

Enfermedades Infecciosas y Microbiología

Volumen
Volume **21**

Número
Number **3**

Julio-Septiembre
July-September **2001**

Artículo:

Estudio de los antígenos superficiales de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*. I. Las proteínas de la membrana externa

Derechos reservados, Copyright © 2001:
Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, AC

Otras secciones de este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

Others sections in this web site:

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Medigraphic.com

Estudio de los antígenos superficiales de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

I. Las proteínas de la membrana externa

AGUSTÍN MARTÍNEZ-RAMOS,* ARMANDO ISIBASI**

RESUMEN

Antecedentes. Los antígenos superficiales de algunas bacterias Gram negativas tienen influencia sobre su virulencia y su susceptibilidad o resistencia al efecto bactericida del suero humano normal (SHN). **Objetivo.** Purificar y caracterizar por electroforesis (PAGE) las proteínas de las membranas externas (OMP por sus siglas en inglés) de dos cepas de *K. pneumoniae*, una sensible (SS) y otra resistente (SR) al efecto bactericida del suero humano normal y determinar el efecto inhibitorio de tal actividad de las OMP. **Material y métodos.** Las OMP se purificaron y se caracterizaron por electroforesis. Se determinó su influencia sobre la actividad bactericida del suero humano normal. **Resultados.** Las OMP de ambas cepas alcanzaron un alto grado de pureza, sus electrofotogramas demostraron que tienen una composición química y una distribución electroforética esencialmente idéntica. Las OMP purificadas no mostraron ningún efecto contra la actividad bactericida del SHN. **Conclusiones.** Las bacterias de estudio, independientemente de su susceptibilidad o resistencia al SHN, mostraron un alto grado de similitud lo cual concuerda con otras características establecidas en un trabajo previo.

Palabras clave: suero humano normal bactericida, proteínas de la membrana externa.

ABSTRACT

Background. Some surface antigens of different Gram-negative bacteria have some influence on the virulence of such cells and their susceptibility or resistance to the bactericidal effect of normal human serum (NHS). **Objective.** To purify and characterize by electrophoresis (PAGE) the outer membranes proteins (OMP) from a normal human serum susceptible strain and another resistant one of *Klebsiella pneumoniae* and determine the influence of these OMP on the bactericidal effect of the NHS. **Material and methods.** Bacterial OMPs were purified and electrophoretically characterized and their protective activity on bactericidal effect of NHS were determined. **Results.** The OMP of both strains reached a high grade of purity, their electropherograms demonstrated that the OMP obtained from both bacterial strains had a chemical composition and electrophoretic distribution essentially identical. The purified OMP did not show any inhibitory effect on serum bactericidal activity. **Conclusions.** Despite the serum susceptibility or resistance the strains studied showed a high degree of similarity.

Key words: normal human serum bactericidal, outer membrane proteins.

1. INTRODUCCIÓN

Diversos componentes de la superficie bacteriana parecen jugar un papel importante en la susceptibilidad o resistencia bacteriana al suero, humano o de animales,

normal o inmune. Las proteínas de la membrana externa (PME) destacan por su importancia en este proceso.¹⁻³ A las PME se les ha asignado diversas funciones como la activación del complemento vía la unión entre el componente C1q y algunas porinas, particularmente la Ompk36 de *Klebsiella pneumoniae*,⁴⁻⁶ también se les han atribuido otras funciones tan diferentes como ser los receptores de diversos bacteriófagos de *Escherichia coli*^{7,8} y se propone que son necesarias para la acción de algunas colicinas, también se les ha asignado una intervención importante en el apareamiento bacteriano en el proceso de conjugación.⁷

Las bacterias Gram negativas son notablemente sensibles al efecto bactericida del suero humano, in-

* Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología. Becario de COFAA-DEDICT IPN y del Sistema EDD-IPN Apartado Postal 4-870. CP 06400 México, D. F.

** Unidad de Inmunoquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS.

Correspondencia: Dr. Agustín Martínez Ramos. Cerrada de Popotla 19 depto. 302. Col. Popotla. CP 11400. Delegación Miguel Hidalgo. México, D. F.

mune o normal. Se ha descrito para *K. pneumoniae*, para *Francisella tularensis*, y para otras bacterias Gram negativas, que la sensibilidad o resistencia al suero humano normal, está asociada con la virulencia; las bacterias aisladas a partir de pacientes con infecciones clínicas, son en general, resistentes al suero; por su parte, las bacterias aisladas como flora normal del intestino o de otras fuentes del medio ambiente, son sensibles a dicho suero.⁹⁻¹² Jankowski y col.¹³ proponen que la resistencia al suero puede ser un factor importante que contribuye a la patogenicidad de diversas cepas de *Acinetobacter anitratus*. El efecto bactericida del suero humano normal, se considera que está asociado al complemento.¹⁴⁻¹⁶ Tanto la vía clásica como la alterna del complemento están involucradas en la actividad bactericida del suero contra cepas susceptibles de *K. pneumoniae*.⁴ El calentamiento del suero humano normal a 56°C por 30 minutos inhibe su actividad bactericida, lo cual apoya el papel del complemento como el responsable de tal actividad.

Puesto que la bacteria S^R se derivó de las cepas S^S sin utilizar agentes mutagenéticos,¹⁷ es lícito postular que las diferencias entre los materiales genéticos de cada una de las cepas son mínimas lo que las hace un instrumento para someterlas a estudios genéticos, fisiológicos, inmunológicos u otros, y así establecer alguna o algunas características que pudiesen ser las determinantes de la susceptibilidad o resistencia al suero humano normal.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

- 2.1. Microorganismos: Se utilizaron dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*, una sensible al suero humano normal (S^S) y una variante, resistente al propio suero (S^R), la cual se obtuvo a partir de la primera,¹⁷ ambas cepas pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología General del Departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.
- 2.1.1. Conservación de las cepas: las cepas se conservaron en tubos de agar de infusión de cerebro y corazón. La identidad de las cepas se determinó mediante la morfología colonial y por su respues-

ta a las pruebas bioquímicas específicas de la bacteria.¹⁸

- 2.2. Purificación de las proteínas de la membrana externa (PME). Las proteínas de las dos cepas se purificaron de acuerdo con la técnica de Schenaitman.¹⁹
- 2.3. Análisis de las PME. Las PME fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 11%.
- 2.4. Determinación de la influencia de las PME purificadas, sobre la actividad bactericida del suero humano normal. Se prepararon suspensiones de las cepas S^S y S^R y se pusieron en contacto con el suero humano normal en presencia o en ausencia de una suspensión de las PME purificadas a partir de las dos cepas de trabajo. Los experimentos se hicieron de acuerdo con una técnica ya descrita.^{17,20}
- 2.4.1. Ensayo de la actividad bactericida del suero y de la influencia de las PME. La determinación se hizo de acuerdo con el siguiente esquema: en placas de plástico estériles, de 24 pozos, se colocaron, en orden de adición, los siguientes componentes:
 - i) Regulador de fosfatos, 0.05 M, pH 7.0, en la cantidad necesaria para obtener un volumen final de 1 mL.
 - ii) 100 µL de la suspensión bacteriana estandarizada.
 - iii) 100 µL de la suspensión de PME.
 - iv) 100 µL de suero.

El sistema testigo constó de regulador y bacterias. El sistema para determinar la actividad bactericida estuvo compuesto de regulador, bacterias y suero. Los sistemas para determinar la influencia de las PME estuvieron constituidos de regulador, bacterias, las PME y el suero.

Cada sistema se mezcló vigorosamente con una micropipeta estéril, se tomó una alícuota de 100 µL y se cuantificaron las poblaciones microbianas por cuenta viable al tiempo cero del experimento y después de 60 minutos de incubación a

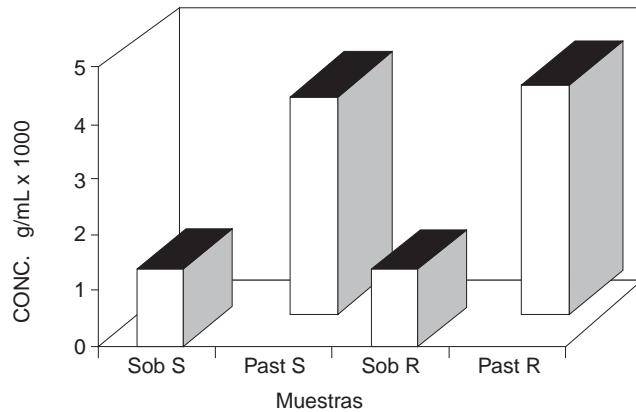
- 37°C. Para cada sistema se utilizó un testigo de bacterias en ausencia de suero.
- 2.5. Representación de los datos. Se construyeron las gráficas correspondientes y las poblaciones bacterianas se expresaron como el \log_{10} de las UFC/mL.

3. RESULTADOS

- 3.1. Se confirmó la identidad de las cepas de trabajo de acuerdo con el criterio propuesto por Mac Faddin.¹⁸ Se encontraron algunas pequeñas diferencias en la morfología colonial de las bacterias, la de la cepa S^S tenía más o menos 1.5 mm de diámetro y era poco mucoide, por su parte, la cepa S^R presentó una colonia de alrededor de tres mm de diámetro y muy mucoide.
- 3.2. El proceso de purificación de las PME fue exitoso. Los rendimientos, considerados como la concentración de proteínas totales fueron muy altos, se obtuvieron concentraciones del orden de 4.0 mg/mL. Las fracciones obtenidas después de la última centrifugación indicada en la técnica aplicada¹⁹ fueron denominadas de acuerdo con el cuadro 1.
- 3.3. Se hizo la cuantificación de las proteínas presentes en las fracciones, los rendimientos se representan en la figura 1.
- 3.4. Las PME purificadas consideradas en los sobrenadantes y en los sedimentos (cuadro 1) se solubilizaron y se sometieron a un análisis electroforético. Se utilizaron dos cantidades diferentes de cada muestra, 20 y 40 µg de proteínas totales, determinadas por el método de Lowry et al.²¹ En la figura 2 se presentan los resultados del análisis electroforético. Se utilizaron como testigos diversas proteínas de pesos moleculares conocidos.
- 3.5. Para determinar algún posible papel inhibidor de la actividad bactericida del suero humano normal contra la cepa S^S se utilizaron preparaciones de las PME de ambas cepas y se adicionaron a los sistemas de incubación en los cuales se les puso suero con un 100% de poder bactericida. Los resultados del experimento se muestran en la figura 3.

Cuadro 1. Denominación de las muestras obtenidas durante la purificación de las proteínas de las membranas externas de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

Muestra	Denominación
Sobrenadante S	Sobrenadante después de la última centrifugación.
Pastilla S	Sedimento después de la última centrifugación y disuelto en el mínimo volumen de TRIS-EDTA-TRITON X-100.
Sobrenadante R	Sobrenadante después de la última centrifugación.
Pastilla R	Sedimento después de la última centrifugación y disuelto en el mínimo volumen de TRIS-EDTA-TRITON X-100.



Simbología de la figura (Cuadro 1)

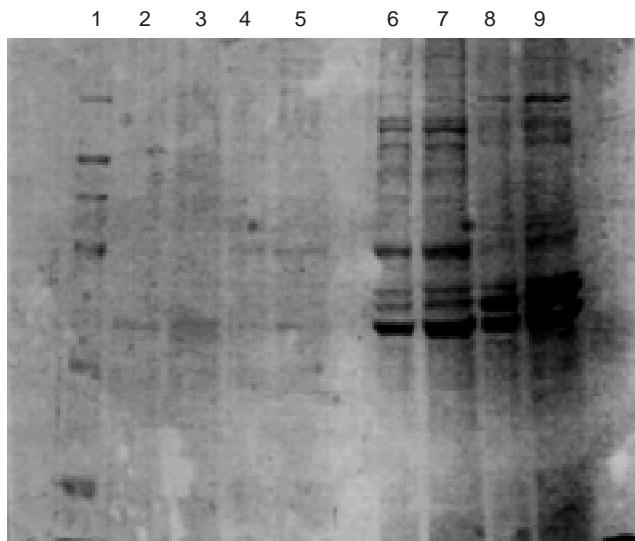
Barra	Muestra
Sob S	Sobrenadante de la cepa SS
Past S	Pastilla de la cepa SS
Sob R	Sobrenadante de la cepa SR
Past R	Pastilla de la cepa SR

Figura 1. Concentración de proteínas de las membranas externas de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

4. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue el de estudiar las dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*, establecer diferencias o similitudes entre las proteínas de sus membranas externas y determinar alguna posible relación de estas proteínas con la respuesta bacteriana al suero humano normal.

Diversos componentes de la superficie bacteriana parecen jugar un papel importante en la susceptibilidad o resistencia al suero humano normal; así se han



Simbología de la figura

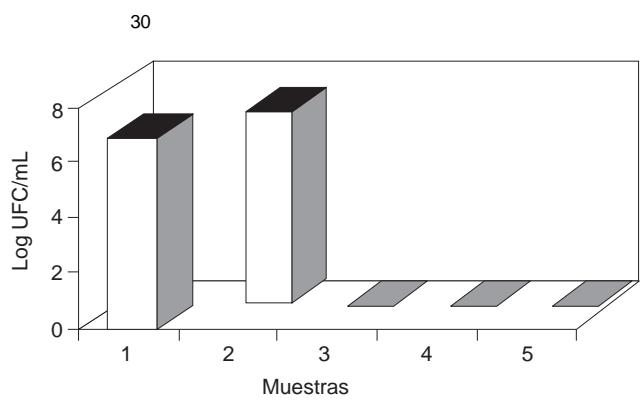
Carril	Muestra	PME (μ g Tot.)
1	Testigos de PM	30
2	Sob S ^S	20
3	Pas S ^R	20
4	Sob S ^S	20
5	Pas S ^R	20
6	Sob S ^S	40
7	Pas S ^R	40
8	Sob S ^S	40
9	Pas S ^R	40

Figura 2. Electroforesis (PAGE) de las proteínas de las membranas externas de *Klebsiella pneumoniae* S^S y S^R.

implicado algunas proteínas, al polisacárido capsular y muy importantemente al lipopolisacárido como los responsables de la respuesta bacteriana al suero.

Hildebrandt y col.,¹⁶ obtuvieron por transformación genética cepas de *Neisseria gonorrhoeae* resistentes al suero las que sufrieron cambios estructurales y antigenicos en una de las proteínas principales de la membrana externa (POMP). Las bacterias resistentes presentaron, entre otros cambios, una POMP con un peso molecular más bajo que el de la POMP respectiva de la cepa sensible. Se propone que la resistencia al suero de los gonococos, está relacionada con una POMP de un peso molecular y una antigenicidad característicos.

Alberti y col.⁴⁻⁶ han desarrollado algunos experimentos para determinar la influencia de las proteínas de las membranas externas de *Klebsiella pneumoniae* so-



Simbología de la figura

Barra	Muestra
1	Sistema testigo.
2	Bacterias en ausencia de suero, a los 60 minutos de incubación.
3	Bacterias en presencia de suero.
4	Bacterias en presencia de suero y de las PME de la cepa S ^S .
5	Bacterias en presencia de suero y de las PME de la cepa S ^R .

Figura 3. Influencia de las PME sobre la actividad bactericida del suero humano normal.

bre el efecto bactericida del suero humano normal. Encontraron que dicho efecto bactericida es inhibido significativamente por dos porinas que se unen eficientemente al componente C1q del complemento.

Patel y col.,²² determinaron que vesículas de las membranas externas de cepas suero sensibles y suero resistentes de *Neisseria gonorrhoeae*, tienen una importante influencia sobre el efecto bactericida del suero humano normal. Las vesículas de las membranas externas de una cepa resistente, adicionadas a sus ensayos bactericidas, producían una inhibición, significativamente más alta, que la producida por las vesículas de las cepas suero sensibles. Los autores encontraron que las vesículas de las cepas resistentes tienen una gran capacidad para unirse y remover factores bactericidas cuyo blanco se encuentra en la célula bacteriana y que la formación de vesículas de la membrana externa, pueden contribuir a la resistencia al suero quizás a través de las proteínas de la membrana externa.

Patel y col.³ demostraron que cuando al producirse cambios de sensibilidad a resistencia al suero normal en *Neisseria gonorrhoeae* se produjeron pequeños cambios, más cualitativos que cuantitativos de dos proteínas de 205 kDa y otra de alrededor de 16kDa: Sin em-

bargo, muchas proteínas, incluyendo las de la membrana externa, fueron más abundantes en las cepas resistentes que en las sensibles.

Rice y col.²³ trataron la proteína III de la membrana externa de *Neisseria gonorrhoeae* con anticuerpos IgG humanos purificados. Esta proteína bloqueó la actividad bactericida del suero humano normal contra el gonococo. Los autores concluyen que la proteína III en sueros normales e inmunes juega algún papel en la resistencia al suero de *Neisseria gonorrhoeae*.

Rodas Suárez y Martínez Ramos,^{24,25} trabajaron con una sustancia producida por *Klebsiella pneumoniae* que inhibía el efecto bactericida del suero humano normal. Cuando dicha sustancia se hidrolizó con una proteasa alcalina se perdió totalmente la resistencia al suero y se restauró su actividad bactericida. El tratamiento enzimático demostró que la sustancia acumulada en el medio de cultivo es de naturaleza proteica.

Según se señala en la figura 1, el proceso de purificación de las PME fue muy exitoso, de acuerdo con las concentraciones de proteínas obtenidas las cuales fueron del orden de 4.0 mg/mL.

Los últimos sobrenadantes obtenidos durante la purificación y las PME purificadas se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. En la figura 2 se aprecian resultados acerca de los cuales se pueden hacer una serie de consideraciones, a saber. Las PME purificadas se mostraron parcialmente insolubles en el Tris-EDTA-Triton X-100 utilizado al final de la purificación, de modo que con ellas se producían suspensiones de naturaleza coloidal, este fenómeno podría haberse debido a la alta concentración de dichas proteínas, ya que cuando éstas eran suspendidas en los reactivos de la técnica de Lowry et al²¹ para su cuantificación, o cuando se sometían al tratamiento térmico previo a su electroforesis, se lograba su solubilización.

Los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes y de los sedimentos son esencialmente idénticos, tanto en número como en intensidad de las bandas mostradas en el electroferograma (figura 2).

La figura 3 muestra que las PME no tienen ninguna influencia sobre la actividad del suero humano normal. De acuerdo con las barras 1 y 2, la población bacteriana utilizada en el experimento era de alrededor de 2×10^7 UFC/mL, antes y después de la incubación a

37°C y en ausencia de suero. En la barra 3 se observa un efecto bactericida del 100% del suero humano normal. Las barras 4 y 5 en las que se determinó la actividad bactericida del suero en presencia de las PME de las dos cepas de trabajo, muestran que éstas no tuvieron ninguna influencia sobre tal actividad.

Se puede concluir que las dos cepas bacterianas son sensiblemente parecidas entre sí, excepto en su susceptibilidad o resistencia al suero.

REFERENCIAS

- Patel PV, Martin PM, Tan EL, Nairn CA, Parsons NJ, Goldner M, Smith H. Protein changes associated with induced resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to killing by human serum are relatively minor. *J Gen Microbiol* 1988;134:499-507.
- Sorokin VM, Pavlovich NV, Prozorova LA. *Francisella tularensis* resistance to bactericidal action of normal human serum. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996;13:249-252.
- Taylor PW, Parton R. A protein factor associated with serum resistance in *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 1977;10: 225-232.
- Alberti S, Marquez G, Camprubi S, Merino S, Tomas JM, Vivanco F, Benedi VJ. C1Q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. *Infect Immun* 1993;61:852-860.
- Alberti S, Rodriguez-Quinones F, Schrimmer T, Rummel G, Tomas JM, Rosenbush JP, Benedi VJ. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect Immun* 1995;63:903-910.
- Alberti S, Marques G, Hernandez-Allez S, Rubires X, Tomas JM, Vivanco F, Benedi VJ. Interaction between complement subcomponent C1Q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infect Immun* 1996;64: 4719-4725.
- Cole ST, Chen-Schmeisser U, Hindennach I, Henningm U. Apparent Bacteriophage-binding region on an *Escherichia coli* K-21 outer membrane protein. *J Bacteriol* 1983;153:581-587.
- Schneider H, Fsihi H, Kottwitz B, Mygind B, Bremer E. Identification of a segment of the *Escherichia coli* Tsx protein that functions as a bacteriophage receptor area. *J Bacteriol* 1993;175:2809-2817.
- Berge GR. Bactericidal activity of human serum against strains of *Klebsiella pneumoniae* from different sources. *J Med Microbiol* 1988;27:11-15.
- Morello JA, Bohnhoff M. Serovars and serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae* from disseminated and uncomplicated infections: *J Infect Dis* 1989;160:1012-1017.
- Pavlovich NV, Sokorin VM, Blagorodova NS. The resistance of *Francisella tularensis* to the bactericidal action of normal human serum as a criterion for evaluating the virulence of the bacterium. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immun* 1996;1:7-10.
- Wilson ME, Burnstein R, Jonak-Urbanczyk JT, Genco RJ. Sensitivity of *Capnocytophaga* species to bactericidal properties of human serum. *Infect Immun* 1985;50:123-129.
- Jankowski S, Grzybek-Hryncewicz K, Fleischer M, Walczuk M. Susceptibility of isolates of *Acinetobacter anitratus* and *Acinetobacter iwoffii* to the bactericidal activity of normal humans serum. *FEMS Microbiol Immunol* 1992;4:255-260.

14. Arko RJ, Chen CY, Schalla WO, Serafian SK, Taylor CL, Knapp JS, Morse SA. Binding of S protein by *Neisseria gonorrhoeae* and its potential role in invasion. *J Clin Microbiol* 1991;29:70-75.
15. Ciurana B, Tomas JM. Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to nonimmune serum. *Infect Immun* 1987;55: 2741-2746.
16. Hildebrandt JF, Mayer LW, Wang SP, Buchanan TM. *Neisseria gonorrhoeae* acquires a new principal outer-membrane protein when transformed to resistance to serum bactericidal activity. *Infect Immun* 1978;20: 267-273.
17. Martínez Ramos A, & M. del C. Capetillo Paredes. Caracterización de una variante de *Klebsiella pneumoniae* resistente al suero humano normal derivada de la cepa sensible. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 1997; 17: 113-120.
18. Mac Faddin JF. Biochemical tests for the identification of medical bacteria. USA. The Williams and Wilkinson Co. 1976.
19. Schnaitman CA. Effect of ethylenediamine tetraacetic acid, Triton X-100 and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolated cell walls of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1971;108:553-563.
20. Martínez RA, Williams RP. Filtrados de cultivos de *Neisseria gonorrhoeae* GC-9(T4) que la protegen del efecto bactericida del suero humano normal. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 1996;16(6): 246-254.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-275.
22. Petit RK, Judd RC. The interaction of naturally elaborated blebs from serum-susceptible and serum resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* with normal human serum. *Mol Microbiol* 1992;6:729-734.
23. Rice PA, Vayo HE, Tam MR, Blake MS. Immunoglobulin G antibodies directed against Protein III block killing of serum-resistant *Neisseria gonorrhoeae* by immune serum. *J Exp Med* 1986;164:1735-1748.
24. Rodas SO, Martínez RA. Substancia producida por *Klebsiella pneumoniae* que la protege del efecto bactericida del suero humano normal. *Rev Lat-amer Microbiol* 1991;33:1-5.
25. Rodas SO, Martínez RA. Caracterización de una substancia que protege a *Klebsiella pneumoniae* del efecto bactericida del suero humano normal. *Rev Lat-amer Microbiol* 1992;34:77-81.