



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

[www.elsevier.es/eimc](http://www.elsevier.es/eimc)



## Estudios de sensibilidad en bacterias anaerobias

José E. García-Sánchez<sup>a,b,\*</sup>, Enrique García-Sánchez<sup>b</sup> y María Inmaculada García-García<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Microbiología, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, España

<sup>b</sup>Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

### RESUMEN

#### Palabras clave:

Métodos de sensibilidad  
Bacterias anaerobias  
Dilución en agar  
Microdilución en caldo  
Difusión a partir de tiras  
Método disco placa  
Sistemas comerciales

La resistencia de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos es creciente e incluso ha aparecido frente a los más activos, como metronidazol y carbapenémicos. Este hecho obliga a realizar pruebas de sensibilidad rutinarias –al menos en los casos en que se aíslan de infecciones graves en las especies más agresivas y virulentas y ante la falta de respuesta terapéutica– de forma periódica para comprobar la sensibilidad local y establecer terapias empíricas adecuadas, con independencia de los estudios multicéntricos realizados con estos fines o para comprobar la actividad de nuevos antimicrobianos. Para la rutina de laboratorio, el método de sensibilidad más sencillo es el de difusión a partir de tiras con gradientes exponenciales de antimicrobianos; una alternativa es la microdilución, particularmente a partir de placas comerciales, pero solo está normalizada para *Bacteroides*. Hay datos preliminares que permiten el uso del método de difusión disco placa en algunas especies de *Bacteroides* y *Clostridium*. Para los estudios periódicos y multicéntricos, el procedimiento es la dilución en agar, que es el método de referencia.

© 2014 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria

#### ABSTRACT

#### Keywords:

Methods for antimicrobial susceptibility testing  
Anaerobic bacteria  
Agar dilution method  
Broth microdilution method  
Diffusion from method  
Disk diffusion method  
Commercial systems for antimicrobial susceptibility testing

The anaerobic bacteria resistance to antibiotics is increasing, and even has appeared against the most active of those, like metronidazol and carbapenems. This fact forces to make and periodical sensibility tests –at least in the most aggressive and virulent species, in cases that they are isolated from life locations and in the absence of therapeutic response– to check the local sensibility and to establish suitable empiric therapies, all based on multicentric studies carried out in order to this or well to check the activity of new antibiotics. For the laboratory routine, the easiest sensibility method is the E-test/MIC evaluator. Another alternative is microdilution, that's only normalized for *Bacteroides*. There are preliminary facts that allow the use of disc diffusion method in some species of *Bacteroides* and *Clostridium*. For the temporal and multicentric studies, the procedure is dilution in agar plate, the reference method.

© 2014 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

Las bacterias anaerobias siguen siendo motivo de interés dentro de la microbiología y las enfermedades infecciosas. Algunas especies constituyen un problema importante en la actualidad, como es el caso de *Clostridium difficile*, otras han emergido y otras, incluso, han vuelto a tomar el papel que tuvieron en su día. Las mejoras en el diagnóstico y la resistencia no son ajenas a este interés<sup>1</sup>.

Los microorganismos anaerobios, como importantes componentes de la microbiota normal, no se han librado de la presión selectiva que ejercen los antimicrobianos usados en terapéutica y profilaxis. Así, la resistencia en ellos es, también, preocupante y afecta a múltiples especies e implica a la mayoría de los antimicrobianos que se utilizan en las infecciones en las que están implicados, incluso a los más activos como metronidazol y carbapenémicos<sup>1</sup>. La resistencia y los mecanismos implicados en ella han ido aumentando, lo que ha llevado a la aparición de cepas multirresistentes<sup>2,3</sup>. Su distribución no es homogénea, cambia geográficamente y no afecta a todos los anaerobios por igual. Su frecuencia es mayor en las especies más habituales e importantes en clínica, muchas pertenecientes a los géneros

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: joegas@usal.es (J.E. García-Sánchez).

*Bacteroides* y *Parabacteroides*, entre las que hay importantes variaciones interespecie<sup>4,5</sup>.

El hecho es inquietante y obliga a realizar pruebas de sensibilidad a las bacterias anaerobias, al menos en algunas circunstancias<sup>6-8</sup>; muchos laboratorios no las hacen de rutina<sup>9</sup>, como es el caso de las infecciones graves en las que el conocimiento de la sensibilidad puede ser determinante para el paciente, también cuando se aíslan de algunos lugares estériles como sangre, sistema nervioso central, hueso o articulaciones, en los fracasos terapéuticos<sup>6,7</sup> y en las especies que presentan elevada resistencia<sup>8</sup>, variable sensibilidad y alto poder patógeno, particularmente las del género *Bacteroides* y *Parabacteroides* que conforman el grupo *fragilis*.

Además, es necesario: a) hacer estudios periódicos de sensibilidad en el ámbito local, en cada hospital, y multicéntricos para comprobar la evolución de la resistencia, particularmente de las especies más importantes en clínica, con el fin de establecer pautas de tratamiento empírico adecuadas, y b) comprobar la actividad de los nuevos antimicrobianos<sup>6</sup>.

Los procedimientos utilizados para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de las bacterias anaerobias son, en esencia, los mismos que los utilizados para las aerobias y facultativas, pero están condicionados por factores inherentes a estos microorganismos que dificultan su cultivo; entre ellos se encuentra la necesidad de una atmósfera sin oxígeno, los requerimientos nutricionales y la velocidad de crecimiento, que difieren de unas especies a otras. Las técnicas que se utilizan en la actualidad son la dilución en agar, la microdilución en caldo, la difusión a partir de tiras con gradientes exponenciales de antimicrobiano<sup>10</sup> y algunas comerciales. Con estas pruebas se calcula la menor concentración de antimicrobiano que impide el crecimiento visible o concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/l o µg/ml, cuya determinación depende del método. No se emplea la dilución en tubo porque consume mucho tiempo, espacio, materiales y mano de obra y, además, porque al ser manual, está sujeta a errores<sup>11</sup> y no son infrecuentes las contaminaciones. El método de elución en caldo a partir de discos<sup>12</sup> está en desuso, como ha puesto de manifiesto un estudio reciente que recoge los datos de una

encuesta sobre los procedimientos aplicados al estudio de las bacterias anaerobias por los laboratorios de microbiología norteamericanos<sup>9</sup>. Otro tanto puede decirse del método de gradiente en espiral<sup>13</sup>, a pesar de sus resultados prometedores<sup>14</sup>. Por su sencillez se ha vuelto a investigar la difusión a partir de discos en especies de crecimiento rápido<sup>15</sup>.

En cualquiera de estos métodos hay que tener en cuenta: a) las cepas; se puede partir de aislamientos recientes o congelados, en cuyo caso deben ser subcultivadas al menos 2 veces antes de realizar la prueba; b) los antimicrobianos; en España deben ensayarse para clínica la penicilina (solo para grampositivos, no en gramnegativos y en especial en *Bacteroides* spp. y *Parabacteroides* spp., que en su mayoría son resistentes a las penicilinas, los datos obtenidos valen para las aminopenicilinas), amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina/tazobactam, cefoxitina, clindamicina, ertapenem, imipenem, meropenem, metronidazol, tigeciclina y vancomicina (*C. difficile*). En caso de multiresistencia se amplía a cloranfenicol, linezolid y moxifloxacino. En investigación, cualquier antimicrobiano que pueda tener actividad frente a anaerobios; c) el medio de cultivo, que debe soportar el crecimiento de la mayor parte de los anaerobios y dar resultados reproducibles; en lo posible debe ser reciente o prerreducido para minimizar su oxigenación; d) el inóculo, que puede cambiar en relación con el método elegido; e) el sistema que proporciona la atmósfera anaerobia, que debe hacerlo de forma rápida y fiable, se pueden emplear jarras anaerobias (de catálisis o reemplazo) usando indicadores, bolsas o cámaras de anaerobios, la concentración de CO<sub>2</sub> debe oscilar entre el 4 y el 7%<sup>8</sup>, se considera que la anaerobiosis es aceptable cuando un disco de 5 mg de metronidazol produce un halo de inhibición en un cultivo de *Clostridium perfringens* > 27 mm<sup>16</sup>; f) el tiempo y la temperatura de incubación<sup>8</sup>; g) las cepas control de sensibilidad antimicrobiana establecida, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 2974, para gramnegativos y *Eggerthella lenta* ATCC 43055 y *C. difficile* ATCC 700057 para grampositivos<sup>17</sup> (tablas 1-2), y h) la valoración, en relación con la CMI; los puntos de corte más usados son los propuestos por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)<sup>17</sup> y por el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility

**Tabla 1**  
Intervalos de concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas control a distintos antimicrobianos obtenidas por dilución en agar, según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>17</sup>

Antimicrobiano	Dilución en agar/cepas control CMI (µg/ml)			
	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	<i>Clostridium difficile</i> ATCC 700057	<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 43055
Ampicilina	16-64	16-64	1-4	-
Penicilina	8-32	8-32	1-4	-
Amoxicilina/ácido clavulánico	0,25/0,125-1/0,5	0,5/0,25-2/1	0,25/0,125-1/0,5	-
Piperacilina/tazobactam	0,125/4-0,5/4	4/4-16/4	4/4-16/4	4/4-16/4
Cefoxitina	4-16	8-32	-	4-16
Doripenem	-	-	0,5-4	-
Ertapenem	0,06-0,25	0,25-1	-	0,5-2
Imipenem	0,03-0,125	0,125-0,5	-	0,125-0,5
Meropenem	0,03-0,25	0,125-0,5	0,5-4	0,125-1
Moxifloxacino	0,125-0,5	1-4	1-4	0,125-0,5
Clindamicina	0,5-2	2-8	2-8	0,06-0,25
Cloranfenicol	2-8	4-16	-	-
Linezolid	2-8	2-8	1-4	0,5-2
Tigeciclina	0,125-1	0,5-2	0,125-1	0,06-0,5
Metronidazol	0,25-1	0,5-2	0,125-0,5	-
Vancomicina	-	-	0,5-4	-
Fidaxomicina	-	-	0,06-0,25	-

**Tabla 2**Intervalos de concentración mínima inhibitoria (CMI) a distintos antimicrobianos de las cepas control obtenidas por microdilución, según el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>17</sup>

Antimicrobiano	Microdilución/cepas control CMI (µg/ml)			
	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741	<i>Clostridium difficile</i> ATCC 700057	<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 43055
Penicilina	8-32	8-32	-	-
Amoxicilina/ácido clavulánico (2:1)	0,25/0,125-1/0,5	0,25/0,125-1/0,5	-	-
Piperacilina-tazobactam	0,03/4-0,25/4	2/4-16/4	-	8/4-32/4
Cefoxitina	2-8	8-64	-	2-16
Doripenem	0,12-0,5	0,12-1	-	-
Ertapenem	0,06-0,5	0,5-2	-	0,5-4
Imipenem	0,03-0,25	0,25-1	-	0,25-2
Meropenem	0,03-0,25	0,06-0,5	-	0,125-1
Moxifloxacino	0,12-0,5	1,0-8	-	0,12-0,5
Clindamicina	0,5-2	2-8	-	0,06-0,25
Cloranfenicol	4-16	8-32	-	4-16
Linezolid	2-8	2-8	-	0,5-2
Tigeciclina	0,06-0,5	0,25-1	0,03-0,12	-
Metronidazol	0,25-2	0,5-4	-	0,125-0,5

**Tabla 3**

Interpretación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos más comúnmente utilizados en clínica

Antimicrobiano	CLSI <sup>17</sup> CMI (µg/ml)			EUCAST <sup>18</sup> CMI (µg/ml)	
	Sensible	Intermedio	Resistente	Sensible	Resistente
Ampicilina <sup>a</sup>	≤ 0,5	1	≥ 2	≤ 4	> 8
Penicilina <sup>a</sup>	≤ 0,5	1	≥ 2	≤ 0,25	> 0,5
Amoxicilina/ácido clavulánico	≤ 4/2	8-4	≥ 16/8	≤ 4	> 8
Piperacilina/tazobactam	≤ 32/4	64/4	≥ 128/4	≤ 8	> 16
Cefoxitina	≤ 16	32	≥ 64	-	-
Doripenem	≤ 2	4	≥ 8	≤ 1	> 1
Ertapenem	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	> 1
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16	≤ 2	> 8
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16	≤ 2	> 8
Moxifloxacino	≤ 2	4	≥ 8	-	-
Clindamicina	≤ 2	4	≥ 8	≤ 4	> 4
Cloranfenicol	≤ 8	16	≥ 32	≤ 8	> 8
Metronidazol	≤ 8	16	≥ 32	≤ 4 <sup>b</sup>	> 4 <sup>b</sup>
Vancomicina	-	-	-	≤ 2	> 2

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

<sup>a</sup>Solo para grampositivos (excepto *C. difficile*); muchos gramnegativos producen β-lactamasas.<sup>b</sup>Para *C. difficile* la mitad.Testing)<sup>18</sup>. Según ellos, se determina que la CMI obtenida entra en las categorías de sensible, intermedia o resistente (tabla 3).

### Método de dilución en agar

El procedimiento consiste en sembrar distintas cepas, utilizando un multiinoculador, en una serie de placas con concentraciones crecientes de un antibiótico diluido en un agar que permita el crecimiento de la mayoría de anaerobios. Está aprobado y normalizado por el CLSI, que ha publicado distintos documentos al respecto, el último en 2012<sup>8</sup>, y algunos comentarios en la actualización de 2013<sup>17</sup>.

Sigue lo recogido en el *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual*<sup>6</sup>. Es el método de referencia con el que se comparan otros procedimientos. Se emplea para determinar la sensibilidad de múltiples cepas a la vez, por ello está especialmente indicado en los estudios periódicos y multicéntricos y para investigar los antimicrobianos nuevos. Presenta una elevada reproductividad, permitiendo establecer comparaciones entre los resultados obtenidos en distintos centros. Se puede usar con bacterias exigentes y de crecimiento lento. Es un método engorroso y laborioso pues su realización requiere múltiples pasos y numeroso material. No es útil en rutina ni para probar la sensibilidad de cepas aisladas.

## Antimicrobianos

Se pueden obtener como polvo estándar de los laboratorios que los comercializan, particularmente los más recientes, o de laboratorios de reactivos. No deben utilizarse los comerciales en los que no se conoce la potencia y además pueden llevar excipientes. De cada antimicrobiano hay que conocer su lote, fecha de caducidad, potencia, estabilidad y solubilidad. Se deben conservar adecuadamente según las especificaciones del fabricante y manejar evitando su hidratación y degradación. Los cálculos se realizan teniendo en cuenta la potencia antimicrobiana ( $\mu\text{g}$  o UI) por miligramo, que varía según el lote, no en relación con el peso real. El antimicrobiano se disuelve en agua destilada estéril o en el solvente adecuado de acuerdo con las especificaciones técnicas y posteriormente se añade, como diluyente, la cantidad necesaria de agua destilada o del tampón adecuado. La solución madre debe ser, si es posible, de 1.000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o 10 veces mayor que la concentración más alta que se vaya a utilizar y se puede conservar durante meses congelada a una temperatura  $\leq 60^\circ\text{C}$ . Cuando se preparan las placas a partir de una solución madre se realizan diluciones dobles, de tal forma que el volumen que se añade al agar contenga la cantidad de antimicrobiano necesaria para alcanzar la concentración deseada en cada una de ellas, para 18 ml de medio con sangre se añaden 2 ml de antibiótico y para 27 ml hay que poner 3 ml. Se realizan diluciones por encima y por debajo del punto de corte del antimicrobiano a ensayar y de acuerdo con los principios que tenga diseñados el estudio. Una vez descongelada para su uso la solución madre debe ser desechada.

### Medio de cultivo e incorporación de los antimicrobianos

Se utiliza agar brucella suplementado. El agar brucella con la hemina y la vitamina K1 se puede preparar el día de la prueba o previamente, en cuyo caso se conserva refrigerado. Se distribuye en tubos, a razón de 17 o 25,5 ml según se vayan a emplear placas redondas o cuadradas. El día de la prueba, los tubos con el agar líquido, recién preparado o fundido si se había realizado antes, se mantienen a 48-59  $^\circ\text{C}$  en baño maría y se le añade a cada uno 1 o 1,5 ml de sangre y 2 o 3 ml de la dilución de antimicrobiano correspondiente según el tipo de placa empleada. Se tapa el tubo y se invierte varias veces evitando hacer burbujas, tras lo cual se deposita en la placa en la que previamente se ha marcado la concentración correspondiente. Las placas se dejan solidificar y, posteriormente, se seca su superficie con cualquiera de los procedimientos habituales en microbiología para que el inóculo se absorba. Las placas deben ser recientes, de menos de 72 h, y si se ensaya imipenem o combinaciones con ácido clavulánico se prepararán el mismo día, porque estos antimicrobianos son inestables. En el caso de utilizarse para rutina se pueden conservar en bolsas a 2-8  $^\circ\text{C}$  1 semana<sup>8</sup>, aunque esta práctica es excepcional<sup>3</sup>.

### Controles

Para un solo antibiótico incluir 4 placas de agar brucella suplementado sin antibiótico, la solución de antimicrobiano se sustituye por agua destilada estéril; por cada antimicrobiano adicional hay que añadir una placa más sin antibiótico. Incluir 2 de las cepas control adecuadas por cada 30 aislamientos (tabla 1)<sup>8,17</sup>.

### Inóculo

Se prepara a partir de las colonias obtenidas en agar brucella suplementado tras una incubación de 24 h (*Bacteroides*, *Parabacteroides* y *C. perfringens*) o 48 h. Se puede obtener: a) tomando 5 o más colonias aisladas e idénticas y emulsionándolas directamente en un caldo brucella prerreducido o hervido y enfriado para eliminar el  $\text{O}_2$ , que es el procedimiento más sencillo, o b) sembrando 5 o más colonias en un caldo tioglicolato suplementado sin indicador, hervido y

enfriado, que se incuba de 6 a 24 h a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , si se utiliza una cámara, el tioglicolato se puede sustituir por un caldo enriquecido. En ambos casos se ajusta la turbidez al 0,5 de la escala de McFarland con caldo brucella. Se debe hacer un recuento de una dilución del inóculo.

## Procedimiento

Para inocular las placas se utiliza un replicador de Steers, manual o automático, en cuyos pocillos se ha depositado previamente 0,5 ml del inóculo de cada cepa a estudiar, incluidas las empleadas como controles, cuyo número depende del modelo de replicador. Cada pivote de la placa inoculadora deposita en la superficie del agar de 1 a 2  $\mu\text{l}$ , lo que equivale a unas  $10^5$  unidades formadoras de colonias (UFC) para *B. fragilis* y otros anaerobios, pero no para todos. La siembra se puede realizar en atmósfera normal salvo para los muy sensibles al oxígeno y se debe evitar salpicar; se comienza por 2 placas control presiembra, una para el control de crecimiento en anaerobiosis y otra en aerobiosis, a continuación se siembran las placas con antibióticos comenzando por la de menos concentración y al final 2 controles postsiembra para anaerobiosis y aerobiosis. Para cada serie de antibiótico se siembra una placa de control más. Los controles se emplean para comprobar el crecimiento en anaerobiosis y una posible contaminación. Una vez seco el inóculo se invierten las placas y se incuban en anaerobiosis (jarra o campana), salvo los controles aerobios, a 35-37  $^\circ\text{C}$  durante 42-48 h<sup>8,17</sup>.

### Interpretación

Se valora el crecimiento y las contaminaciones y se considera como CMI a la menor concentración de un antimicrobiano que produce una reducción marcada del crecimiento en comparación con el de la placa control, por ejemplo un crecimiento ligero y difuso, la presencia de menos de 10 colonias diminutas o de 1-3 colonias de tamaño normal<sup>8</sup>. En relación con el punto de corte, la cepa se considera sensible, intermedia o resistente (tabla 3).

## Método de microdilución en caldo

En este procedimiento, las distintas concentraciones de los antibióticos obtenidas al diluirlos progresivamente en un caldo se distribuyen en los pocillos de microplacas en los que ulteriormente se deposita el inóculo. Se utilizan microplacas estériles de 96 pocillos (12  $\times$  8) con fondo redondo o cónico, por lo que se pueden probar 8 diluciones de 12 antimicrobianos. Está aprobado y normalizado por el CLSI, pero solo para las especies de los géneros *Bacteroides* y *Parabacteroides* que forman el grupo "fragilis" y para los antibióticos que muestran o que pueden tener actividad frente a ellas<sup>8</sup>. El método requiere una cierta manipulación, por lo que es un poco engorroso; esto, unido a su limitada estandarización para *Bacteroides*, limita su uso. Hay sistemas comerciales de microdilución que facilitan su empleo (v. el apartado correspondiente).

### Antimicrobianos

Su obtención, conservación y dilución para obtener las soluciones madre coincide con lo descrito en el correspondiente apartado de dilución en agar<sup>8</sup>. Se parte de una solución madre 10 veces mayor que la concentración más alta que se vaya a utilizar, a partir de la cual se realizan las diluciones dobles seriadas.

### Medio de cultivo e incorporación de los antimicrobianos

Se emplea caldo brucella suplementado con 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de hemina y 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de vitamina K1 por ml y un 5% de sangre lisada de caballo. A 9 partes de este caldo (la cantidad depende del número de placas que

se vayan a preparar) se le añade 1 parte de cada dilución del antimicrobiano. A continuación se reparten alícuotas de las mezclas en los pocillos con ayuda de un dispensador. Lo más sencillo es dispensar 0,05 ml por pocillo, con una concentración de los antimicrobianos doble a la que se desee, que se consigue al añadir 0,05 ml del inóculo. Si se dispensa 0,1 ml hay que añadir un inóculo de 0,01 ml. Es necesario hacer los cálculos correspondientes. En cualquier caso, en el ensayo no debe haber un volumen final por pocillo inferior a 0,1 ml. Las placas preparadas se usan el día de su preparación o se congelan en bolsas a  $\leq 60$  °C y no pueden someterse a ciclos de congelación y descongelación.

#### Controles

En cada microplaca debe haber 2 pocillos con caldo sin antibiótico. Una se inocula y actúa como control de crecimiento y otra demuestra la esterilidad cuando, después de la incubación, el caldo se siembra en un medio enriquecido en aerobiosis y anaerobiosis. Además se incuba una placa sin inocular por lote para comprobar la esterilidad. Es preciso incluir una cepa control<sup>2</sup>.

#### Inóculo

Se prepara de la forma descrita en la dilución en agar ajustando la turbidez al 0,5 de la escala de McFarland. Si se inoculan 0,05 ml sobre 0,05 ml de las diluciones del antibiótico se diluye con caldo brucella enriquecido al 1:75, lo que equivale a  $10^6$  UFC/ml. Si se dispensan, con un inoculador, 0,01 ml sobre 0,1 ml la dilución se hace con suero fisiológico o caldo al 1:15. Como control para recuento se toman 10  $\mu$ l, se diluyen en 10 ml de solución salina y 0,1 ml se siembran en una placa de agar sangre para anaerobios, que se incuba en anaerobiosis 48 h. Un procedimiento similar se emplea para comprobar la ausencia de contaminación, en este caso se siembran 2 placas de agar sangre que se incuban en aerobiosis y anaerobiosis.

#### Procedimiento

Las placas congeladas se descongelan a temperatura ambiente. El intervalo de tiempo entre la preparación del inóculo y su inoculación no debe superar los 15 min. Las placas inoculadas se incuban en anaerobiosis a 35-37 °C durante 46-48 h evitando la evaporación de los pocillos con una humedad adecuada.

#### Interpretación

Hay que valorar la esterilidad, el crecimiento, que debe ser claro en el pocillo control, y las contaminaciones. La lectura se realiza valorando el crecimiento en el fondo de los pocillos con la ayuda de un lector de espejo. Se considera como CMI a la menor concentración de un antimicrobiano que produce ausencia de crecimiento o una reducción marcada de este. En relación con el punto de corte, la cepa se considera sensible, intermedia o resistente (tabla 3).

#### Método de difusión a partir de tiras con gradiente creciente de antimicrobianos (E-test, MIC evaluator, MIC test strip)

Este procedimiento (E-test) está aprobado por la FDA pero no por el CLSI<sup>10</sup>. Muestra buena correlación con la dilución en agar<sup>19</sup>, las discordancias mayores se producen en *Bacteroides* del grupo *fragilis* y *Clostridium* spp. con metronidazol y penicilina<sup>20</sup>. Es un método muy sencillo, útil en rutina, ya que permite probar la sensibilidad de cepas aisladas, incluidas las muy exigentes y de crecimiento lento<sup>19</sup>; también es posible ensayar antimicrobianos nuevos e incluso realizar estudios multicéntricos<sup>21</sup>. Es el procedimiento más utilizado en rutina<sup>9</sup>. Tiene el inconveniente del coste elevado de las tiras, que se puede minimizar seleccionándolas racionalmente.

#### Antimicrobianos

Se parte de tiras de E-test (bioMérieux) o de MIC evaluator (Thermo Fisher Scientific). Los resultados obtenidos evaluando ambos tipos de tiras en anaerobios son similares<sup>20</sup>. No hay estudios comparativos con MIC Test Strip (LIOFILCHEM diagnostic). Existen tiras de los antimicrobianos usados habitualmente en las infecciones por anaerobios (penicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefoxitina, clindamicina, ertapenem, imipenem, meropenem, metronidazol, tigeciclina y vancomicina), de los empleados en caso de resistencia (cloranfenicol, linezolid, moxifloxacino) y de muchos en desarrollo. Las tiras deben conservarse adecuadamente de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

#### Medio de cultivo

Agar brucella suplementado.

#### Inóculo

Se realiza emulsionando en caldo brucella o en solución salina varias colonias de un cultivo de 48 h en agar brucella suplementado, si bien algunas especies pueden requerir más tiempo para crecer. La emulsión se ajusta a una densidad equivalente al 0,5<sup>19</sup> o al 1<sup>22</sup> de la escala de McFarland.

#### Procedimiento

La suspensión se siembra de forma homogénea, con un hisopo, por toda la superficie de una placa de agar. Una vez que se ha secado se depositan las tiras manualmente o con un dispensador. En las placas de 90 mm de diámetro 1 o 2, en este caso, se colocan paralelamente oponiendo el extremo con la concentración más alta. En las de 150 mm, hasta 6, que se disponen de forma radial con el extremo con mayor concentración hacia la periferia. Las placas se incuban invertidas a  $36 \pm 1$  °C en una cámara o en una jarra de anaerobios 48 h; algunas especies pueden requerir más tiempo. En *Bacteroides*, *Parabacteroides* y *Clostridium* pueden ser suficientes 24 h excepto para clindamicina<sup>19</sup>. La incubación en cámara de anaerobios tiene ventajas porque la comprobación del crecimiento se puede hacer en cualquier momento y la anaerobiosis es inmediata; esta circunstancia es muy importante en las especies muy sensibles al oxígeno y en los ensayos con metronidazol, cuya actividad se afecta mucho por este elemento<sup>23</sup>.

#### Controles

Comprobar la actividad de cada lote con las cepas de control adecuadas.

#### Interpretación

La CMI se determina en el lugar donde la elipse de inhibición hace intersección con la tira y se lee en la escala que esta lleva impresa. Este procedimiento permite la detección de heterorresistencia en algunas bacterias y algunos antimicrobianos, como es el caso de *C. difficile* a metronidazol, que no se pone de manifiesto con la dilución en agar<sup>24</sup>, o la de *B. fragilis* a carbapenémicos<sup>25</sup>.

#### Método de difusión con discos

No está aprobado por el CLSI, fue considerado en su día y luego abandonado por su falta de correlación con la dilución en agar<sup>10</sup>. En la actualidad se investiga en especies de crecimiento rápido<sup>15</sup>, pero está lejos de una normalización. Por su disponibilidad es aconsejable en los laboratorios que no tengan otras posibilidades para *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* y *C. perfringens*, especies de fácil identificación.

**Tabla 4**  
Puntos de corte para las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y halos de inhibición en algunas especies de anaerobios<sup>27</sup>

Antibióticos	Puntos de corte de la CMI (µg/ml)			Carga de los discos (µg)	Interpretación del halo de inhibición (mm)			Bacterias
	Resistente	Intermedio	Sensible		Resistente	Intermedio	Sensible	
Amoxicilina/ácido clavulánico	> 8	8	≤ 4	30	≤ 20	21-28	≥ 29	<i>Bacteroides fragilis</i>
Piperacilina/tazobactam	> 16	16	≤ 8	75/10	≤ 31	–	≥ 32	<i>Clostridium perfringens</i>
					≤ 26	–	≥ 27	<i>B. fragilis</i>
Meropenem	> 8	4-8	≤ 2	10	≤ 29		≥ 30	<i>C. perfringens</i>
					≤ 18	19-25	≥ 26	<i>B. fragilis</i>
Clindamicina	> 4	–	≤ 4	2	≤ 9	–	≥ 10	<i>B. fragilis</i>
								<i>B. thetaiotaomicron</i>
								<i>C. perfringens</i>
Metronidazol	> 4	–	≤ 4	5	≤ 17	–	≥ 18	<i>B. fragilis</i>
								<i>B. thetaiotaomicron</i>
								<i>C. perfringens</i>

#### Antimicrobianos

Se parte de discos de antibiograma comerciales convenientemente conservados.

#### Medio de cultivo

Agar brucella suplementado. Debe ser reciente.

#### Inóculo

Se realiza de la forma mencionada en la dilución en agar.

#### Procedimiento

La suspensión se siembra de forma homogénea, con un hisopo, por toda la superficie de una placa de agar. Una vez que se ha secado se depositan los discos manualmente o con un dispensador, no más de 4 en cada placa de 9 mm. Las placas se incuban invertidas a 36 ± 1 °C en una cámara o en una jarra de anaerobios 48 h<sup>26</sup>.

#### Interpretación

Tras este tiempo se mide el halo de inhibición con un calibre. La British Society for Antimicrobial Chemotherapy ha publicado una aproximación con amoxicilina/ácido clavulánico y *B. fragilis* y con piperacilina/tazobactam, meropenem, clindamicina y metronidazol y *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* y *C. perfringens* (tabla 4). Las cepas que son resistentes por este método deben estudiarse para confirmarlo por dilución en agar<sup>27</sup>.

#### Sistemas comerciales

Las placas de microdilución Sensititre®-Anaerobe MIC Plate (Trek Diagnostic Systems) están diseñadas para estudiar una cepa por placa y su utilización es sencilla porque su uso permite la semiautomatización. Los paneles contienen las distintas concentraciones de antimicrobianos desecados; así se pueden almacenar a temperatura ambiente y presentan larga caducidad (18-24 meses). Tienen el inconveniente de que los antimicrobianos que incorporan son fijos y

pueden no adaptarse a las necesidades locales. Gracias a un autoinoculador se realiza una dispensación automática del inóculo. Sigue las normas del CLSI.

El ATB ANA® (bioMérieux) es un método de microdilución parcial. Consiste en una galería en la que hay 16 pares de pocillos con diferentes antibióticos que se ensayan a 2 concentraciones y cuya lectura es automatizada<sup>28</sup>. El método se correlaciona bien con la dilución en agar<sup>29</sup>.

#### Detección de β-lactamasas

Se puede realizar en gramnegativos distintos a “*Bacteroides* del grupo *fragilis*”, que habitualmente las producen. Su utilidad es relativa, pues hay cepas resistentes a β-lactámicos por otros mecanismos. Su producción implica la resistencia a aminopenicilinas. Se detecta usando un método basado en la cefalosporina cromogénica (nitrocefín)<sup>8</sup>.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Bibliografía

- García-Sánchez JE, García-Sánchez E, Martín-del-Rey A, García-Merino E. Las bacterias anaerobias 150 años después de su descubrimiento por Pasteur. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013. doi:pii: S0213-005X(13)00087-6.
- Nagy E. Anaerobic infections: update on treatment considerations. *Drugs*. 2010;70:841-58.
- Goldstein EJC, Citron DM, Hecht DW. Antimicrobial resistance of anaerobic bacteria. En: Fong IW, Drlica K, editors. *Antimicrobial Resistance and Implications for the Twenty-First Century*. Nueva York: Springer; 2008. p. 207-30.
- Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Hecht DW, Goldstein EJ, et al. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005-2007). *Clin Infect Dis*. 2010;50 Suppl 1:S26-33.
- Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Goldstein EJC, Harrell L, et al. Update on resistance of *Bacteroides fragilis* group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009. *Anaerobe*. 2011;17:147-51.
- Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual*. 6th ed. Belmont, CA: Star Publishing Co.; 2002.
- Jenkins SG, Schuetz AN. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy. *Mayo Clin Proc*. 2012;87:290-308.
- CLSI. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved standard*. Eighth edition. CLSI document M11-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

9. Goldstein EJ, Citron DM, Goldman PJ, Goldman RJ. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III. Anaerobe. 2008;14:68-72.
10. Hecht DW. Evolution of anaerobe susceptibility testing in the United States. Clin Infect Dis. 2002;35 Suppl 1:S28-35.
11. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis. 2009;49:1749-55.
12. Kurzynski TA, Yrios JW, Helstad AG, Field CR. Aerobically incubated thioglycolate broth disk method for antibiotic susceptibility testing of anaerobes. Antimicrob Agents Chemother. 1976;10:727-32.
13. Hill GB. Spiral gradient endpoint: a new method of susceptibility testing. Hosp Pract (Off Ed). 1990;25 Suppl 4:31-7.
14. Wexler HM, Molitoris E, Murray PR, Washington J, Zabransky RJ, Edelstein PH, et al. Comparison of spiral gradient endpoint and agar dilution methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria: a multilaboratory collaborative evaluation. J Clin Microbiol. 1996;34:170-4.
15. Justesen US. Antibiotic resistance determination; dilution methods versus disc diffusion. The old story comes back. En Practical approach to diagnose mixed anaerobic infections in "real time". 22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). Londres 31/03/2012-03/04/2012 [Internet] [consultado 20-5-2013]. Disponible en: [http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT\\_ID=146228&XNSPRACHE\\_ID=1&XNKONGRESS\\_ID=161&XNMASKEN\\_ID=900](http://registration.akm.ch/einsicht.php?XNABSTRACT_ID=146228&XNSPRACHE_ID=1&XNKONGRESS_ID=161&XNMASKEN_ID=900)
16. Justesen T, Justesen US. A simple and sensitive quality control method of the anaerobic atmosphere for identification and antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;76:138-40.
17. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
18. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, valid from 2013-02-11 [consultado 13-6-2013]. Disponible en: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf)
19. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol. 1991;29:2197-203.
20. Rennie RP, Turnbull L, Brosnikoff C, Cloke J. First comprehensive evaluation of the M.I.C. evaluator device compared to E-test and CLSI reference dilution methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical strains of anaerobes and other fastidious bacterial species. J Clin Microbiol. 2012;50:1153-7.
21. Glupczynski Y, Berhin C, Nizet H. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Belgium as determined by E-test methodology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009;28:261-7.
22. Rosenblatt JE, Gustafson DR. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. Diagn Microbiol Infect Dis. 1995;22:279-84.
23. Cormican MG, Erwin ME, Jones RN. False resistance to metronidazole by E-test among anaerobic bacteria investigations of contributing test conditions and medium quality. Diagn Microbiol Infect Dis. 1996;24:117-9.
24. Peláez T, Cercenado E, Alcalá L, Marín M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J, et al. Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. J Clin Microbiol. 2008;46:3028-32.
25. Sóki J, Eitel Z, Urbán E, Nagy E; ESCMID Study Group on Anaerobic Infections. Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. Int J Antimicrob Agents. 2013;41:122-5.
26. Sutter VL, Vargo VL, Finegold SM. Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 2nd ed. Los Angeles: University of California; 1975.
27. Andrews JM, Howe RA; BSAC Working Party on Susceptibility Testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 10). J Antimicrob Chemother. 2011;66:2726-57.
28. Alcalá L, Betriu C, García Sánchez JE, Reig M. Bacterias anaerobias. En: Cercenado E, Cantón R, editores. Procedimientos en Microbiología Clínica. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2004 [consultado 14-6-2013]. Disponible en: <https://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap16.pdf>
29. Dubreuil L, Houcke I, Singer E. Susceptibility testing of anaerobic bacteria: evaluation of the redesigned (version 96) bioMérieux ATB ANA device. J Clin Microbiol. 1999;37:1824-8.