

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*. II. El lipopolisacárido

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](#)



www.medigraphic.com

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

II. El lipopolisacárido

AGUSTÍN MARTÍNEZ-RAMOS,* ARMANDO ISIBASI**

RESUMEN

Antecedentes. El lipopolisacárido (LPS) de diversas bacterias gram negativas tiene influencia sobre su virulencia y su susceptibilidad o resistencia al suero humano normal. Entre otras funciones al LPS se le ha atribuido la de proteger a dichas bacterias contra el efecto bactericida del suero humano normal (SHN). **Objetivo.** Purificar los LPSs de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* una susceptible y otra resistente al efecto bactericida del SHN, hacer un análisis de su composición química y establecer la influencia que puedan tener sobre la actividad letal del SHN. **Material y métodos.** Se purificaron los LPS de las cepas y se les determinó su contenido de carbohidratos, de KDO de ácidos grasos y su influencia sobre el efecto bactericida del suero humano normal. **Resultados.** Se determinaron pequeñas diferencias en la composición química de los dos LPSs las cuales fueron más cuantitativas que cualitativas. Los LPSs purificados mostraron un efecto protector del 100% contra la actividad bactericida del suero. **Conclusiones.** Desde el punto de vista de su composición química los LPSs purificados fueron, en general, muy parecidos entre sí. Se determinó la capacidad del LPS de proteger a la cepa sensible contra la actividad bactericida del suero humano normal.

Palabras clave: lipopolisacárido efecto protector, suero humano normal.

ABSTRACT

Background. The lipopolysaccharide (LPS) of several Gram negative bacteria have influence on their virulence and on the normal human serum (NHS) susceptibility or resistance. Among several biological roles the LPS has showed to protect some Gram negative bacteria from being killed by NHS. **Objective.** Purify the LPSs of two strains of *Klebsiella pneumoniae* a serum susceptible one and another serum resistant one. Attempts to make an analysis of their chemical composition and the influence that the purified products have on the lethal activity of the SHN were carried out. **Material and methods.** The LPS of both bacterial strains were purified and their content in carbohydrates, KDO and fatty acids as well as their influence against the bactericidal effect of NHS, were determined. **Results.** In relation with their chemical composition small differences were determined for both purified LPSs which were more quantitative than qualitative. The purified LPSs showed a 100% protective effect against bactericidal activity of NHS. **Conclusions.** The chemical composition of purified LPSs had a high grade of similarity. Purified LPSs protected serum susceptible bacterial strain from being killed by NHS.

Key words: lipopolysaccharide protective effect, normal human serum.

1. INTRODUCCIÓN

El lipopolisacárido (LPS) es un importante determinante de la virulencia de bacterias Gram negativas así como de su sensibilidad o resistencia al suero humano normal. Se ha encontrado que, en general, el

LPS influye notablemente en estas propiedades y que las bacterias Gram negativas cuyo LPS es de tipo liso y completo, incluyendo la cadena lateral O son virulentas y resistentes al suero. Por otra parte, las bacterias que tienen el LPS rugoso o incompleto, generalmente carente de la cadena lateral O, son avirulentas y susceptibles al suero. Lo anterior es válido para bacterias Gram negativas tan diferentes como *Klebsiella pneumoniae*, *Francisella tularensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campilobacter jejuni*, *Acinetobacter baumannii* y otras.¹⁻⁶

Martínez Ramos y Capetillo Paredes⁷ aislaron una variante de *Klebsiella pneumoniae* resistente al suero humano normal (S^R), a partir de la cepa sensible (S^S), las cuales se han utilizado para hacer estudios com-

* 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.

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

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

parativos desde los puntos de vista fisiológico, bioquímico y genético, encaminados a la determinación de algunas similitudes o diferencias que pudieran ser las determinantes de la susceptibilidad o resistencia al suero humano normal de dichas cepas.

En este trabajo se describe la purificación de los LPSs de las dos cepas bacterianas a los cuales se les establecieron algunas características de su composición química y se puso de manifiesto su efecto protector de las bacterias contra la actividad letal del suero humano normal.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas: Se trabajó con dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* una sensible y otra resistente al suero humano normal,⁷ las que se conservaron por resiembras periódicas en agar infusión de cerebro y corazón (agar BHI).

2.2. Obtención de los lipopolisacáridos. Los lipopolisacáridos, se prepararon a partir de las dos cepas, por el método de extracción con fenol-agua de Westphal⁸ y por el método de Darveau y Hanckock.⁹

2.3. A los lipopolisacáridos se les hicieron las siguientes determinaciones analíticas:

2.3.1. Determinación de carbohidratos totales de acuerdo con el método de Dubois et al.¹⁰

2.3.2. Determinación de 2-ceto-3-desoxioctolusinato (KDO) por el método de Karkanis.¹¹

2.3.3. Análisis por cromatografía de gases de los carbohidratos y de los ácidos grasos. Se obtuvieron los derivados metilados de los carbohidratos y de los ácidos grasos de los LPSs. Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes:

Cromatógrafo: Perkin Elmer. Columna: DEGS al 3%. Temperatura de la columna: 185°C. Gas acarreador: Nitrógeno (40 mL/minuto). Temperatura del inyector: 260°C. Temperatura del detector (FID): 280°C. Velocidad del papel: 40 mm/minuto. Al aparato se le inyectaron 5 µL de las muestras. Para la determinación de los carbohidratos se utilizaron diversas hexosas como testigos. Para la determinación de los ácidos grasos se utilizaron como testigos los productos de 12 a 24 átomos de carbono, el

ácido β-OH-mirístico y el ácido linolénico (ácido Δ 9-12-15 octodecatienoico). La identificación de los componentes de los LPSs se hizo por comparación de los tiempos de retención de los testigos y de los problemas. La comprobación de la identidad de los componentes de los LPSs se hizo de la siguiente manera: se inyectaron al cromatógrafo 2.5 µL del testigo correspondiente e hizo el corrimiento cromatográfico. Se obtenía un pico con un área determinada. Después se inyectaron 2.5 µL de problema y al tiempo de retención correspondiente al testigo se obtenía un pico con un área equivalente a la de éste. Por último se inyectó al aparato una mezcla con 2.5 µL del testigo y 2.5 µL del problema. Se corrió la muestra y cuando los compuestos eran idénticos se obtenía un pico con un área del doble de tamaño del área del testigo o del problema cuando se analizaron por separado.

2.3.4. Influencia de los LPSs purificados sobre la actividad bactericida del suero humano normal. Esta determinación se hizo de acuerdo con un método ya descrito^{7,12} el cual en forma resumida se desarrolló como sigue:

En una placa de plástico, de 24 pozos, para cultivo de tejidos, se colocaron suspensiones de la bacteria sensible al suero S^S, suero humano normal y las muestras de LPSs purificados en volúmenes de 100 µL de cada uno de los componentes de la mezcla. Los productos del sistema de reacción se mezclaron por agitación de la placa y se tomaron alícuotas para hacer una cuenta viable al tiempo cero del experimento. La placa se incubó a 37°C por 60 minutos, tiempo después del cual, se tomaron nuevas alícuotas para repetir las cuentas viables. Los resultados se determinaron por comparación de las poblaciones bacterianas iniciales y sobrevivientes después de la incubación.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de los LPSs. Los LPSs de las cepas de trabajo, purificados por los dos métodos^{8,9} se so-

metieron a una serie de análisis cuyos resultados, en conjunto, fueron considerados más como un criterio de pureza de los LPSs, que como un interés particular de conocer su composición química y su estructura.

- 3.1.1. Los resultados de los carbohidratos determinados por cromatografía de gases, son los del cuadro 1. Se establecieron las relaciones mostradas en el propio cuadro.
- 3.2.1. En el cuadro 2 se ilustran los resultados de los ácidos grasos determinados a partir de los LPSs.
- 3.3.1. Los carbohidratos totales se cuantificaron únicamente para las muestras de LPSs obtenidos por extracción con fenol-agua,⁸ y se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 1.
- 3.4. En la figura 2 se representan las concentraciones de KDO determinadas a las muestras de LPS purificadas de acuerdo con los métodos descritos.^{8,9}
- 3.5. Influencia de los LPSs purificados sobre la actividad bactericida del suero humano normal. El principal objetivo del trabajo fue determinar el efecto protector que los LPSs purificados tenían contra la actividad bactericida del suero humano normal sobre *Klebsiella pneumoniae* cepa S^S. Esta determinación se hizo mediante el ensayo descrito en trabajos previos.^{7,12} Los resultados de este ensayo están ilustrados en la figura 3.

4. DISCUSIÓN

El LPS tiene una serie de características que lo hacen una molécula única y muy especial por ejemplo: su composición química, su intervención en la virulencia de algunas bacterias Gram negativas y su intervención como determinante en la susceptibilidad o resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero humano normal (SHN). El peso molecular y la composición química de la molécula son de capital importancia en estos fenómenos, así los LPSs de alto peso molecular y de tipo liso, en general, determinan que las bacterias Gram negativas sean virulentas, lo contrario es cierto, es decir, LPSs de bajo peso molecular y rugosos son característicos de las bacterias sensibles al suero y de las avirulentas.^{3,4, 6,12-16}

En este trabajo se utilizaron dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*,⁷ una sensible al suero (S^S) y otra resis-

tente al producto (S^R). Los experimentos se encaminaron a la determinación de una serie de propiedades de los LPS de ambas cepas, con la intención de hacer un estudio más comparativo que analítico de las cepas y de los LPSs.

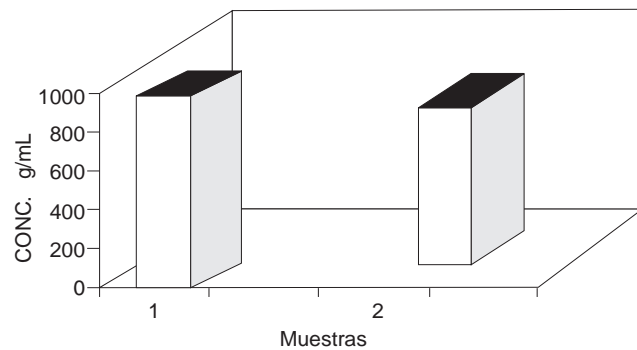
Los resultados, en conjunto, permitieron establecer que los LPSs de las dos cepas de estudio son muy parecidos entre sí desde el punto de vista de su composición química y de su papel como inhibidor de la actividad bactericida del suero humano normal, contra la cepa S^S.

El cuadro 1 señala algunas diferencias entre los carbohidratos componentes de los LPSs, en función del método utilizado para su purificación. Para el producto purificado por el método de Westphal,⁸ se determinaron tres monosacáridos en las proporciones señaladas en el propio cuadro. Para el LPS de la cepa S^S, las concentraciones de carbohidratos son muy parecidas entre sí. En cambio, para el LPS de la cepa S^R, la relación está francamente a favor de la galactosa (11.1 veces más que glucosa y 4.8 veces más que manosa). Por el método de Darveau,⁹ sólo se determinaron dos monosacáridos como componentes de los LPSs. Para las dos cepas se encontraron concentraciones ligeramente mayores de manosa que de glucosa. La composición química de los LPSs de diversas bacterias tiene una amplia variedad. Se debe de tomar en consideración que los análisis de nuestros productos fueron muy elementales pero la composición química que se determinó con relación a los carbohidratos es similar a la de otras muchas bacterias.^{9,17-21} Cuantitativamente, la concentración de carbohidratos totales (figura 1), fue ligeramente superior para el LPS de la cepa S^S que para el producto obtenido a partir de la cepa S^R, cuando ambos productos fueron purificados por el método de Westphal.⁸

Se pueden hacer consideraciones semejantes con respecto a los ácidos grasos componentes de nuestros

Cuadro 1. Relación de carbohidratos determinadas a las muestras de LPSs.

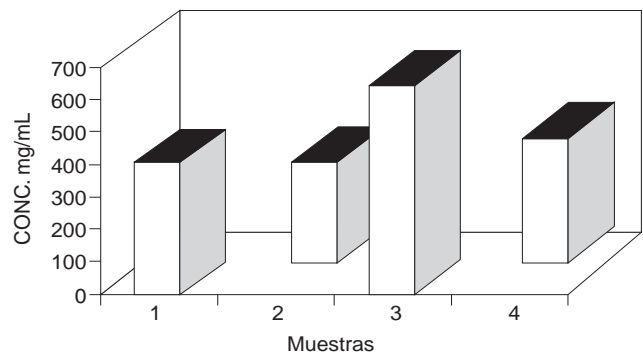
Método de purificación	Cepa S ^S Carbohidrato/relación	Cepa S ^R
Extracción con fenol-agua (8)	Man-Gal-Glu/ 1.0-1.8-2.4	Man-Gal-Glu/ 2.3-11.1-1.0
Método de Darveau (9)	Man-Glu/3.3-1.0	Man-Glu/2.8-1.0



Simbología de la figura

Barra	Muestra
1	LPS de la cepa S ^S
2	LPS de la cepa S ^R

Figura 1. Concentración de los carbohidratos totales de los lipopolisacáridos preparados por extracción con fenol-agua (8), a partir de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* (S^S y S^R).



Simbología de la figura

Barra	Muestra
1	LPS de la cepa S ^S preparado con fenol-agua
2	LPS de la cepa S ^S preparado según Darveau
3	LPS de la cepa S ^R preparado con fenol-agua
4	LPS de la cepa S ^R preparado según Darveau

Figura 2. Concentración de 2-ceto-3-desoxi-octolusonato (KDO) de los lipopolisacáridos preparados por extracción con fenol-agua⁸ y por el método de Darveau⁹ a partir de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* (S^S y S^R).

Cuadro 2. Ácidos grasos determinados a las muestras de LPSs.

Método de purificación	Cepa S ^S	Ácido graso	Cepa S ^R
Extracción con fenol-agua ⁸	β-OH-mirístico Palmítico Esteárico Linolénico		β-OH-mirístico Palmítico Esteárico Linolénico
Método de Darveau ⁹	β-OH-mirístico-palmítico-esteárico		β-OH-mirístico-palmítico-esteárico

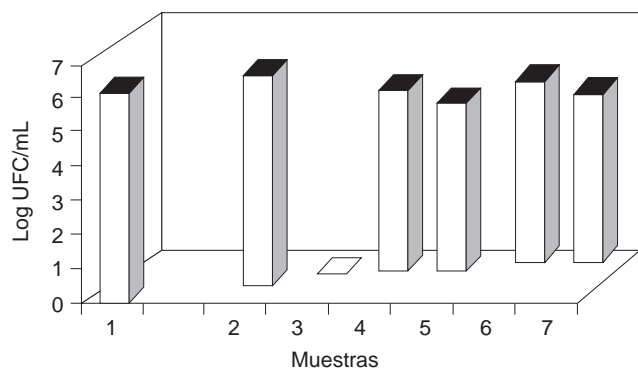
productos (cuadro 2). Los dos LPSs de ambas cepas, purificados por dos métodos, dieron una composición química sensiblemente parecida entre sí, aunque por el método de Darveau⁹ no se encontró el ácido linolénico. No tenemos explicación para esto último.

La figura 2 muestra que la concentración de 2-ceto-3-desoxi-octolusonato fue mayor para los LPSs obtenidos por el método de Westphal⁸ que para el preparado por el método de Darveau⁹, lo cual es cierto para ambas cepas.

Llama la atención el hecho que, dentro de algunos límites, los productos analizados a partir de los LPSs de ambas cepas de trabajo de los carbohidratos totales, el KDO y los ácidos grasos, los rendimientos fueron superiores para el LPS preparado por extracción con fenol-agua⁸ que por el método de Darveau⁹ lo que su-

giere una menor degradación de los productos con el primer método.

Es un hecho ampliamente conocido que el LPS tiene efecto protector contra la actividad bactericida del suero humano normal.^{2-4,6,7,13-16,22,23} De acuerdo con los resultados de la figura 3, nuestros LPS protegieron a la cepa S^S contra el efecto letal del suero. Los resultados se interpretan como sigue: en la columna 1 se representa la población sensible al suero en ausencia de éste; la columna 2 es la de la misma población después de 60 minutos de incubación a 37°C; la supervivencia fue de un 100%. La suspensión bacteriana sometida a la actividad del suero se encuentra representada en la columna 3, dicha actividad bactericida fue del 100%, no hubo supervivientes. Las columnas 4, 5, 6 y 7 son las de los sistemas en los que las bacterias se incuba-



Simbología de la figura

Barra	Muestra
1	Testigo al tiempo cero
2	Testigo a los 60' de incubación
3	Bacterias en presencia de suero humano normal
4	Bacterias en presencia de LPS de S ^S según Westphal ⁸
5	Bacterias en presencia de LPS de S ^R según Westphal ⁸
6	Bacterias en presencia de LPS de S ^S según Darveau ⁹
7	Bacterias en presencia de LPS de S ^R según Darveau ⁹

Figura 3. Inhibición del efecto bactericida del suero humano normal por los lipopolisacáridos de *Klebsiella pneumoniae* preparados por extracción con fenol-agua⁸ y por el método de Darveau⁹ a partir de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae* (S^S y S^R).

ron en presencia de suero con la adición de los LPS; la altura de las columnas demuestra que en presencia de estos LPS el suero no tiene ninguna actividad bactericida ya que la supervivencia de las bacterias fue total.

Es evidente que las diferencias establecidas entre la composición química de los LPSs de las dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*, no tienen ninguna influencia sobre la actividad inhibitoria de los compuestos contra el efecto bactericida del suero humano normal, puesto que, independientemente de dichas composiciones químicas, ambos productos mostraron un efecto protector del 100%.

REFERENCIAS

- Whitfield C, Richards JC, Perry MB, Clarke BR, MacLean LL. Expression of two structurally distinct D. Galactan O-antigens in the lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1. J Bacteriol 1991;173:1420-1431.
- Pavlovich NV, Sorokin VM, Blagorodova NS. The resistance of *Francisella tularensis* to the bactericidal action of normal serum as criterion for evaluating the virulence of the bacterium. Zh Mikrobiol Epidemiol 1996;1:7-10.
- Schiller NL. Characterization of the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to complement-mediated killing: role of antibodies to the rough lipopolysaccharide on serum-sensitive strains. Infect Immun 1988;56:632-639.
- Ciurana B, Tomas JM. Role of lipopolysaccharide and comple-

ment in susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to nonimmune serum. Infect Immun 1987;55: 2741-2746.

- Pérez-Pérez GI, Blaser MJ. Lipopolysaccharide characteristics of pathogenic *Campylobacters*. Infect Immun 1985;47:353-359.
- Cervi BM, Monetto AM. Behaviour of *Acinetobacter* strains with normal human serum. Cent Eur J Public Health 1996;4(3): 197-200.
- Martínez RA, Capetillo PMC. Caracterización de una variante de *Klebsiella pneumoniae* resistente al suero humano normal, derivada de la cepa sensible. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1997;17(4):113-120.
- Westphal O, Jann J. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods in Carbohydrate Chemistry. Acad Press NY USA 1967;5:83-91.
- Darveau RP, Hancock RE. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. J Bacteriol 1983;155(2):831-838.
- Dubois M, Gilles KA, Jamilton JK, Roberts PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956;28:350.
- Karkanis YD, Zeltner JY, Jackson JJ, Carlo DJ. A new improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. Anal Biochem 1978;85:595-601.
- 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.
- González VG, Pérez-Pérez GI, Washburg RG, Blaser MJ. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the bactericidal activity of human serum. Helicobacter 1996;1(1):28-23.
- Jankowski S, Grzybek-Hryncenicz K, Fleischer M, Walczuk M. Susceptibility of isolates of *Acinetobacter anitratus* and *Acinetobacter lwoffii* to the bactericidal activity of normal human serum. FEMS Microbiol Immunol 1992;4:255-260.
- Sorokin VM, Pavlovich NV, Prozorova LA. *Francisella tularensis* resistance to bactericidal action of normal human serum. FEMS Immunol Med Microbiol 1996;13(3): 249-252.
- Taylor PW. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gram-negative bacteria. Microbiol Revs 1983;47:46-83.
- Altman E, Brisson JR, Perry MB. Structure of the O-antigen polysaccharide of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 3 (ATCC 27090) lipopolysaccharide. Carbohydr Res 1988;15: 245-258.
- Kol O, Wieruszkeski JM, Strecker G, Montreuil J, Fournet B, Zalisz R, Smets P. Structure of the O-specific polysaccharide chain from *Klebsiella pneumoniae* 01K2 (NCTC 5055) lipopolysaccharide. Carbohydr Res 1991;18:117-125.
- Richards JC, Leitch RA. Elucidation of the structure of the *Pasteurella haemolytica* serotype T10 lipopolysaccharide O-antigen by n.m.r. spectroscopy. Carbohydr Res 1989;186:275-286.
- Stukalova NV, Karabat VI, Aleksakhina NN, Basnakian IA, Mirasova LV. The isolation and study of lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae* vaccinal strain 204. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1997;1:39-42.
- Whitfield C, Perry MB, MacLean LL, Yu SH. Structural analysis of the O-antigen side chain polysaccharide in the lipopolysaccharides of *Klebsiella* serotypes O2(2a), O2(2a,2b) and O2(2a,2c). J Bacteriol 1992;174:4913-4919.
- Joiner KA. Complement evasion by bacteria and parasites. Ann Rev Microbiol 1988;42:201-230.
- Kumar S, Mathur MD. Sensitivity to the bactericidal effect of human serum of *Proteus* strains from clinical specimens. Indian. J Pathol Microbiol 1997;40(3):335-338.