



Reconocimiento de la variabilidad de los exoproductos de *Pseudomonas aeruginosa* en medios de cultivo y en infecciones clínicas

Nina Polanco¹.
J.A. O'Daly².

¹M. Sc. Inmunología Laboratorio de Patogenicidad Bacteriología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.
nina.polanco@ucv.ve

²Ph.D. Inmunquímico Chief Scientific Officer Astralis LTD. New Jersey 07936, USA. jaocjesus@hotmail.com

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 12 de Agosto del 2017 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistió en determinar mediante immunoblotting, frente a sueros de pacientes con diversas patologías por *P. aeruginosa*, la posible relación entre los exoproductos de este bacilo en los cultivos, con los liberados durante la infección clínica. Los exoproductos de tres cepas reaccionaron con todos los sueros, algunos exoproductos de dos cepas no reaccionaron con ningún suero. Proteínas de PM similar al de la exotoxina A, reaccionaron con todos los sueros.

Proteínas de PM similar a la exoenzima S, no presentaron reacción alguna. Los sueros revelaron antígenos no visibles en la electroforesis. Estos resultados sugieren que no hay una correspondencia directa entre los exoproductos de *P. aeruginosa* en los medios de cultivo con los producidos y liberados durante la infección clínica, con lo cual se manifiesta la existencia de procesos regulatorios diferentes en la expresión de los mismos, ya sea en los medios de cultivo o en los tejidos.

PALABRAS CLAVE: Immunoblotting, *Pseudomonas aeruginosa*, exoproductos, variabilidad antigénica, quorum sensing, infección clínica.

RECOGNITION OF THE VARIABILITY OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA CULTURE MEDIUM EXOPRODUCTS WITH PROTEINS SECRETED TO TISSUE IN HUMAN INFECTION.

SUMMARY

Exoproducts from cultures were compared with the molecules released during the clinical infection using sera from patients with different pathologies infected with *P. aeruginosa*. Exoproducts from three strains reacted with all sera, contrary to two strains which did not react with any sera. A protein with MW similar to Exotoxin A, was released to cultures by two strains that reacted with all sera tested, contrary to a protein of MW similar to exoenzyme S, that did not react with any of the sera tested. Sera immunoblotting revealed antigens non visible in the electrophoresis. These results suggest there is no direct correspondence between the secreted proteins to culture of *P. aeruginosa* with the secreted molecules during the clinical infection, suggesting different regulatory processes that are inducing differential expression of molecules in cultures or tissues of the infected host.

KEY WORDS: Immunoblotting, *Pseudomonas aeruginosa*, exoproducts variability, quorum sensing, clinical infection.

RECONOCIMIENTO DE LA VARIABILIDAD DE LOS EXOPRODUCTOS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN MEDIOS DE CULTIVO Y EN INFECCIONES CLÍNICAS

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que coloniza exitosamente una enorme diversidad de nichos (1). Este hecho es indicativo de su gran capacidad de adaptación no común en todas las bacterias. Es el único caso conocido de una bacteria ambiental en la que todos los aislamientos son potencialmente patógenos para el hombre (2). Debido a ésto y a la alta resistencia natural a distintos antibióticos y desinfectantes (3), representa un problema importante de salud en los centros hospitalarios, donde es aislada con frecuencia de pacientes que tienen enfermedades de base tales como: cáncer (4), quemaduras y heridas quirúrgicas (5), fibrosis quística (6), infecciones urinarias (7), septicemias (8), meningitis (9), infecciones del tracto respiratorio sobre todo en aquellos pacientes que han sido sometidos a ventilación forzada y/o instrumentación quirúrgica (10). Durante una infección por *P. aeruginosa* el hospedador tiene que enfrentarse con los factores patógenos asociados a la célula bacteriana (11,12), así como a una gran variedad de exoproductos que es capaz de sintetizar, tales como, exoenzimas, polisacáridos, pigmentos y diversos metabolitos, cada uno de los cuales ha sido determinante en su acción patógena sobre una variedad de estructuras y funciones celulares, ya sean de los tejidos o del sistema inmunológico. Entre las enzimas liberadas que intervienen en la patogenia de este bacilo

encontramos la exotoxina A, enzima muy potente que además de inhibir la síntesis de proteínas ejerce un papel inmunosupresor sobre los linfocitos B y T humanos (13, 4, 15), las exotoxinas S y T que bloquean la transducción de señales de la célula infectada mediante su actividad de ADP-ribosiltransferasa, y la exotoxina Y que eleva el Amp cíclico intracelular por su actividad de adenilato ciclasa (16). La exotoxina S también interviene en la fijación bacteriana a las células del hospedador y además tiene un papel inmunosupresor (13,17). Las proteasas de este bacilo tienen amplia especificidad sobre sustratos que se encuentran en los tejidos del hospedador tales como la elastina, el colágeno, la transferrina y las inmunoglobulinas (18,19), por otra parte, tienen efecto inhibitorio sobre la respuesta inmune local proveyendo un medio ambiente favorable para la colonización y establecimiento de la infección crónica (20,21). Las hemolisinas de esta bacteria inducen la liberación de mediadores inflamatorios (22, 23). Otras macromoléculas como el *slime* o exomucopolisacárido, tienen la capacidad de alterar marcadamente la motilidad, la endocitosis y la formación del fagosome en los neutrófilos humanos normales. La glicoproteína de esta macromolécula activa la vía alterna del complemento, suprime la respuesta de inmunoglobulina G (IgG), actúa como un mitógeno policlonal e induce la producción de interleukinas en los macrófagos (24). Las piocinas producidas por este bacilo incrementan la liberación de la interleukina 8, contribuyen a la infiltración de los neutrófilos y al subsecuente daño tisular, y también inhiben el estímulo de linfocitos T inducido por antígenos específicos (25). Estos factores no se producen constitutivamente, su producción es regulada por diversos estímulos externos. En los últimos años el interés en el estudio de la regulación de estos exoproductos ha aumentado significativamente, debido a ello se pudo demostrar que la producción de algunos de estos factores, es regulada por un sistema denominado "*Quorum sensing*". El *quorum sensing* es el mecanismo por el cual, una bacteria produce una pequeña molécula difusible que puede ser detectada por los organismos que se encuentran alrededor. En *P. aeruginosa* y en la mayoría de los bacilos gram negativos estas moléculas de señalización son acil-homoserin-lactonas (AHLs). Cuando la concentración de estas moléculas aumenta por el incremento en la población celular, su concentración intracelular alcanza valores lo suficientemente altos para inducir la activación de los reguladores transcripcionales. Hay dos sistemas *quorum sensing* en *P. aeruginosa*, el sistema *las*, el cual consiste en el sistema regulador transcripcional LasR y LasI, esencial para la producción de la molécula-señal AHL. LasR requiere de la homoserin-lactona para convertirse en un transcriptor activo (26,27). El otro sistema *quorum sensing* consiste de RHII y RHIR. La RHII sintetasa produce la AHL N-butyryl-L-homoserine lactona (C4-HSL) y el RhIR es el regulador transcripcional que regula la expresión de varios genes solamente cuando forma un complejo con C4-HSL (28,29). Recientemente se ha demostrado el regulador QScR que regula la transcripción de *lasI* y RHII (30). Este mecanismo de comunicación capacita a la bacteria para actuar de manera coordinada en la regulación de la expresión de genes de virulencia dándole a la bacteria una ventaja selectiva sobre las defensas del hospedador, hecho importante en la patogénesis de este microorganismo. En un trabajo previo se describió, que en los medios de cultivo ocurre variabilidad en la expresión de los exoproductos en distintas cepas de *P. aeruginosa* aisladas de diferentes muestras clínicas (31), por lo cual se planteó investigar la posible relación entre los exoproductos detectados en los cultivos de diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* con los excretados durante la infección tisular *in vivo* a través de su reacción con sueros de pacientes con diferentes patologías ocasionadas por este bacilo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material de estudio estuvo constituido por exoproductos de cinco cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de pacientes con diferentes cuadros clínicos (31). Las muestras de sangre para la obtención de los sueros tanto de los pacientes con patología infecciosa (Tabla 1) como de los controles sanos sin historia de infección por este microorganismo, se llevaron a cabo siguiendo las normas del código de Bioética y Bioseguridad del Fonacit (32).

- Immunoblotting (Inmunotransferencia).

En una primera fase se separaron los antígenos excretados en medio líquido por *P. aeruginosa* (31) mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida al 10%, siguiendo el método de Laemmli (33). En el gel preparativo de un solo pozo de 7,35 cm. de largo y 1,5 mm. de ancho se colocó en buffer de disociación, 25µl de cada muestra conteniendo 2.000 µg. de proteínas. Los controles de Peso Molecular fueron: Albúmina bovina (66.000 D), Ovoalbumina (45.000 D), Anhidrasa carbónica (31.000 D) y Lisozima (31.000 D) (Bio-Rad). Los pesos moleculares de las diversas bandas proteicas fueron calculados con una curva de regresión lineal (Quantity One Gel Documentation System-Bio-Rad). La electroforesis se realizó en un aparato Miniprotean III (Bio-Rad), a 100 voltios y a temperatura ambiente durante un período aproximado de 3 horas. Posteriormente se extrajo el gel, y del mismo se separó la porción que contenía los controles de Peso Molecular y una parte de la muestra, se fijó con etanol 30%-ACoH 7% y se coloreó con *Comassie brilliant blue* al 0,05%. El resto del gel se usó para la transferencia de la muestra al papel de nitrocelulosa, el cual se realizó en la cámara Mini-trans-blot de electroforesis de transferencia (Bio-Rad). Después, se retiró el gel se coloreó con *Comassie brillante blue* al 0,05% para comprobar la eficacia de la transferencia. El papel de nitrocelulosa se incubó con albúmina sérica bovina (SAB) al 3% (p/v) en solución salina 0.85% (p/v), por un período de una hora a 37°C. Seguidamente, se realizaron 5 lavados con buffer (Tween 20, 0,1% en PBS), por 20 minutos c/u, con agitación constante y a temperatura ambiente, se cortó el papel de nitrocelulosa en tiras de aproximadamente 3 mm. de ancho y a cada una se le agregaron 2,5 ml. de los diferentes sueros, diluidos a 1:50 con buffer de bloqueo (BSA 3% y Tween 20, 0,05% en solución salina) y se incubaron durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Posteriormente, las tiras se lavaron cinco veces por 20 minutos, con agitación constante con solución de PBS al 0,1% de Tween 20, luego se incubaron con 1 ml de solución de (Fab')₂ anti-inmunoglobulina humana peroxidasa (Amersham) diluída 1:500 en buffer de lavado, durante toda la noche a 4°C y con agitación constante. Luego se realizaron nuevos lavados en iguales condiciones que los anteriores en 10 ml de solución salina conteniendo 5 mg. de Diamino benzidina (Sigma), 10 ml. de peróxido de hidrógeno y 0.3 ml. de CoCl₂ al 1% (p/v) en agua destilada, por un tiempo aproximado de 5 minutos o hasta iniciarse la aparición de las bandas, momento en que se detuvo la reacción para posteriormente tomar las fotografías.

RESULTADOS

Los sueros de los controles normales, no reconocieron antígeno alguno en los exoproductos de las distintas cepas de *P. aeruginosa* utilizadas en este trabajo. La figura 1 muestra el *immunoblotting* de los exoproductos de *P. aeruginosa* aislada de un aspirado bronquial de una paciente con infección simultánea del tracto respiratorio bajo y génito-urinario, y su reacción frente a sueros de pacientes con diferentes patologías inducidas por este bacilo (Tabla 1).

TABLA 1.

Sueros de pacientes con patología infecciosa por *Pseudomonas aeruginosa*.

SUERO	PATOLOGIA INFECCIOSA

* 1	.I.T.U, I.T.R Bajo
* 2	I.T.U
3	I.T.U.
4	I.T.U.
5	I.T.U.
6	I.T.R Bajo.
7	I.T.R Bajo.
8	Otitis externa.
9	Úlcera en extremo inferior muslo izquierdo
10	Úlcera en miembro inferior izquierdo.
11	Úlcera en dedo pie derecho por amputación.
12	Osteomielitis en fémur izquierdo
*13	Fístula operatoria en abdomen
14	Herida quirúrgica infectada.
15	L.A.I.
16	Cateter de hemodiálisis infectado.
17	Injerto de piel. Herida infectada.
18	Apendiceptomizado. Se aisló la bacteria de líquido peritoneal
19	Injerto cutáneo. Herida infectada
20	Absceso retroperitoneal.
21	Herida quirúrgica en abdomen.
* 22	Herida quirúrgica por absceso en cuello.
23	Fístula en muslo izquierdo.
* 24	Úlcera leismánica infectada

I.T.R: Infección del tracto respiratorio; I.T.U.: Infección del tracto urinario. L.A.I.: Líquido ascítico infectado. *Cepas de donde se obtuvieron los exoproductos.

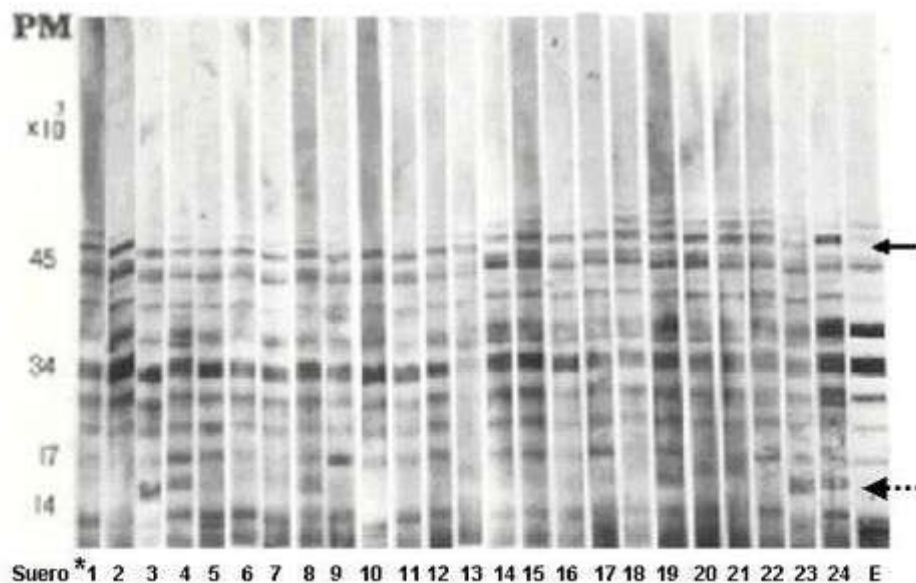


Figura 1. *Immunoblotting* de los exoproductos de *P. aeruginosa* aislada de aspirado bronquial. E: Electroforesis de estos exoproductos. Antígenos revelados: Flecha punteada y negra *Ver Tabla 1.

La línea E, representa el patrón de bandas en la electroforesis de los exoproductos en el medio de cultivo liberados por esta cepa. En ella se evidenciaron 11 bandas con pesos moleculares (PM) en un rango de 12.000 a 53.000 D. El patrón de bandas obtenido con el suero 1, proveniente del paciente de quien se aisló la cepa es bastante similar a todos los sueros ensayados, los cuales reaccionaron con la mayoría de las bandas presentes en el suero 1, sin embargo, los sueros correspondientes a las tiras 3, 4, 8, 23 y 24 mostraron un antígeno de 15.000 D (Flecha punteada) ausente en los demás sueros y en los exoproductos de esta cepa (E). Todos los sueros revelaron un antígeno común de 43.000 D (Flecha negra) el cual no se observa en la electroforesis de los exoproductos en el medio de cultivo (E). La figura 2 muestra el *immunoblotting* de los exoproductos de *P. aeruginosa*, aislada de un paciente con infección urinaria y su reacción frente a los sueros en estudio.

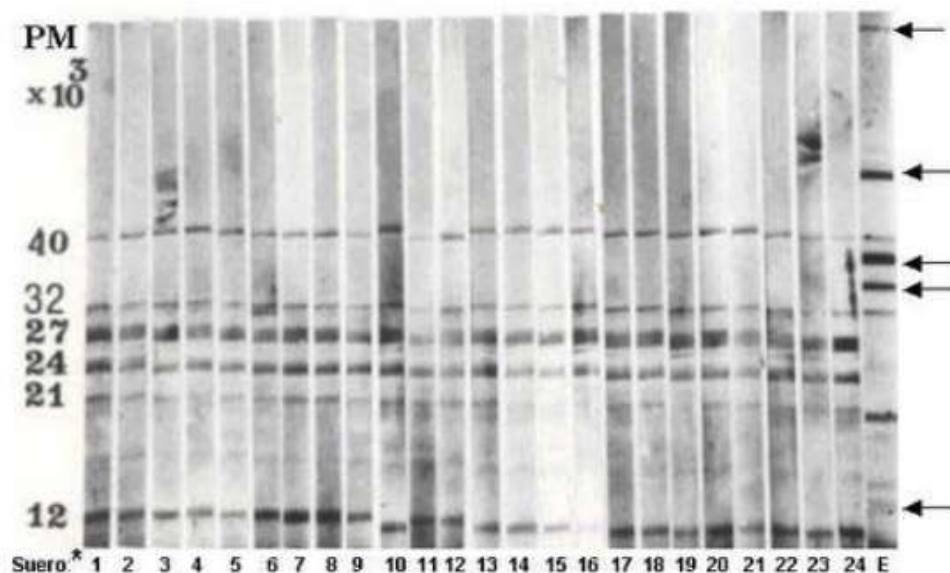


Figura 2. *Immunoblotting* de los exoproductos de *P. aeruginosa* aislada de orina. E: Electroforesis de estos exoproductos. Bandas que no reaccionaron con ninguno de los sueros (Flecha negra). * Ver Tabla 1.

En la electroforesis se evidenciaron 13 bandas con PM entre 10.000 y 105.000 D (E). El patrón de reacción de los exoproductos con los diferentes sueros es similar. Las bandas de 105.000, 48.000, 38.000, 35.000 y 13.000 D no reaccionaron con ninguno de los sueros (Flecha negra), incluyendo el suero homólogo del paciente de quien se aisló la cepa (tira 3). En todos los sueros se detectaron bandas de 24.000 y 27.000 D, ausentes en los exoproductos de esta cepa (E). La figura 3, muestra el *immunoblotting* de los exoproductos de *P. aeruginosa* aislada de una herida quirúrgica en colon y su reacción frente a los sueros en estudio.

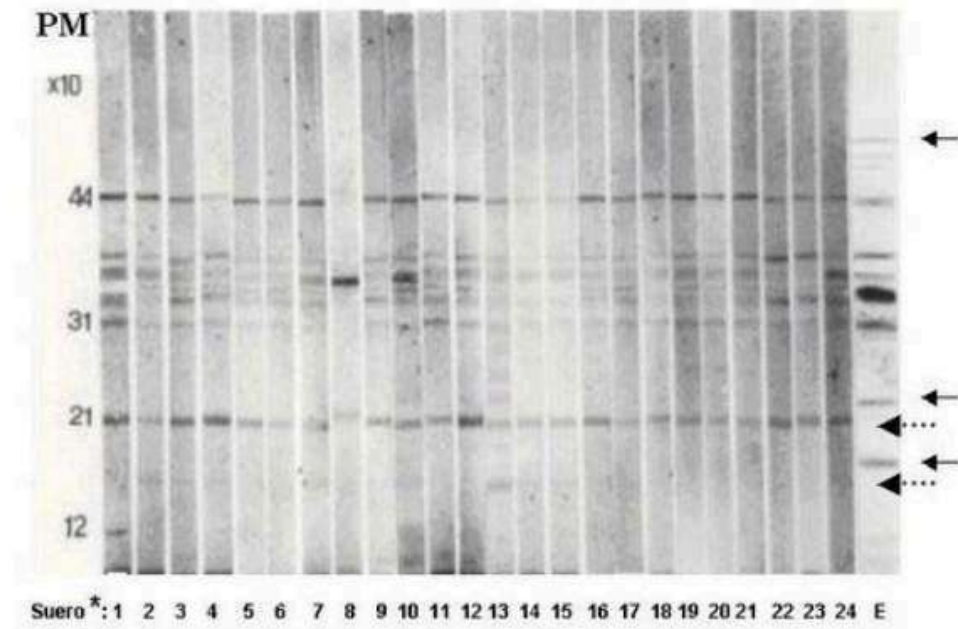


Figura 3. *Immunoblotting* de los exoproductos de *P. aeruginosa* aislada de herida quirúrgica. E: Electroforesis de estos exoproductos. Bandas que no reaccionaron con ninguno de los sueros (Flecha negra). Bandas reveladas (Flecha punteada) *Ver Tabla 1.

En la electroforesis de los exoproductos de esta cepa (E), se evidencian 13 bandas con PM entre 10.000 y 52.000 D. Las proteínas de PM: 17.000, 22.000, 51.000, 52.000, 53.000 D no reaccionaron con los sueros de los pacientes infectados. Todos los sueros revelaron un antígeno de 21.000 D (Flecha negra), los sueros correspondientes a las tiras 2,3,4,13,14 y 15 revelaron un antígeno de 15.000 D (Flecha punteada), Estos antígenos revelados a través de los anticuerpos no son visibles en la electroforesis de estos exoproductos (E).

La figura 4, muestra el *immunoblotting* de los exoproductos de *P. aeruginosa*, aislada de una herida quirúrgica en cuello y su reacción frente a los sueros en estudio.

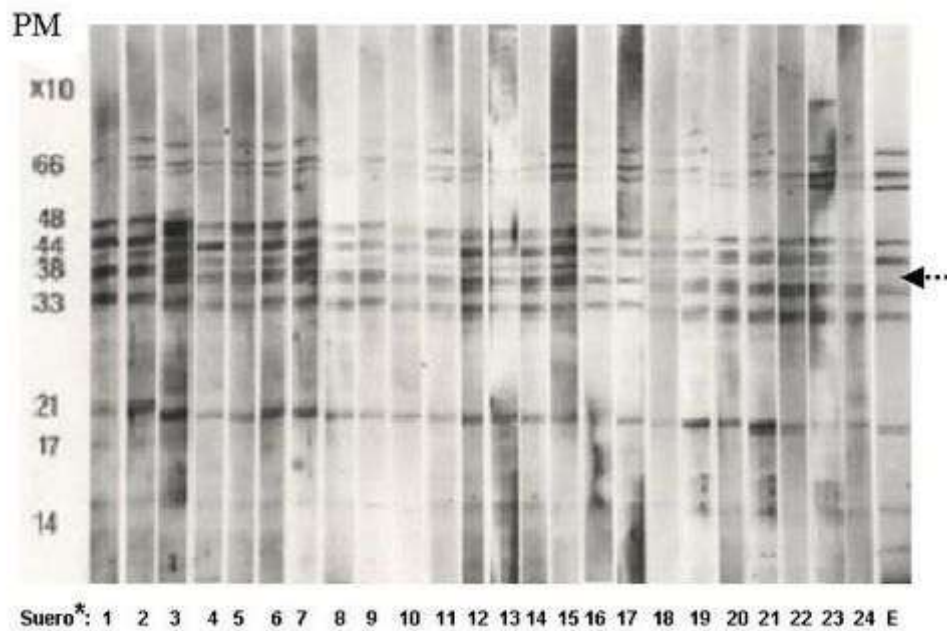


Figura 4. *Immunoblotting* de los exoproductos de *P. aeruginosa* aislada de absceso en el cuello. E: Electroforesis de estos exoproductos. Banda revelada (Flecha punteada), Banda no reactiva con los sueros (Flecha negra) * Ver Tabla 1

En la electroforesis de los exoproductos de esta cepa, se evidencian 10 bandas con PM entre 10.000 a 70.000 D (E). El patrón de reacción es bastante similar en todos los sueros ensayados, incluyendo una banda de aproximadamente 40.000 D (Flecha punteada) que no es visible en la electroforesis de los exoproductos (E). Existen bandas en los sueros ensayados coloreadas débilmente, con PM entre 21.000 y 33.000 D, las cuales están ausentes en la electroforesis de los exoproductos (E). La figura 5, muestra el *immunoblotting* de los exoproductos de *P. aeruginosa* aislada de una úlcera leishmánica y su reacción frente a los sueros en estudio.

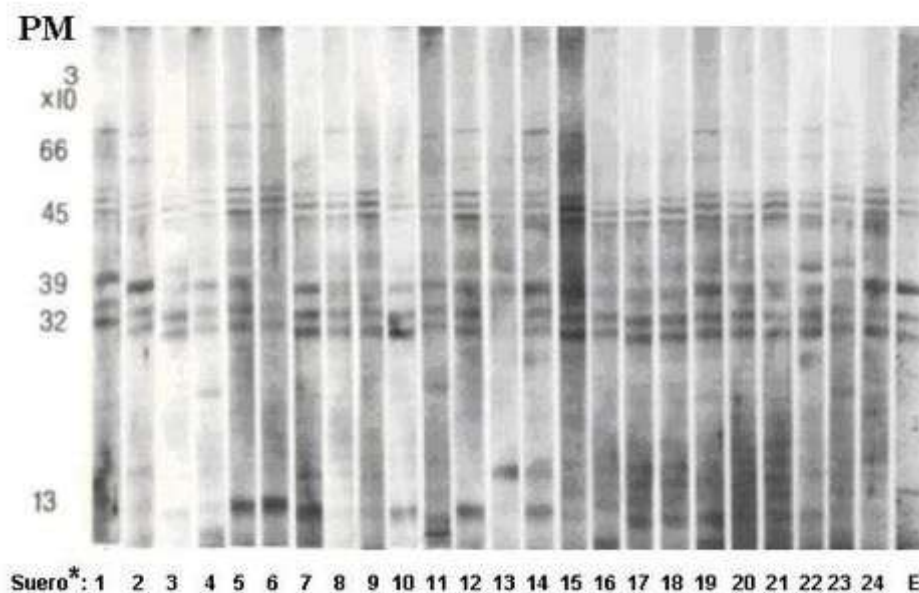


Figura 5: *Immunoblotting* de los exoproductos de *P. aeruginosa* aislada de úlcera leishmánica. E: Electroforesis de esos exoproductos. * Ver Tabla 1.

En la electroforesis de los exoproductos de esta cepa, se evidencian 9 bandas con PM entre 12.000 y 70.000 D, las cuales reaccionaron con todos los sueros. Se revelan con apariencia difusa un gran número de bandas con pesos moleculares que oscilan entre 15.000 y 30.000 D, ausentes en la electroforesis de los exoproductos (E).

La Tabla 2, muestra la comparación mediante electroforesis e *immunoblotting* de los productos excretados por *Pseudomonas aeruginosa*. En ella se resaltan aquellas bandas que no reaccionaron con ninguno de los sueros, así como aquellas que aunque no fueron visibles en la electroforesis, fueron revelados por los diferentes sueros señalados. Todos los exoproductos de las cepas aisladas de aspirado bronquial, de la secreción de herida quirúrgica en cuello y de una úlcera leishmánica reaccionaron con todos los sueros en estudio.

TABLA 2 Comparación mediante electroforesis e *immunoblotting* de los productos excretados por *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de diferentes muestras clínicas.

Muestra ¹	Electroforesis Nº Bandas (Rango PM)	Immunoblotting PM de Bandas		Sueros ⁴ Nº
		No reactivas ²	Reveladas ³	
Aspirado bronquial	11 (12-53)		15 43	3,4,8,23,24 Todos
Secreción de herida quirúrgica en cuello	10 (10-70)		40	Todos
Secreción de úlcera Leishmánica	9 (12-70)			
Orina	13 (10-105)	105, 48,38,35,13	24,27	Todos
Secreción de herida quirúrgica por absceso en colon	13 (10-52)	17,22,51,52, 53	15 21	13,14,15 Todos

¹ Fuente de aislamiento de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

² Antígenos visibles en la electroforesis de los exoproductos pero que no reaccionaron en el *immunoblotting*

³ Antígenos no visibles en la electroforesis de los exoproductos pero revelados en el *immunoblotting*

⁴ Sueros donde aparecieron las bandas reveladas.

DISCUSIÓN

La colonización e infección por *P. aeruginosa* está asociada a distintos mecanismos, muchos de los cuales aún faltan por dilucidar. Este bacilo se ha convertido desde hace algunas décadas en uno de los principales agentes infecciosos de origen nosocomial, sin embargo, su poder patógeno no se circunscribe solamente a las cepas aisladas en los hospitales ya que se han encontrado cepas más virulentas en los aislamientos ambientales (34). El éxito de esta bacteria como agente infeccioso reside principalmente en su capacidad para sintetizar y secretar una variedad de exoproductos. Con anterioridad, se ha demostrado que algunas cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con diferentes patologías infecciosas, manifiestan variabilidad en sus exoproductos cuando son cultivadas en medios líquidos (31), este hecho justifica su estudio en detalle, por lo cual se planteó investigar la posible relación entre los exoproductos detectados en los medios de cultivo de diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, con los excretados durante la infección clínica, a través de su reacción con sueros de pacientes con diferentes patologías ocasionadas por este bacilo. Los exoproductos de las cepas aisladas de

aspirado bronquial (Figura 1), de absceso en cuello (Figura 4) y de una úlcera leishmánica (Figura 5), reaccionaron con todos los sueros en estudio, con lo cual se evidencia que estas proteínas sintetizadas y excretadas en los medios de cultivo también están presentes en los tejidos de los pacientes infectados, ya que son reconocidos por anticuerpos presentes en todos los sueros. No ocurre así con los exoproductos de la cepa aislada del tracto urinario (Figura 2), ni con la cepa aislada de una herida quirúrgica en el colon (Figura 3). En la primera los sueros no reaccionaron con cinco (5) bandas de PM: 13.000, 35.000, 38.000, 48.000 y 105.000 D, visibles en la electroforesis de los exoproductos (E) y en la segunda, tampoco hubo reacción con cinco (5) bandas de PM: 17.000, 22.000, 51.000, 52.000 y 53.000 también presentes en la electroforesis de los exoproductos (E) (Tabla 2). Este hecho sugiere que tales proteínas, aunque son sintetizadas y excretadas en los medios de cultivo, no parecen ser excretadas a los tejidos en estas dos patologías estudiadas, quizás debido a que su expresión pueda ser regulada de manera diferente en los sistemas de cultivos en relación con las infecciones *in vivo*. La regulación de la expresión de factores de virulencia en diferentes nichos puede obedecer a varios fenómenos, tales como: 1.- La inhibición que ejercen algunos antibióticos en la secreción de los exoproductos (35). 2.- La inhibición de los sistemas *Quorum sensing* en la bacteria, ya que se ha encontrado en el genoma de *P. aeruginosa* un gen homólogo designado como *Quorum sensing control* (QScR), el cual impediría la activación de exoproductos en ambientes o condiciones de vida celular donde los mismos no sean requeridos (30). 3.- La inhibición que ejerce la respuesta inmune del hospedador (36). Por otra parte, la ausencia de reacción de los sueros con la banda de 105.000 D, similar por su PM a la exoenzima S, así como otras bandas con PM similares a algunas proteasas (Figura 2E), podría explicarse por la inhibición que ejercen estas exoenzimas sobre la respuesta inmune local mediada por anticuerpos (37,38) y/o por la inmunomodulación que ejercen los sistemas *quorum sensing* de *P. aeruginosa* sobre la respuesta inmune del hospedador (39). Todos los sueros tienen anticuerpos contra los antígenos de pesos moleculares entre 65.000 y 70.000 D, excretados por las cepas aisladas de un absceso en cuello y de una úlcera leishmánica (Figura 4 y 5). Dentro de este rango de pesos moleculares se encuentra la exotoxina A (66.583 D), por lo cual, se podría sugerir que todas las cepas sintetizan y excretan esta enzima en el proceso infeccioso, sin embargo, en estas condiciones de cultivo, las cepas aisladas de aspirado bronquial, de orina y de una herida quirúrgica en colon, no parecen sintetizar esta enzima, ya que no se evidencian en las electroforesis (Figura 1E, 2E, 3E), ni son reveladas por ninguno de los sueros en el *immunoblotting* (Figuras 1,2,3). Una razón podría ser por que su producción sea en concentraciones muy bajas que no puedan ser detectadas por estos métodos, aunque el *immunoblotting* es muy sensible y puede detectar antígenos en el rango de nanogramos. Tampoco podemos descartar la inhibición de su producción en determinados ambientes, ya que en algunas cepas, tanto la producción de exotoxina A como la de otras proteínas totales extracelulares, podría inhibirse por diferencias en la inducción de las enzimas por substratos o moléculas diferentes (40). Las fuertes reacciones de los sueros observadas con las bandas de 24.000 y 27.000 D (Figura 2), de 15.000 y 21.000 D (Figura 3), con antígenos que no fueron visibles en las electroforesis de los exoproductos de ambas cepas (E), podría deberse a la presencia de glicoproteínas con una porción peptídica no teñida con *Coomasie Blue* (R-250), y la amplificación de este epítipo por la reacción con los anticuerpos facilitó su detección. En todas las figuras se revelaron bandas con poca resolución que no aparecen en la electroforesis de los exoproductos (E). Esta imagen en el *immunoblotting* es característica de la presencia de carbohidratos que pueden ser transferibles al papel de nitrocelulosa (41). Está bien documentado la producción de carbohidratos en las infecciones crónicas producidas por *P. aeruginosa*, así como su reactividad con los anticuerpos (38, 42, 43).

La producción de la capa mucopolisacárida característica de esta bacteria es estimulada tanto por la presión ejercida por los antibióticos como por la respuesta inmune, aunque paradójicamente, esta capa mucopolisacárida favorece a la bacteria, ya que impide tanto el acceso de los antibióticos como el de los anticuerpos, permitiéndole establecerse en un estado de cronicidad (36). En conclusión, a juzgar por las distintas reacciones de los sueros provenientes de 24 pacientes infectados por *P. aeruginosa* con los exoproductos de las diferentes cepas, se puso de manifiesto a través de la reacción con los anticuerpos, la variabilidad en los exoproductos de *P. aeruginosa* en los distintos tejidos *in vivo* durante las diversas patologías consideradas en este estudio, sin embargo, esta variabilidad no siempre se corresponde con la manifestada en los exoproductos liberados por las distintas cepas en los medios de cultivo *in vitro*, sugiriendo la existencia de procesos regulatorios distintos en los medios de cultivo en relación con los que ocurren durante la infección clínica, estimulados por la participación de otros factores externos de origen tisular además de los dependientes de la respuesta inmunológica del hospedador.

REFERENCIAS

1. Hardalo C, Edberg S. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. Crit. Rev. Microbiol 1997; 23: 47-75.
2. Stover C, Pham X, Erwin A, Miizoguchi S, Warrenner P, Hickey M, y col. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 2000; 406: 959-964.
3. Nikaido H. Multiple antibiotic resistance and efflux. Curr Opin Microbiol 1998;1:516-523.
4. Arnello M, Quintana J, Barraza P. Neutropenia febril en niños con cáncer en un centro asistencial en Santiago, Chile. Rev Chil Infect 2007; 24:27-32.
5. Dale R, Schnell G, Wong J. Therapeutic efficacy of β -lactams against burn wound infection by *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob agents chemother 2004;48:2918-2923.
6. Lyczak J, Cannon C, Pier G. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 2002;15:194-222.
7. Ethel S, Sini V, Jolly J. Gentamycin resistance in biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa* associated urinary tract infections. Indian J of Medical Sciences 2005; 59:214-216.
8. Sanz P, Ramos A, Asensio A, García M, Linares M. Mortalidad y factores pronósticos en pacientes hospitalizados por bacteremia adquirida en la comunidad. An Med Interna 2006;23: 62-65
9. Davidson S, Yellin E, Shoked I, Rubinstein E. *Pseudomonas aeruginosa* meningitis with an azlocillin combination. Infection 2005; 10: S168-S169.
10. Andriesse I, Verhoef J. Nosocomial pneumonia: rationalizing the approach to empirical therapy. Treat Respir Med 2006; 5(1):11-30.
11. Sato H, Okinaga K, Saito H. Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection. Microbiol Immunol 1998; 32:131-139.

12. Vitkauskiene A, Scheuss S, Sahly H, Sakalauskas R, Dudzevicius V. *Pseudomonas aeruginosa* strains from nosocomial pneumonia are more serum resistant than *P. aeruginosa* strains from noninfectious respiratory colonization processes. *Infection* 2005; 33(5-6):356-361.
13. Shaver M, Hauser R. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 2004; 72:6969-6977.
14. Guadarrama S, Pulcini E, Broadaway C, Pyle H. *Pseudomonas aeruginosa* growth and production of Exotoxin A in static and modeled microgravity environments. *Gravit Space Biol Bull* 2005; 18:85-86.
15. Takumida M, Anniko M. Protective effect of edaravone against the ototoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Acta Otolaryngol* 2006; 126(1):15-19.
16. Woods D, Sokol P. Use of transposon mutants to assess the role of exoenzyme S in chronic pulmonary disease due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol* 1985; 4:163-169.
17. Zhang Y, Barbieri T. A leucine-rich motif targets *Pseudomonas aeruginosa* ExoS within mammalian cells. *Infect Immun* 2005; 73:7938-7945.
18. Ciragil P, Soyletir G. Alginate, elastase and alkaline protease production of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from various body sites. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38:341-347.
19. Khan S, Misra A, Tripathi C, Mishra B, Bihari V. Response surface optimization of effective medium constituents for the production of alkaline protease from a newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Exp Biol* 2006; 44:151-156.
20. Karadzic I, Masui A, Fujiwara N. Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas aeruginosa* grown in cutting oil. *J Biosci Bioeng* 2004; 98(3):145-152.
21. Horvat R, Clabaugh M, Dubal-Jobe C, Parmely M. Inactivation of human gamma interferon by *Pseudomonas aeruginosa* proteases: elastase augments the effects of alkaline protease despite the presence of alpha 2-macroglobulin. *Infect Immun* 1989;57: 1668-1674.
22. Kohler W, Zentralblatt fur. Bakteriologie-100 years ago: evidence for a haemolysin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* 2000; 290(3):205-206.
23. Barker A, Vasil A, Filloux A, Ball G, Wilderman P, Vasil M. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* 2004; 53(4):1089-1098.
24. Toshiyuki Y, Yoichi H, Coichi I, Yoshitsugu M, Shigefumi M, Kazunori T y col. Prolonged survival of mice with *Pseudomonas aeruginosa* induced sepsis by rIL-12 modulation of IL-10 and interferon [gamma]. *J Clin Microbiol* 2000; 49:701-707
25. Denning G. Wollenweber L, Railsback M, Cox Ch, Stoll L, Britigan B. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun* 1998; 66:5777-5784
26. Gambello M, Iglewski B. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcripcional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 1991;179:3000-3009.

27. Pearson J. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1994;91:197-201
28. Brint, J. M. & D. E. Ohman. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. J Bacteriol 1995 ;177: 7155-7163.
29. Pearson J, Passador L, Iglewski B, Greenberg E. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U.S.A 1995;92:1490-1494.
30. Chugani S., Whiteley M, Lee K, D'Argenio D, Manoel C, Greenberg P. QscR a modulator of quorum- sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U.S.A 2001; 98:2752-2757
31. Polanco N, Moronta R, O'Daly J. Variabilidad en los exoproductos de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de diferentes muestras clínicas. VITAE Academia Biomédica Digital 2006; N° 27
32. Briceño E, Suárez E, Michelangi C, Feliciangeli D, Ptaiza E. Mendible J, Villalón M, Aguilera M, Ceballo H. Godoy J, y col. Código de Bioética y Bioseguridad 2002. Capítulo 2 y 3. Ministerio de Ciencia y Tecnología (FONACIT). 2da Edición. Venezuela
33. Laemmli U. Clivage of structural proteins during the assembly for the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
34. Holloway B, Morgan A. Genome organization in *Pseudomonas*. Ann Rev Microbiol 1986; 40:79-105.
35. Hourianopoulou M, Lambropoulos S, Papafragas E, Falagas M. Effect of aerosolized colistin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in bronchial secretions of patients without cystic fibrosis J. Chemother 2005;17:536-538.
36. Kadota J. Interaction between host immune response and *Pseudomonas* infection in chronic airway inflammatory disease. J Japanese Respiratory Society 2005;43:80-84
37. Smith R, Iglewski B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. Curr Opin Microbiol 2003;6:56-60
38. Dubin P, Kolls J. *Pseudomonas aeruginosa* and the host pulmonary immune response. Expert Review of Respiratory Medicine 2007; 1:121-137.
39. Wagner V, Frelinger J. Barth R Iglewski B. Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signal. Trends Microbiol 2006; 14:55-58
40. Khan S, Misra A, Tripathi C, Mishra B, Bihari V. Response surface optimization of effective medium constituents for the production of alkaline protease from a newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Indian J Exp Biol 2006; 44:151-156.
41. Rudner X, Zheng Z, Berk R, Irwin R, Haslett L. Corneal epithelial glycoproteins exhibit *Pseudomonas aeruginosa* pilus binding activity. Invest Ophthalmol Vis sci 1992; 33:2181-2193.

42. Hartl D, Griesse M. Surfactant protein D in human lung diseases. *European J Clin Invest* 2006; 36:423-435.

43. Sadikot R, Blackwell T, Christman J, Prince A. Pathogen-Host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respiratory and Critical Care Medicine* 2005; 171: 1209-1223