

Baja prevalencia de anticuerpos de isotipo IgG e IgA contra un polisacárido capsular de *Klebsiella pneumoniae* K 8 en 50 trinomios de suero materno, cordón umbilical y calostro humano

Gustavo Acosta Altamirano,* María del Pilar García Roca,** Ma. del Rocío Reyes Montes,*** Carlos A Parrao Rodríguez,* Victor Vargas Hernández,***** José Ignacio Santos Preciado***

RESUMEN

Las infecciones en los recién nacidos por *Klebsiella pneumoniae* son frecuentes en el medio hospitalario, sin embargo, no se conocen los mecanismos inmunitarios humorales específicos que proporciona la madre a su producto en forma de transferencia placentaria de anticuerpos o ingestión de calostro humano; en este trabajo se obtuvieron 50 trinomios de suero materno, suero de cordón umbilical y el calostro respectivo para cuantificar anticuerpos contra un polisacárido de *Klebsiella pneumoniae* por inmunoensayo enzimático ELISA y hemaglutinación. Los resultados demostraron la presencia de anticuerpos bacterianos en 26% de los sueros estudiados y de sólo 10 y 24% en las muestras de cordón umbilical y calostro, respectivamente.

Palabras clave: Anticuerpos, *Klebsiella pneumoniae*, calostro, cordón umbilical.

ABSTRACT

At hospitalary means infections by *Klebsiella pneumoniae* in newborn are frequent. Nevertheless, the specific humoral immunity mechanism apportionated by the mother to her product as placentary transference of antibodies of human colostrum ingestion are not known. In this work 50 samples of maternal sera, umbilical blood and the respective colostrum to quantify antibodies against the *Klebsiella pneumoniae* by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and hemagglutination were obtained.

The results demonstrated the presence of bacterial antibodies in the 26% of the tested serums, and only 10% and 24% respectively, in umbilical blood and colostrum.

Key words: Antibodies, *Klebsiella pneumoniae*, colostrum, umbilical blood.

* Laboratorio Clínico Hospital Juárez de México.

** Departamento Inmunoquímica del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

*** Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Medicina UNAM.

**** Departamento Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM.

***** Servicio de Oncología Ginecológica del Hospital Juárez de México.



INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas en los recién nacidos son una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en México. Dichas infecciones son de mayor importancia cuando se adquieren intrahospitalariamente.^{1,2} En las infecciones nosocomiales *Klebsiella pneumoniae* es un microorganismo oportunista de gran importancia, las dos terceras partes de las infecciones nosocomiales son provocadas por estas bacterias en las infecciones de vías urinarias, es un invasor secundario en las enfermedades crónicas respiratorias provoca 3 % de las neumonías, e infecciones gastrointestinales. Además se le ha señalado como patógeno primario al demostrarse que tiene enzimas tóxicas y otros factores que lo hacen comportarse como tal.

La tribu *Klebsiellae* comprende cuatro géneros bacterianos que se clasifican con base en la homología del ADN, propiedades bioquímicas, reacciones serológicas, susceptibilidad a bacteriófagos y patrones de susceptibilidad a antibióticos. El número de especies reconocidos para el género *Klebsiella* son siete, según Ewing (1986); *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. oxytoca*, *K. rhinoscleromatis*, *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. trevisanae*.

Algunos autores sólo reconocen tres especies: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis*, (*K. oxytoca* la consideran un biotipo de *K. pneumoniae*). Otros consideran a las tres primeras citadas como subespecies de *K. pneumoniae*; debido a que los estudios sobre ADN indican una relación de 85 a 100 por ciento. Las cuatro especies son importantes desde el punto de vista médico. Actualmente se conocen también a las siguientes especies: *K. planticola*, *K. terrigena* y *K. trevisanae*, sin embargo, ninguna es patógena para el hombre.

MATERIAL Y MÉTODO

Muestras de suero materno, cordón umbilical y calostro. Se obtuvieron 50 muestras de sangre periférica de mujeres primíparas y multíparas con edades comprendidas entre 16-40 años de edad sometidas a operación cesárea en el Servicio de Obstetricia del hospital, así como las muestras sanguíneas de cordón umbilical y los calostros respectivos fueron obtenidos en los primeros cuatro días del posparto. Las muestras de sangre venosa fueron obtenidas por punción venosa e incubadas a 37°C por 30 minutos y posteriormente centrifugadas a 480 x g durante 15 min, todos los sueros obtenidos se guardaron a -20°C. Las muestras de

calostro humano fueron obtenidas por expresión manual y centrifugadas 2000 x g durante 15 min, la capa lipídica y el paquete celular se eliminó y se almacenó el sobrenadante a -20°C. Se utilizó una cepa de *Klebsiella pneumoniae* serotipo K-8 aislada de un caso de sepsis neonatal. *Klebsiella pneumoniae* K-8 se cultivó en Agar Worfel-Ferguson a 37°C durante 24 horas, posteriormente se recuperó con 10 mL de agua formalinizada al 0.5% y 10 mL de acetona al 50%. Las bacterias fueron centrifugadas a 5900 x g durante 30 min, eliminando el sobrenadante y el paquete celular obtenido se lavó tres veces con 10 mL de acetona al 50%. El polisacárido obtenido se utilizó para recubrir eritrocitos de grupo O Rh +, los eritrocitos se lavaron tres veces con solución salina fosfato (PBS) pH 7.2 y centrifugados a 480 x g durante 15 minutos, 100 µL del paquete globular se incubó con 400 µL de polisacárido 1 mg/mL en solución salina a 37°C durante 1 hora con agitación suave y constante; se suspendieron en PBS y se lavaron tres veces y el paquete obtenido se resuspendió en 5 mL de PBS para obtener eritrocitos sensibilizados al 2%. Cuantificación de anticuerpos en trinomios de suero materno, suero de cordón umbilical y calostro humano, fueron evaluados por la técnica de hemaglutinación pasiva en microplaca.

La estandarización de un método inmunoenzimático de tipo indirecto (ELISA) para la cuantificación de anticuerpos contra *Klebsiella pneumoniae*: recubrimiento de microplacas de poliestireno (FALCON, USA) con polisacárido capsular en amortiguador de carbonatos pH 9.6 se incubaron toda la noche 4°C. Posteriormente se lavaron tres veces con solución salina- fosfato Tween 20 pH 7.2 e incubaron con solución de albúmina sérica bovina al 2% durante dos horas se decantaron y para incubar 100 µL de suero problema o 100 µL, de calostro durante una hora, se lava tres veces con solución amortiguadora de fosfatos y se adicionan 100 µL de conjugado anti IgG humano unido a peroxidasa o 100 µL de conjugado anti IgA humano unidos a peroxidasa respectivamente durante dos horas, lavar tres veces con PBS-Tween y se adicionaron 100 µL del sustrato orto-fenilediamina y H₂O₂ durante 30 minutos a temperatura ambiente y se interrumpe la reacción con H₂SO₄ 2.5 N y las lecturas se obtuvieron con lector ELISA a 490 nm.

RESULTADOS

Los títulos de anticuerpos hemoaglutinantes contra *Klebsiella pneumoniae* en trinomios constituidos por suero

materno, suero de cordón umbilical y calostro humano. Los títulos de anticuerpos para las muestras de suero, suero de cordón umbilical, y calostro humano por hemaglutinación pasiva y se muestran en el *cuadro 1*.

Estandarización del método inmunoenzimático para la cuantificación de anticuerpos contra *Klebsiella pneumoniae*. La concentración óptima para recubrimiento de microplacas con polisacárido de *Klebsiella pneumoniae* fue de 50 µg/mL. En el *cuadro 2* se muestran las absorbancias obtenidas para los 50 trinomios de sangre periférica, suero de cordón umbilical y calostro referidas a un suero control positivo que contiene anticuerpos de isotipo IgG e IgA de un paciente hospitalizado con hemocultivo positivo para *Klebsiella pneumoniae* y con una absorbancia de 0.557 y se tomó este valor como 100% como en trabajos previos.³⁻⁵

DISCUSIÓN

Los recién nacidos presentan una mayor susceptibilidad a las infecciones al no contar con memoria inmunológica; *Klebsiella pneumoniae* es un microorganismo que presenta una cápsula, lo que interfiere con el proceso de fagocitosis, con base en lo anterior, es importante la inmunidad pasiva materna por vía placentaria (inmunoglobulinas IgG) o por la ingestión de calostro⁶ y leche humana por anticuerpos de clase IgA; en estudios previos hemos demostrado la presencia de anticuerpos de clase IgG en cordón umbilical e IgA en calostro humano contra parásitos intestinales,⁷ y *Salmonella typhi*,⁸ sin embargo, no se ha investigado la presencia de anticuerpos de memoria inmunológica contra *Klebsiella pneumoniae* al no existir métodos comerciales para su cuantificación. Con el inmunoensayo enzimático desarrollado fue posible determinar los anticuerpos séricos y de cordón umbilical de isotipo IgG así como de calostro de isotipo IgA; para indicar las muestras positivas, se compararon los porcentajes de absorbancia de las muestras biológicas incluidas en este estudio con respecto al control positivo, como se observa en el *cuadro 2* y 10% de las muestras de suero de cordón umbilical, 26 y 24% de suero materno y calostro humano respectivamente presentaron cantidades significativas de anticuerpos contra *Klebsiella pneumoniae*; esto significa un porcentaje bajo de transferencia de anticuerpos por vía placentaria y ligeramente mayor por leche materna, ello sugiere que aún los neonatos alimentados con leche materna presentan una susceptibilidad a infección por *Klebsiella pneumoniae*, sin em-

bargo, será importante identificar la reactividad de los anticuerpos contra *Klebsiella pneumoniae* presentes en cordón umbilical y calostro humano por inmunoelectrotransferencia. Este trabajo es el primer informe sobre los mecanismos inmunitarios específicos contra *Klebsiella pneumoniae* y es importante investigar los mecanismos de resistencia no específicos presentes en calostro humano contra esta bacteria.⁹

REFERENCIAS

1. Vargas A, Escobedo A. Mercado epidemiología de las bacterias en una unidad de cuidados intensivos neonatales. Bol Med Hosp Infant Mex 1985; 42(5): 306-.
2. Hill HR, Hunt CE, Matsen JM. Nosocomial colonization with *Klebsiella* type 26 in neonatal intensive care unit associated with an outbreak of sepsis meningitis and necrotizing enterocolitis. J Pediatrics 1974; 85(3): 415-9.
3. Lascurain R, Mora JM, Acosta-Altamirano G, Santos JI. Prevalencia de anticuerpos contra *Giardia lamblia* en suero de cordón umbilical y en sangre periférica materna. Bol Med Hosp Infant Mex 1993; 50: 23.
4. Acosta AG, Cote V, Isibasi, Kumate J. Anticuerpos contra *Entamoeba histolítica* en calostro de mujeres mexicanas. Inmunología, Spain 1985; 4: 27.
5. Lin TM, Holbert SP, Chiu CT, Zarco P. Simple standardized enzyme linked immunosorbent assay for human antibodies to entamoeba histolytic. J Clin Microbiol 1981; 13: 646-51.
6. Hernell O, Ward H, Blackberg L, Pereira MEA. Killing of giardia lamblia by human milk lipases an effect mediated by lipolysis of milk lipids. J Infect Dis 1986; 153: 715-72.
7. Acosta G, Aguirre M, Santos JI, Berber EA, Kumate J. Detección de anticuerpos de clase IgA contra LPS de *Salmonella typhi* en muestras de suero y calostro humano. Perinat Rep Hum (Mex.) 1988; 2: 133.
8. Duprat C, Mohammed Z, Datta P et al. Human immunodeficiency leche humana en: Inmunología de las mucosas. Ed. Acosta G y Cruz M. DEMSA (Mex) 1992.
9. Rocha RLM, Cruz RAL, y cols. Inmunología del calostro y la leche humana en: Inmunología de las mucosas. Ed. Acosta G y Cruz M. DEMSA (Mex) 1992.

Correspondencia:

Dr. Gustavo Acosta Altamirano
Av. Instituto Politécnico Nacional 5160
Col. Magdalena de las Salinas
Deleg. Gustavo A. Madero
C.P. 07360 México, D.F.

Recibido para publicación: 5 agosto 2000
Aceptado para publicación: 20 de agosto 2000



Cuadro 1. Título de anticuerpos hemoaglutinantes contra *Klebsiella pneumoniae* en 50 trinomios de sangre periférica materna, suero de cordón umbilical y calostro.

Núm. Muestra	Suero materno	Suero cordón umbilical	Calostro
1	1 : 64	Negativo	Negativo
2	1 : 64	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	1 : 2	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo
6	1 : 2	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo
8	1 : 2	Negativo	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo
10	1 : 4	Negativo	Negativo
11	Negativo	Negativo	Negativo
12	Negativo	Negativo	Negativo
13	Negativo	Negativo	Negativo
14	Negativo	Negativo	Negativo
15	Negativo	Negativo	Negativo
16	Negativo	Negativo	Negativo
17	Negativo	Negativo	Negativo
18	Negativo	Negativo	1 : 2
19	Negativo	Negativo	1 : 8
20	1 : 32	1 : 4	Negativo
21	1 : 64	Negativo	Negativo
22	1 : 128	Negativo	Negativo
23	Negativo	Negativo	1 : 2
24	1 : 64	Negativo	Negativo
25	1 : 128	Negativo	Negativo
26	Negativo	Negativo	Negativo
27	1 : 32	Negativo	Negativo
28	1 : 16	Negativo	Negativo
29	1 : 32	Negativo	Negativo
30	Negativo	Negativo	Negativo
31	1 : 4	1 : 4	Negativo
32	Negativo	Negativo	Negativo
33	1 : 2	Negativo	Negativo
34	1 : 128	Negativo	Negativo
35	1 : 2	Negativo	Negativo
36	Negativo	Negativo	Negativo
37	Negativo	Negativo	Negativo
38	Negativo	Negativo	Negativo
39	Negativo	Negativo	Negativo
40	Negativo	Negativo	Negativo
41	1 : 16	Negativo	Negativo
42	Negativo	Negativo	Negativo
43	1 : 32	1 : 4	Negativo
44	1 : 16	Negativo	Negativo
45	Negativo	Negativo	Negativo
46	Negativo	Negativo	1 : 2
47	1 : 128	Negativo	Negativo
48	Negativo	Negativo	Negativo
49	Negativo	Negativo	1 : 2
50	Negativo	Negativo	Negativo

**Cuadro 2.** Porcentajes de absorbancias (ABS) obtenidas por ELISA de los trinomios de suero materno (SM), suero de cordón umbilical (SCU) y calostro.

Núm. muestra	% ABS SM	% ABS SCU	% ABS calostro
1	65.5	12.5	23.3
2	56.3	17.9	14.3
3	18.3	8.2	7.1
4	35.9	22.6	17.9
5	23.1	13.8	19.5
6	45.0	7.7	21.1
7	48.1	17.9	17.0
8	50.2	16.1	12.5
9	86.5	18.1	5.9
10	66.6	17.0	11.8
11	62.1	14.5	18.8
12	74.5	12.9	17.9
13	23.8	12.5	19.5
14	61.2	10.7	25.6
15	34.2	15.0	18.6
16	45.4	12.9	9.8
17	49.5	21.9	10.7
18	25.8	9.5	14.3
19	35.0	24.7	30.7
20	73.4	16.3	17.4
21	69.1	16.1	17.9
22	89.5	9.5	12.5
23	44.5	26.9	20.6
24	82.7	12.7	34.8
25	23.3	29.4	18.8
26	28.1	9.8	12.0
27	29.9	14.7	5.0
28	22.6	37.3	9.1
29	96.7	16.0	29.0
30	55.6	10.9	23.8
31	57.0	9.8	8.9
32	91.3	19.3	35.9
33	51.5	6.4	24.0
34	75.4	6.2	27.8
35	26.2	18.8	7.3
36	35.9	37.3	10.0
37	71.9	8.9	23.5
38	72.9	21.0	12.8
39	61.5	5.3	6.6
40	53.8	7.7	15.8
41	14.7	11.6	14.0
42	26.3	11.8	6.8
43	119.9	10.7	21.5
44	39.6	15.9	7.1
45	97.8	16.5	19.2
46	10.7	17.9	3.5
47	41.2	16.5	19.2
48	13.4	5.7	17.9
49	28.7	11.1	12.5
50	18.8	17.9	12.3
Control positivo	Absorbancia	0.55	100%