.

Se obtuvieron mutantes ts de Streptococcus pneumoniae a partir de cepas aisladas de pacientes con neumonía, mediante mutagénesis química. Se obtuvieron 7 mutantes ts relativamente estables, dos replicantes y cinco de replicación limitada. En estudios de inmunización i.p., tanto la cepa salvaje de S. pneumoniae muerta por calor (CS) como uno de los mutantes ts (J/3), indujeron altos niveles de IgG específica en suero, no observándose diferencias entre ambos inmunógenos. Sin embargo, por ruta local, los niveles de IgG inducidos por el mutante ts J/3 resultaron marcadamente superiores a los inducidos por la CS. Pudo observarse que la inmunización i.n. con el mutante J/3 indujo niveles de IgG específicos en LLP marcadamente superiores a los producidos por la CS administrada por la misma ruta. Sólo el mutante J/3 indujo niveles de IgA específica anti-S. pneumoniae en LLP medibles respecto al control luego de inmunización i.n. La inmunización sistémica también indujo niveles medibles de IgG en LLP, no observándose diferencias en los niveles producidos por el mutante y la CS. No se detectó IgA en LLP de animales vacunados sistémicamente. Se estudiaron los cambios en la población celular del pulmón murino en respuesta a un aerosol de S. pneumoniae. El número de PMN recuperados siguió un patrón similar al de Staphylococcus aureus, mostrando marcadas diferencias en ambos casos respecto al número de PMN recuperados luego de aerosolización con P. aeruginosa. Se inmunizaron grupos de animales siguiendo planes de inmunización local para P. aeruginosa y para S. aureus. A los 21 días se realizó un desafío por aerosol con una suspensión mezcla que contenía

P. aeruginosa y S. aureus. Se verificó la depuración de ambos gérmenes en todos los grupos de animales, y se observó que la presencia y cantidad de P. aeruginosa influía en la depuración pulmonar de esta bacteria. Los resultados obtenidos en este trabajo, marcan que la inmunización local presenta ventajas frente a la inmunización parenteral para inducir inmunidad en el tracto respiratorio bajo. Se postula que el uso de mutantes ts bacterianos puede constituir un método idóneo para producir vacunas vivas a germen atenuado.