

Fabio Cafini<sup>1</sup>  
César García Rey<sup>1</sup>  
Pedro Bas<sup>1</sup>  
María Luisa Gomez-Lus<sup>1</sup>  
Isabel Sánchez<sup>2</sup>  
Silvia Vázquez<sup>3</sup>  
José Prieto<sup>1</sup>

# Discordancia en los resultados de sensibilidad mediante método de difusión en agar de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística tras pre-incubación anaerobia y su potencial relevancia clínica

<sup>1</sup>Departamento Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

<sup>2</sup>Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda.

<sup>3</sup>Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia (UPV-EHU), Vitoria.

---

## RESUMEN

**Introducción.** En la fibrosis quística las células de *Pseudomonas aeruginosa* crecen en el interior de la espesa mucosidad, y pese a ser un organismo aerobio estricto, se desarrolla en un ambiente donde la presión de oxígeno es muy limitada. Posibles movimientos de la masa mucosa podrían dejar expuestas de forma súbita a las células de *P. aeruginosa* a concentraciones altas de oxígeno. El objetivo del estudio fue determinar cómo afecta a la sensibilidad antibiótica de *P. aeruginosa* un período de incubación anaerobia.

**Material y métodos.** Se emplearon 4 cepas de *P. aeruginosa* (NTCC 23389 y 3 aislados clínicos). Para la determinación de la sensibilidad antibiótica se empleó el método de difusión en agar.

**Resultados.** La preincubación anaerobia produce cambios en la sensibilidad en todas las cepas estudiadas. Todas las cepas sensibles en aerobiosis resultaron también sensibles tras la incubación anaerobia a excepción de la cepa 2 para los betalactámicos. El tipo de respuesta resulta dependiente de cada cepa, siendo especialmente significativo el incremento en la sensibilidad observado en el caso de ciprofloxacino para dos de los tres aislados clínicos.

**Conclusiones.** La sensibilidad de cepas *P. aeruginosa* varía si han sido previamente expuestas a condiciones de anaerobiosis. Tratamientos que favorezcan la fluidificación de la mucosidad podrían contribuir aumentando el éxito del tratamiento con ciertos antibióticos.

**Palabras clave:** Fibrosis quística, condiciones anaerobias, sensibilidad antibiótica.

## Discrepancy in the disk diffusion susceptibility test of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients after anaerobic preincubation and its potential clinical relevance

### ABSTRACT

**Introduction.** In cystic fibrosis, the *Pseudomonas aeruginosa* cells grow inside the thick mucus layer. In spite of being an obligate aerobe, *P. aeruginosa* is able to grow in a limited oxygen environment. Bacterial cells could be suddenly exposed to high oxygen levels due to the movements of the mucus mass. The aim of study was to determine the impact of a previous anaerobic incubation on the antimicrobial susceptibility of *P. aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis.

**Materials and Methods.** Four *P. aeruginosa* strains were used in this study (ATCC 23389 and 3 clinical isolates). The disk diffusion method was used to determine the antimicrobial susceptibility.

**Results.** The anaerobic pre-incubation produced changes on the susceptibility in all studied strains. All susceptible strains after an aerobic incubation remained susceptible after an anaerobic incubation except one clinical strain, which became resistant to betalactams. The response was strain-dependent and the most significant increase in susceptibility was observed in two of the three clinical isolates when ciprofloxacin was used.

**Conclusions.** The antimicrobial susceptibility of *P. aeruginosa* strains varies after their exposure to anaerobic conditions. Treatments promoting mucus fluidization could contribute to increase the antimicrobial efficacy.

**Key words:** Cystic fibrosis, anaerobic conditions, antibiotic susceptibility.

---

Correspondencia:  
José Prieto  
Departamento Microbiología, Facultad de  
Medicina, Universidad Complutense  
Avda. Complutense, s/n  
28040 Madrid  
E-mail: jprieto@med.ucm.es

## INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística (FQ) es una de las enfermedades genéticas más frecuentes en la raza caucásica, de herencia autosómica recesiva y causada por la mutación en el regulador de una proteína implicada en el transporte de iones (CFRT - cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)<sup>1</sup>. La mutación más frecuente en los enfermos es una triple delección en el gen *cftr* (ubicado en el brazo largo del cromosoma 7), que ocasiona la desaparición de la fenilalanina 508, si bien se han encontrado muchas otras sustituciones con una menor incidencia<sup>2</sup>. Las diversas mutaciones en dicho gen producen alteraciones en la proteína CFRT, generando así distintos fenotipos que abarcan desde complicaciones menores, como la reducción en la actividad basal, hasta la pérdida total de la función<sup>3,4</sup>.

La función principal del transportador CFRT se centra en el transporte de cloro, y afecta indirectamente al transporte de agua y al trasiego iónico en las células del epitelio respiratorio<sup>5</sup>. La alteración de la composición iónica produce en última instancia la secreción de una mucosidad extremadamente viscosa en las vías respiratorias de los pacientes.

La manifestación clínica más importante en los pacientes con FQ es la enfermedad pulmonar crónica progresiva, constituyendo la infección pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* la principal causa de morbilidad y mortalidad, pues una vez establecida en el tracto respiratorio inferior, es virtualmente imposible erradicarla a pesar de la terapia antibacteriana y el tratamiento en general.

Las funciones respiratorias son normales hasta los primeros seis meses de edad, tiempo en el cual aparecen los primeros síntomas y las primeras infecciones respiratorias por *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa*, y posteriormente, por otros patógenos oportunistas como el complejo *Burkholderia cepacia*<sup>6</sup>.

Las cepas de *Pseudomonas* spp. halladas en muestras de pacientes con FQ presentan, entre otras, dos características a señalar implicadas en la resistencia antibiótica, elevada producción de alginato (fenotipo mucoide)<sup>7</sup> y elevada tasa de mutación (fenotipo hipermutador)<sup>8</sup>. El alginato dificulta la fagocitosis y reduce la penetración de antimicrobianos al interior celular, la hipermutabilidad permite un mayor desarrollo de resistencias y una mayor adaptación al medio externo.

El tratamiento de elección frente a las infecciones causadas por *P. aeruginosa* es tobramicina en combinación con un betalactámico como ticarcilina, piperacilina o ceftazidima, recurriendo a quinolonas como ciprofloxacino o levofloxacino en caso de resistencia a los primeros. Recientemente se ha comercializado una presentación de aztreonam para inhalación por nebulización.

La erradicación bacteriana en la FQ no se alcanza en ningún caso, considerándose efectivo el tratamiento con una reducción de la carga bacteriana y una mejoría en la sintomatología general. Según los estudios existentes, una de las causas de los fracasos terapéuticos en este tipo de pacientes se debe al estado quiescente de las células vegetativas cuando se encuentran en condiciones de baja presión de oxígeno<sup>9</sup>.

Los estudios existentes hasta la fecha han analizado la sensibilidad de *P. aeruginosa* en condiciones estáticas de aerobiosis o anaerobiosis, sin tener en cuenta las posibles variaciones debido al movimiento o el fraccionamiento de la mucosidad de las vías respiratorias y el consiguiente efecto de la variación súbita de la disponibilidad de oxígeno.

El objetivo de este trabajo era el de comprobar los efectos de la pre-incubación anaerobia similar a la que podría encontrarse en condiciones clínicas en capas de mucosidad profundas no expuestas al oxígeno, sobre la sensibilidad final en condiciones aerobias remedando una situación más superficial en el moco tras su movimiento en las vías respiratorias.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cepas

La cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23389 y tres aislados clínicos (cepa 2, 3 y 4) obtenidos de pacientes con FQ en el Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda fueron utilizados en los experimentos de sensibilidad.

### Antibióticos

Se utilizaron discos antibióticos de: gentamicina 10 µg, ciprofloxacino 5 µg, aztreonam 30 µg, piperazilina/tazobactam (10:1) 110 µg, tobramicina 10 µg, ceftazidima 30 µg e imipenem 10 µg. Las pruebas fueron realizadas por triplicado, empleándose el valor medio de los tres experimentos.

### Medios de cultivo y sensibilidad antibiótica

Se analizó la sensibilidad mediante la técnica en de difusión en disco. Se utilizó agar Mueller Hinton. Para la simulación de las condiciones de anaerobiosis se utilizó el sistema generador de atmósfera GasPak EZ (BD).

Los antibiogramas se realizaron siguiendo los criterios del CLSI (2007). Para determinar la sensibilidad con una exposición previa a atmósfera anaerobia, se prepararon normalmente los antibiogramas y se introdujeron en jarras de anaerobiosis durante un período de tiempo de 24 horas a 35°C (pre-incubación anaerobia). Transcurrido este tiempo las placas se retiraron del ambiente anaerobio y se incubaron normalmente 24 horas. Las pruebas fueron realizadas por triplicado.

## RESULTADOS

### Sensibilidad en anaerobiosis

Las cuatro cepas estudiadas resultaron sensibles a ceftazidima, gentamicina, tobramicina, piperacilina/tazobactam e imipenem según los criterios del CLSI para la técnica de difusión en disco. Tres de ellas (ATCC, y cepas 3 y 4) fueron sensibles además a ciprofloxacino, siendo la cepa 2 resistente al mismo. Los tres aislados clínicos resultaron resistentes a aztreonam.

### Viabilidad en anaerobiosis

Se comprobó el efecto de la pre-exposición anaerobia sobre la viabilidad celular de *P. aeruginosa*. Partiendo de un

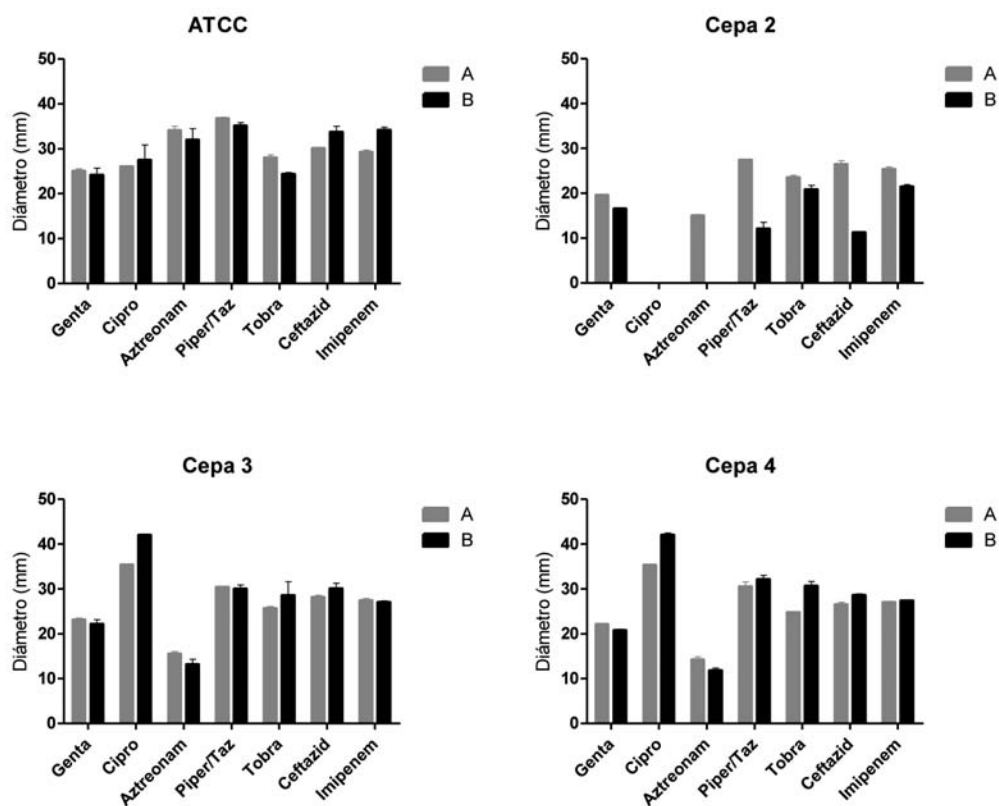


Figura 1

Sensibilidad de los aislados a los distintos antimicrobianos. A: sensibilidad determinada por difusión en agar según procedimiento habitual. B: sensibilidad determinada por difusión en agar tras una incubación previa de 24 horas en anaerobiosis

inóculo de  $1 \times 10^8$  ufc/mL se realizaron diluciones seriadas para determinar el número de células viables. Un grupo de placas de cada cepa fue incubado 24 horas en estufa a 35°C. Otro grupo de placas paralelo fue pre-incubado a 35°C en anaerobiosis 24 horas, y transcurrido este tiempo, fueron retiradas de la jarra de anaerobiosis e incubadas 24 horas en estufa a 35°C. No se encontraron diferencias significativas en el número de viables entre aquéllas que fueron pre-incubadas en anaerobiosis y las que fueron cultivadas normalmente.

#### Sensibilidad y cambio en la atmósfera de incubación

La respuesta a los betalactámicos con una pre-exposición anaerobia varió en función de la cepa estudiada (figura 1). Todas las cepas sensibles en aerobiosis resultaron también sensibles tras la incubación anaerobia a excepción de la cepa 2 para los betalactámicos. Esta cepa pasó de resultar sensible a piperacilina/tazobactam y ceftazidima (27,4 y 26,4 mm, respectivamente), a resultar resistente tras la incubación anaerobia (12,1 y 11,2 mm, respectivamente).

Aztreonam y piperacilina/tazobactam presentaron una tendencia de reducción de la sensibilidad tras la exposición anaerobia, siendo estadísticamente significativa únicamente

para la cepa 2 ( $p < 0,001$  para ambos antimicrobianos). Ceftazidima presentó una tendencia de aumento en la sensibilidad tras la exposición anaerobia para las cepas ATCC, 3 y 4, resultando significativa para la cepa 4 ( $p = 0,034$ ). Contrariamente, la cepa 2 presentó una reducción significativa en la sensibilidad para este antimicrobiano ( $p$ -valor  $< 0,001$ ). Imipenem por su parte, presentó un aumento de sensibilidad significativo para la ATCC ( $p = 0,004$ ), una reducción significativa para la cepa 2 ( $p = 0,007$ ), o indiferencia para las cepas 3 y 4.

La respuesta a ciprofloxacino presentó una tendencia de aumento en la sensibilidad no significativa para la ATCC, permaneciendo invariable en el caso de la cepa 2, donde su elevada resistencia a este antibiótico impidió la formación de halo de inhibición en condiciones normales y tras la exposición anaerobia. Sin embargo, un importante aumento en la sensibilidad se pudo observar en el caso de las cepas 3 y 4, resultando estadísticamente significativa para ambas ( $p < 0,001$ ).

En cuanto a los aminoglicósidos, todas las cepas presentaron, como por otro lado era perfectamente esperable, una reducción en la sensibilidad tras la exposición anaerobia, resultando estadísticamente significativa para gentamicina en las cepas 2 y 4 ( $p < 0,001$  y  $p = 0,01$ , respectivamente). Tobramicina por su

parte mostró diferencias significativas para tres de las cuatro cepas, una de reducción significativa en la actividad para las cepas ATCC y 2, y un aumento en la sensibilidad para las cepas 3 y 4, siendo estadísticamente significativo para esta última ( $p=0,007$ ).

## DISCUSIÓN

Numerosos estudios han mostrado el efecto de las bajas concentraciones de oxígeno en la sensibilidad de *P. aeruginosa* a los distintos antimicrobianos. Las condiciones de anaerobiosis fomentan un estado de estrés en el que se produce la activación de factores de transcripción alternativos con la consiguiente expresión o represión de numerosos genes<sup>10</sup>. Se ha demostrado que las células de *P. aeruginosa* expuestas a hipoxia presentan una mayor resistencia a los antimicrobianos<sup>9</sup> y un aumento en la síntesis de alginatos<sup>11</sup>.

Un ejemplo de la importancia que puede llegar a alcanzar la variación en las concentraciones de oxígeno lo podemos encontrar en los biofilms bacterianos. En ellos se genera un gradiente de oxígeno desde la periferia hacia las capas más internas<sup>12</sup>, permitiendo que las células confinadas en las zonas de mayor profundidad dispongan de concentraciones menores de oxígeno. Las variaciones en las condiciones externas generan por tanto cambios fenotípicos que influyen en la sensibilidad antibiótica<sup>13</sup>, este efecto unido a la posible retención de los antimicrobianos por los polímeros de la matriz externa<sup>14</sup>, hacen de los biofilms todo un reto para la antibioterapia moderna.

En la FQ, *Pseudomonas* spp. no crece formando un biofilm sobre las células epiteliales, sino que se desarrollan embebidas en el interior de la espesa mucosidad formando unas grandes colonias esféricas denominadas "macrocolonias". Las bacterias, tras ser inhaladas y depositarse en la superficie de moco, comenzarían a desplazarse activamente hacia el interior<sup>15</sup>. En la FQ, *Pseudomonas* se desarrolla en un medio donde la cantidad de oxígeno disponible es muy limitada (los valores de  $pO_2$  encontrados en el interior de la mucosidad son de aproximadamente 2,5 mmHg), una vez alcanzado el lumen del moco, pese a ser aerobia estricta, podría iniciar una respiración anaerobia utilizando como aceptor final en la cadena de electrones el nitrato presente en el medio<sup>11</sup>.

En clínica sin embargo, las condiciones no permanecen estáticas, existiendo fraccionamiento y expulsión del moco. En este trabajo se ha tratado de simular una hipotética circunstancia en la que las células pasasen de unas condiciones anaerobias a una súbita aerobiosis, y el efecto que ello conllevaría en la sensibilidad antibiótica.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirman por un lado que la viabilidad de una especie bacteriana aerobia estricta como es *P. aeruginosa* no se ve alterada por una pre-incubación anaerobia de 24 horas, y por otro lado los resultados también muestran cómo esta pre-incubación de 24 horas en condiciones anaerobias produce variaciones apreciables en la sensibilidad antibiótica.

La cepa ATCC presentó variaciones significativas únicamente para tobramicina e imipenem, haciéndose más sensible con una pre-incubación anaerobia de 24 horas.

Las cepas 3 y 4 presentaron una respuesta muy similar entre ellas. Ambas, cepas de fenotipo mucoide, presentaron un importante aumento de la sensibilidad a ciprofloxacino tras una exposición anaerobia. Dicha variación se deriva de cambios fenotípicos debidos al medio externo sin necesidad de variaciones genotípicas, algo ya observado en biofilms<sup>16</sup>.

Las bombas de expulsión son un elemento clave para el desarrollo de resistencias en *P. aeruginosa*. MexAB-OprM o MexCD-OprJ son bombas de expulsión que intervienen en la resistencia a numerosos compuestos, sin embargo ninguna de ellas afecta a la sensibilidad a imipenem<sup>17</sup>. La sensibilidad frente a este compuesto se ve afectada por la bomba de expulsión MexEF-OprN, por la pérdida de la porina *oprD* o por la expresión de carbapenemasas. Pese a que el sistema de bombeo MexEF-OprN no se ve alterado frecuentemente en los aislados clínicos de *P. aeruginosa*, se ha demostrado la influencia de la hipoxia en la expresión<sup>19</sup>, y alta proporción de alteraciones en este sistema de bombeo en aislados provenientes de pacientes con FQ<sup>18</sup>. En dicho estudio, 19 de las 20 cepas estudiadas presentaron un aumento en la expresión de MexCD-OprJ y MexEF-OprN, siendo ambos los mecanismos mayoritarios en la resistencia a ciprofloxacino.

La cepa 2, de aspecto metálico, sufrió drásticas variaciones en la sensibilidad especialmente a los betalactámicos. El cuadro de aumento de resistencia a aztronam, ceftazidima y piperacilina-tazobactam, pero no para imipenem, sugiere la existencia de un incremento en la expresión de alguna betalactamasa, como pudiera ser la *ampC* cromosómica, si bien no se puede descartar un efecto general en la respuesta derivado de una adaptación fenotípica a la presencia antibiótica.

Como conclusión, los resultados de este estudio sugieren por un lado que una terapia encaminada a reducir la atmósfera anaerobia generada en la mucosidad en pacientes con FQ (ya fuera mediante fisioterapia respiratoria o farmacológicamente con acetilcisteína o similares) podría promover la exposición de las células de *P. aeruginosa* a concentraciones de oxígeno mayores, aumentando el éxito del tratamiento con ciertos antibióticos, ya que se especula sobre la gran importancia de la resistencia inducida por la hipoxia en los fracasos terapéuticos de los pacientes con FQ<sup>19</sup>.

Por otro lado, estos resultados nos deberían recordar la potencial falta de fiabilidad de las determinaciones de sensibilidad antibiótica tradicionales como un claro indicador del éxito terapéutico. En algunas ocasiones, el resultado del antibiograma puede infravalorar el efecto del antimicrobiano, como sería el caso de ciprofloxacino en las cepas 3 y 4, mientras que en otros, como es el caso de la cepa 2 y los betalactámicos, la efectividad del tratamiento sería sobrevalorada.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245:1066-72.

2. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al.. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989; 245:1073–80.
3. Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ. Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* 1992; 358:761–4.
4. Sheppard DN, Rich DP, Ostedgaard L, Gregory RJ, Smith A, Welsh MJ. Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl-channels with altered pore properties. *Nature* 1993; 362:160–4.
5. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993; 73:1251–4.
6. Dakin CJ, Numa AH, Wang H, Morton JR, Vertyzas CC, Henry RL. Inflammation, infection, and pulmonary function in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:904–10.
7. Burns JL, Gibson R, McNamara S, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 2001; 183:444–52.
8. Oliver, A., R. Cantón, P. Campo, F. Baquero, J. Blázquez. 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288; 1251–4.
9. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48:2659–64.
10. Alvarez-Ortega C, Harwood CS. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to low oxygen indicate that growth in the cystic fibrosis lung is by aerobic respiration. *Mol Microbiol* 2007; 65:153–65.
11. Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002; 109:317–25.
13. Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002; 18; 416:740–3.
14. Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:397–403.
15. Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman SV, Rowe JJ, Yoon SS, et al. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 5; 54:1425–43.
16. Williams, WA Venables, D Lloyd, F Paul, I Critchley, The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 1997; 143: 2407–13.
17. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1633–41.
18. Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:710–2.
19. Schaible B, Taylor CT, Schaffer K. Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of multidrug efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:2114–8.