

# Primer consenso argentino para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de las bacterias anaerobias de importancia clínica en humanos

MARÍA C. LEGARIA<sup>1,2\*</sup>, HEBE M. BIANCHINI<sup>2</sup>, LILIANA CASTELLO<sup>2</sup>, GRACIELA CARLONI<sup>2</sup>, ANA DI MARTINO<sup>2</sup>, LILIANA FERNÁNDEZ CANIGIA<sup>2</sup>, MIRTA LITTERIO<sup>2</sup>, RAQUEL ROLLET<sup>2</sup>, ADELAIDA ROSSETTI<sup>2</sup>, SILVIA C. PREDARI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Coordinador, <sup>2</sup>Integrantes de la Subcomisión de Bacterias Anaerobias. Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas (SADEBAC), Asociación Argentina de Microbiología (AAM). Deán Funes 472, (1214) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

\*Correspondencia. E-mail: mclegaria@hotmail.com

## RESUMEN

Históricamente, las bacterias anaerobias se han caracterizado por presentar buena respuesta a los agentes antianaeróbicos de utilidad clínica. Sin embargo, los patrones de resistencia de muchas de las especies asociadas a infecciones graves en humanos se han modificado significativamente en los últimos años, y en la actualidad se advierte resistencia a los antimicrobianos primariamente activos, lo que hace poco predecible su efectividad. En respuesta a estos eventos, la Subcomisión de Bacterias Anaerobias de la Asociación Argentina de Microbiología decidió elaborar el primer consenso argentino para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de las bacterias anaerobias de importancia clínica en humanos. Este consenso se elaboró sobre la base de las pautas establecidas por el Clinical and Laboratory Standards Institute, los trabajos publicados y la experiencia de la subcomisión. El documento incluye una breve actualización taxonómica y explícita cuándo y por qué se deben realizar las pruebas de sensibilidad, qué antimicrobianos se deben probar según el microorganismo en estudio y cuáles son las recomendaciones para realizar el ensayo, la lectura y la interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. Además, se muestran los perfiles de sensibilidad, la categorización de los antibióticos según su actividad *in vitro*, las resistencias naturales y adquiridas, las resistencias emergentes y los patrones de resistencia locales de las especies clínicamente más relevantes.

**Palabras clave:** bacterias anaerobias, pruebas de sensibilidad, antimicrobianos, consenso

## ABSTRACT

**First Argentine consensus guidelines for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing of clinically relevant anaerobic bacteria in humans.** Through time, anaerobic bacteria have shown good susceptibility to clinically useful antianaerobic agents. Nevertheless, the antimicrobial resistance profile of most of the anaerobic species related to severe infections in humans has been modified in the last years and different kinds of resistance to the most active agents have emerged, making their effectiveness less predictable. With the aim of finding an answer and for the purpose of facilitating the detection of anaerobic antimicrobial resistance, the Anaerobic Subcommittee of the Asociación Argentina de Microbiología developed the First Argentine consensus guidelines for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing of clinically relevant anaerobic bacteria in humans. This document resulted from the compatibilization of the Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations, the international literature and the work and experience of the Subcommittee. The Consensus document provides a brief taxonomy review, and exposes why and when anaerobic antimicrobial susceptibility tests should be conducted, and which antimicrobial agents can be used according to the species involved. The recommendations on how to perform, read and interpret *in vitro* anaerobic antimicrobial susceptibility tests with each method are exposed. Finally, the antibiotic susceptibility profile, the classification of antibiotics according to their *in vitro* activities, the natural and acquired mechanisms of resistance, the emerging resistance and the regional antibiotic resistance profile of clinically relevant anaerobic species are shown.

**Key words:** anaerobic bacteria, antimicrobial susceptibility testing, consensus guidelines

## ÍNDICE

1. Introducción y taxonomía
2. Perfiles de sensibilidad de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos
  - 2.1. Categorización de los antibióticos según su actividad *in vitro*.
  - 2.2. Resistencias naturales. Consideraciones generales
  - 2.3. Resistencias adquiridas. Consideraciones generales
  - 2.4. Patrones de resistencia en nuestro medio
3. Cuándo y por qué realizar las pruebas de sensibilidad

4. Cómo realizar las pruebas de sensibilidad
  - 4.1. Consideraciones generales
  - 4.2. Preparación del inóculo
  - 4.3. Atmósfera y tiempo de incubación
  - 4.4. Métodos para evaluar la sensibilidad de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos
    - 4.4.1. Dilución en agar
    - 4.4.2. Microdilución en caldo
    - 4.4.3. Epsilométrico
    - 4.4.4. Elución en caldo con discos
    - 4.4.5. Detección de  $\beta$ -lactamasas
    - 4.4.6. D-test: prueba de difusión con doble disco / tableta
5. Qué antibióticos probar en las pruebas de sensibilidad
6. Cepas patrones
7. Consideraciones finales

## 1. INTRODUCCIÓN Y TAXONOMÍA

Los patrones de resistencia de la mayoría de las bacterias anaerobias han cambiado en estas últimas décadas, en especial en el grupo *Bacteroides fragilis*. Además, se ha detectado emergencia de resistencia a los antibióticos tradicionalmente activos como los  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, los carbapenemes y el metronidazol, así como una mayor resistencia a la clindamicina y a la cefoxitina, lo cual hace poco predecible el esquema terapéutico empírico y demuestra la necesidad de efectuar los estudios de sensibilidad (18, 24, 29, 30, 32, 39).

Si bien las pruebas de sensibilidad *in vitro* de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos no se realizan en forma rutinaria, en ciertas situaciones clínicas se ha demostrado que son necesarias (4, 11, 20, 22, 24, 30, 33, 49). La decisión de realizar el estudio de sensibilidad requiere de un material proveniente de un sitio estéril, clínicamente significativo, en el marco de una patología que requiera un tratamiento prolongado, el que por lo tanto deberá ser efectivo. Asimismo, se necesita un estrecho contacto con el médico tratante. En cuanto a los microorganismos a evaluar, deberán seleccionarse aquellos anaerobios que presenten mayor virulencia y cuya sensibilidad a los antimicrobianos de uso habitual no pueda ser predicha, tales como las especies de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Bilophila* y *Sutterella* (4, 12). En los casos donde se aíslan varios anaerobios potencialmente patógenos, es conveniente seleccionar como mínimo a los miembros del grupo *Bacteroides fragilis*, por ser los más resistentes a los antibióticos (4, 18, 20-22).

Los centros que habitualmente realizan el cultivo y la identificación de las bacterias anaerobias deberían evaluar periódicamente los patrones de resistencia de los microorganismos aislados con mayor frecuencia, con el fin de detectar sus variaciones y la emergencia de resistencia, y de poder orientar la selección del esquema de tratamiento más adecuado (12).

El objetivo de este documento es dar a conocer las recomendaciones consensuadas por la Subcomisión de Bacterias Anaerobias (SBA) para la realización de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos de las bacterias anaerobias aisladas con mayor frecuencia en infecciones en humanos.

Para elaborar este consenso se adoptaron las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (12), de los Manuales de Bacteriología Clínica (11, 16, 31) y de los documentos de la SBA- SA-DEBAC- AAM (5, 6).

Las primeras revisiones de la taxonomía de las bacterias anaerobias se realizaron a fines de los años 70. Desde 1980, el advenimiento de los métodos de la biología molecular produjo cambios muy relevantes que ayudaron a resolver múltiples problemas taxonómicos; no obstante, todavía quedan otros por dilucidar. Sin duda, surgirán nuevas especies y modificaciones en la nomenclatura de estas bacterias. Es por ello que en la actualidad continuamos realizando la identificación de rutina de los aislamientos clínicos por medio del estudio de las características microscópicas, macroscópicas y fenotípicas, y utilizamos las pruebas moleculares como una herramienta válida para una categorización taxonómica más minuciosa.

En la Tabla 1 se muestran los nombres de las bacterias anaerobias aisladas con mayor frecuencia de los materiales clínicos, las modificaciones taxonómicas y los nuevos hallazgos informados en los últimos 10 años (11, 17, 31).

## 2. PERFILES DE SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS ANAEROBIAS

### 2.1. Categorización de los antibióticos según su actividad *in vitro*

En la Tabla 2 se muestra la categorización de la actividad *in vitro* de los antibióticos frente a los distintos grupos de bacterias anaerobias, según los resultados obtenidos a través de los estudios de vigilancia realizados por la SBA en Argentina (18, 21, 23, 33, 35) y la información de otros países (4, 27, 28, 42, 48, 49).

En líneas generales, los antimicrobianos más activos son la combinación de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, los carbapenemes, el cloranfenicol y el metronidazol. Cabe señalar la excepción del último frente a los bacilos gram positivos no esporulados (32).

Las quinolonas fluoradas de cuarta generación como la moxifloxacina presentan mejor actividad frente a los anaerobios que sus predecesoras (por ej., la ciprofloxacina), las cuales tienen actividad marginal frente a este tipo de bacterias. Sin embargo, a pesar de haber sido recientemente incorporadas en el mercado, ya se han detectado cepas del grupo *Bacteroides fragilis* resistentes a estos antibióticos (4, 20, 27).

**Tabla 1.** Nomenclatura de las bacterias anaerobias aisladas con mayor frecuencia de materiales clínicos

Nomenclatura actual	Nuevas especies y modificaciones desde el año 2000	Nomenclatura actual	Nuevas especies y modificaciones desde el año 2000
<b>Bacilos gram negativos</b>			
<i>Alistipes finegoldii</i>	Nueva especie	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	
<i>Alistipes putredinis</i>	<i>Bacteroides putredinis</i>	<i>Porphyromonas catoniae</i>	
<i>Anaerohabdus furcosa</i>	<i>Bacteroides furcosus</i>	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	
<i>Bacteroides caccae</i>		<i>Porphyromonas gingivalis</i>	
<i>Bacteroides coagulans</i>		<i>Porphyromonas levii</i>	
<i>Bacteroides coprocola</i>	<i>Bacteroides vulgatus-like</i>	<i>Porphyromonas somerae</i>	<i>Porphyromonas levii-like</i>
<i>Bacteroides dorei</i>	<i>Bacteroides vulgatus-like</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	
<i>Bacteroides finegoldii</i>		<i>Prevotella baroniae</i>	Nueva especie
<i>Bacteroides fragilis</i>		<i>Prevotella bivia</i>	
<i>Bacteroides nordii</i>	<i>Bacteroides uniformis-like</i>	<i>Prevotella buccae</i>	
<i>Bacteroides ovatus</i>		<i>Prevotella buccalis</i>	
<i>Bacteroides stercoris</i>		<i>Prevotella corporis</i>	
<i>Bacteroides tectus</i>		<i>Prevotella dentalis</i>	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>		<i>Prevotella denticola</i>	
<i>Bacteroides uniformis</i>		<i>Prevotella disiens</i>	
<i>Bacteroides vulgatus</i>		<i>Prevotella enteca</i>	
<i>Bilophila wadsworthia</i>		<i>Prevotella heparinolytica</i>	
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Bacteroides gracilis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	
<i>Campylobacter ureolyticus</i>	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	<i>Prevotella loescheii</i>	
<i>Centipeda periodontii</i>		<i>Prevotella marshii</i>	Nueva especie
<i>Dialister</i> spp. <sup>(1)</sup>		<i>Prevotella melaninogenica</i>	
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	<i>Fusobacterium prausnitzii</i>	<i>Prevotella multiformis</i>	<i>Prevotella denticola-like</i>
<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>		<i>Prevotella multisaccharivorax</i>	Nueva especie
<i>Fusobacterium mortiferum</i>		<i>Prevotella nigrescens</i>	
<i>Fusobacterium naviforme</i>		<i>Prevotella oralis</i>	
<i>Fusobacterium necrophorum</i>		<i>Prevotella oris</i>	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>		<i>Prevotella oulorum</i>	
<i>Fusobacterium periodonticum</i>		<i>Prevotella pallens</i>	
<i>Fusobacterium ulcerans</i>		<i>Prevotella salivae</i>	<i>Prevotella oris-like</i>
<i>Fusobacterium varium</i>		<i>Prevotella shahii</i>	<i>Prevotella loeschii-like</i>
<i>Fusobacterium russii</i>		<i>Prevotella tanneriae</i>	
<i>Leptotrichia buccalis</i>		<i>Prevotella timonensis</i>	Nueva especie
<i>Mitsuokella multiacida</i>		<i>Prevotella veroralis</i>	
<i>Odoribacter splanchnicus</i>	<i>Bacteroides splanchnicus</i>	<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i>	<i>Bacteroides capillosus</i>
<i>Parabacteroides distasonis</i>	<i>Bacteroides distasonis</i>	<i>Snathia sanguinegens</i>	<i>Leptotrichia sanguinegens</i>
<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	<i>Bacteroides distasonis-like</i>	<i>Sutterella wadsworthensis</i>	
<i>Parabacteroides merdae</i>	<i>Bacteroides merdae</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Bacteroides forsythus</i>
		<i>Tissierella praeacuta</i>	
<b>Bacilos gram positivos no esporulados</b>			
<i>Actinobaculum</i> spp. <sup>(2)</sup>		<i>Anaerofustis stercorihominis</i>	Nueva especie
<i>Actinomyces cardiffensis</i>	Nueva especie	<i>Anaerostipes caccae</i>	Nueva especie
<i>Actinomyces dentales</i>	Nueva especie	<i>Anaerotruncus colihominis</i>	
<i>Actinomyces europaeus</i>		<i>Atopobium</i> spp. <sup>(3)</sup>	
<i>Actinomyces funkei</i>		<i>Bifidobacterium</i> spp. <sup>(4)</sup>	
<i>Actinomyces georgiae</i>		<i>Collinsella</i> spp. <sup>(5)</sup>	
<i>Actinomyces gerencseriae</i>		<i>Dorea</i> spp. <sup>(6)</sup>	
<i>Actinomyces graevenitzi</i>		<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Eubacterium lentum</i>
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	Nueva especie	<i>Eggerthella</i> spp.	
<i>Actinomyces israeli</i>		<i>Eubacterium</i> spp.	
<i>Actinomyces johnsonii</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i> geno-especie WVA 963	<i>Fusobacterium prausnitzii</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
<i>Actinomyces meyeri</i>		<i>Filifactor alocis</i>	
<i>Actinomyces naeslundii</i>		<i>Lactobacillus</i> spp. <sup>(7)</sup>	
<i>Actinomyces nasicola</i>	Nueva especie	<i>Mobiluncus curtisii</i>	
<i>Actinomyces neuii</i>		<i>Mobiluncus mulieris</i>	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>		<i>Mogibacterium</i> spp. <sup>(8)</sup>	

Tabla 1. Continuación

Nomenclatura actual	Nuevas especies y modificaciones desde el año 2000	Nomenclatura actual	Nuevas especies y modificaciones desde el año 2000
<i>Actinomyces oricola</i>	Nueva especie	<i>Olsenella</i> spp. <sup>(9)</sup>	
<i>Actinomyces radidentis</i>		<i>Propionibacterium</i> spp. <sup>(10)</sup>	
<i>Actinomyces radingae</i>		<i>Scardovia inopinata</i>	<i>Bifidobacterium inopinatum</i>
<i>Actinomyces turicensis</i>		<i>Slackia</i> spp. <sup>(11)</sup>	
<i>Actinomyces urogenitalis</i>		<i>Turicibacter sanguinis</i>	Nueva especie
<i>Actinomyces viscosus</i>		<i>Varibaculum cambriensis</i>	Nueva especie
Bacilos gram positivos esporulados			
<i>Clostridium argentinense</i>		<i>Clostridium paraputrificum</i>	
<i>Clostridium baratii</i>		<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Clostridium bartlettii</i>	Nueva especie	<i>Clostridium putrificum</i>	
<i>Clostridium bifermentans</i>		<i>Clostridium ramosum</i>	
<i>Clostridium botulinum</i>		<i>Clostridium septicum</i>	
<i>Clostridium butyricum</i>		<i>Clostridium sordelli</i>	
<i>Clostridium cadaveris</i>		<i>Clostridium sphenoides</i>	
<i>Clostridium carnis</i>		<i>Clostridium sporogenes</i>	
<i>Clostridium clostridioforme</i>		<i>Clostridium subterminale</i>	
<i>Clostridium difficile</i>		<i>Clostridium symbiosum</i>	
<i>Clostridium glycolicum</i>		<i>Clostridium tertium</i>	
<i>Clostridium hastiforme</i>	<i>Tissierella preacuta</i>	<i>Clostridium tetani</i>	
<i>Clostridium histolyticum</i>		<i>Clostridium aldenense</i>	Nueva especie
<i>Clostridium indolis</i>		<i>Clostridium asparagiforme</i>	Nueva especie
<i>Clostridium innocuum</i>		<i>Clostridium chauvoei</i>	
<i>Clostridium limosum</i>		<i>Clostridium citroniae</i>	Nueva especie
<i>Clostridium neonatali</i>	Nueva especie	<i>Clostridium hiranonis</i>	Nueva especie
<i>Clostridium novyi A</i>		<i>Clostridium hylemonae</i>	Nueva especie
<i>Clostridium orbiscindens</i>		<i>Filifactor villosus</i>	
Cocos gram negativos			
<i>Acidaminococcus</i> spp. <sup>(12)</sup>			
<i>Megasphaera micronuciformis</i>	Nueva especie		
<i>Megasphaera elsdenii</i>			
<i>Veillonella aypica</i>			
<i>Veillonella denticariosi</i>	Nueva especie		
<i>Veillonella dispar</i>			
<i>Veillonella montpellierensis</i>	Nueva especie		
<i>Veillonella parvula</i>			
<i>Veillonella rogosae</i>	Nueva especie		
Cocos gram positivos			
<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	<i>Peptostreptococcus hydrogenalis</i>	<i>Peptococcus niger</i>	
<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus lactolyticus</i>	<i>Peptoniphilus asacharolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus asacharolyticus</i>
<i>Anaerococcus murdochii</i>	Nueva especie	<i>Peptoniphilus harei</i>	<i>Peptostreptococcus harei</i>
<i>Anaerococcus octavius</i>	<i>Peptostreptococcus octavius</i>	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	<i>Peptostreptococcus indolicus</i>
<i>Anaerococcus prevotii</i>	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	<i>Peptoniphilus ivorii</i>	<i>Peptostreptococcus ivorii</i>
<i>Anaerococcus tetradius</i>	<i>Peptostreptococcus tetradius</i>	<i>Peptoniphilus lacrimales</i>	<i>Peptostreptococcus lacrimalis</i>
<i>Anaerococcus vaginalis</i>	<i>Peptostreptococcus vaginalis</i>	<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	Nueva especie
<i>Atopobium</i> spp. <sup>(13)</sup>	<i>Peptostreptococcus</i> spp. <sup>(14)</sup>		
<i>Finegoldia magna</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i>	<i>Ruminococcus productus</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>
<i>Gallicola barnesae</i>	<i>Peptostreptococcus barnesae</i>	<i>Staphylococcus sacharolyticus</i>	<i>Peptococcus</i>
<i>sacharolyticus</i>			

<sup>(1)</sup>3 especies, <sup>(2)</sup>3 especies, <sup>(3)</sup>4 especies, <sup>(4)</sup>9 especies, <sup>(5)</sup>4 especies, <sup>(6)</sup>2 especies, <sup>(7)</sup>22 especies, <sup>(8)</sup>5 especies,<sup>(9)</sup>2 especies, <sup>(10)</sup>2 especies, <sup>(11)</sup>3 especies, <sup>(12)</sup>2 especies, <sup>(13)</sup>3 especies, <sup>(14)</sup>2 especies.

**Tabla 2.** Categorización de los antibióticos según su actividad *in vitro* frente a las bacterias anaerobias

Microorganismos	Muy buena actividad (> 90% S)	Mediana actividad ( 70 - 90% S)	Regular a mala actividad (< 70% S)
<i>Bacteroides fragilis</i>	Ampicilina-sulbactama Amoxicilina-clavulánico Piperacilina-tazobactama Imipenem Meropenem Ertapenem Metronidazol Cloranfenicol Tigeciclina	Cefoxitina Piperacilina Clindamicina Moxifloxacina	Ampicilina Cefalosporinas de 1. <sup>a</sup> , 2. <sup>a</sup> , (excepto cefoxitina), 3. <sup>a</sup> y 4. <sup>a</sup> generación  Azitromicina Telitromicina
Grupo <i>Bacteroides fragilis</i> (no <i>B. fragilis</i> )	Piperacilina-tazobactama Imipenem Meropenem Ertapenem Metronidazol Cloranfenicol Tigeciclina	Ampicilina-sulbactama Amoxicilina-clavulánico Piperacilina Moxifloxacina	Ampicilina Cefalosporinas de 1. <sup>a</sup> , 2. <sup>a</sup> , 3. <sup>a</sup> y 4. <sup>a</sup> generación Clindamicina Azitromicina Telitromicina
<i>Prevotella</i> spp. y <i>Porphyromonas</i> spp.	Ampicilina-sulbactama Amoxicilina-clavulánico Piperacilina-tazobactama Cefoxitina Ceftriaxona Imipenem Meropenem Ertapenem Metronidazol Cloranfenicol Tigeciclina	Clindamicina Azitromicina Telitromicina Moxifloxacina	Ampicilina <sup>(1)</sup>
<i>Fusobacterium</i> spp.	Ampicilina Ampicilina-sulbactama Amoxicilina-clavulánico Piperacilina-tazobactama Cefoxitina Ceftriaxona Imipenem Meropenem Ertapenem Clindamicina Metronidazol Cloranfenicol Tigeciclina Moxifloxacina		Azitromicina Telitromicina
<i>Veillonella</i> spp.	Ampicilina Ampicilina-sulbactama Amoxicilina-clavulánico Piperacilina-tazobactama Cefoxitina Ceftriaxona Imipenem Meropenem Ertapenem Metronidazol Cloranfenicol	Penicilina Piperacilina	

Tabla 2. Continuación

Microorganismos	Muy buena actividad (> 90% S)	Mediana actividad (70 - 90% S)	Regular a mala actividad (< 70% S)
	Moxifloxacina Tigeciclina Azitromicina Telitromicina		
<i>Clostridium</i> spp. (no <i>C. difficile</i> )	Ampicilina-sulbactama Amoxicilina-clavulánico Piperacilina-tazobactama Imipenem Meropenem Ertapenem Metronidazol Cloranfenicol Tigeciclina Vancomicina	Penicilina <sup>(2)</sup> Ampicilina Cefoxitina Ceftriaxona Clindamicina Moxifloxacina	Azitromicina Telitromicina
<i>Clostridium difficile</i>	Piperacilina-tazobactama Metronidazol Cloranfenicol Tigeciclina Vancomicina	Imipenem Meropenem Ertapenem	Ampicilina Ampicilina-sulbactama Amoxicilina-clavulánico Cefoxitina Ceftriaxona Clindamicina Azitromicina Telitromicina Moxifloxacina
Bacilos gram positivos no esporulados	Penicilina Ampicilina-sulbactama Amoxicilina-clavulánico Piperacilina-tazobactama Imipenem Meropenem Ertapenem Clindamicina Cloranfenicol Vancomicina <sup>(3)</sup>	Cefoxitina Ceftriaxona Azitromicina Telitromicina Moxifloxacina	Metronidazol
Cocos gram positivos	Penicilina Ampicilina <sup>(4)</sup> Ampicilina-sulbactama <sup>(4)</sup> Amoxicilina-clavulánico Piperacilina-tazobactama Cefoxitina Ceftriaxona Imipenem Meropenem Ertapenem Clindamicina Metronidazol Cloranfenicol Vancomicina	Telitromicina Moxifloxacina	Azitromicina

S: sensibilidad; <sup>(1)</sup>*Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* en nuestro medio aún son sensibles a la ampicilina, ya que no se ha comunicado el aislamiento de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasa; <sup>(2)</sup>*Clostridium perfringens* permanece sensible a la penicilina; <sup>(3)</sup>excepto *Lactobacillus* spp., que usualmente son resistentes a la vancomicina. <sup>(4)</sup>excepto *Peptostreptococcus anaerobius*, sobre el cual la ampicilina presenta mediana actividad.

Los azálidos y los cetólidos muestran actividad variable y son más activos frente a los géneros *Prevotella* y *Porphyromonas* (19, 36).

## 2.2. Resistencias naturales.

### Consideraciones generales

Todas las bacterias anaerobias son naturalmente resistentes a los monobactames, a los aminoglucósidos, a las sulfonamidas y a la trimetoprima (55).

Las especies de *Lactobacillus*, en su mayoría, son resistentes a la vancomicina, y los bacilos gram positivos no esporulados son resistentes al metronidazol (9, 14, 26, 28, 42, 48).

## 2.3. Resistencias adquiridas.

### Consideraciones generales

Los mecanismos de resistencia adquirida se muestran en la Tabla 3.

## 2.4. Patrones de resistencia en nuestro medio

El principal mecanismo de resistencia observado en los bacilos gram negativos anaerobios es la producción de  $\beta$ -lactamasas, cuyos genes codificantes pueden estar presentes en plásmidos o en otros elementos móviles, lo cual permite su transferencia horizontal y muy eficiente a otras células bacterianas. Como estas  $\beta$ -lactamasas son muy frecuentes en el grupo *Bacteroides fragilis*, se puede considerar que todos los miembros de este grupo son resistentes a la penicilina y más del 95% son resistentes a la ampicilina. Los otros bacilos gram negativos no pertenecientes a este grupo también pueden producir  $\beta$ -lactamasas, por lo tanto, la resistencia a la penicilina y a la ampicilina resultan no predictibles, especialmente en el género *Prevotella* (18, 20, 22, 33, 35).

### Grupo *Bacteroides fragilis*

Las especies del grupo *Bacteroides fragilis* son las que más han variado en cuanto a sus patrones de resistencia. En la Tabla 4 se muestran los datos del último relevamiento de la sensibilidad de estos microorganismos frente a 10 antibióticos. El método utilizado fue la dilución en agar o método de Wadsworth, recomendado por el CLSI (12). En ese relevamiento participaron 17 centros de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y de otras ciudades del país y fue realizado por la SBA-SADEBAC-AAM como parte de su tarea de vigilancia de la resistencia en estas bacterias (21).

Los datos sobresalientes de ese estudio fueron la detección -por primera vez- de aislamientos resistentes y con sensibilidad disminuida a los carbapenemes (imipenem, ertapenem y doripenem) y con resistencia a la piperacilina-tazobactama (21, 22). A pesar de ello, dichos antibióticos continúan siendo los  $\beta$ -lactámicos más activos frente a estos microorganismos. La ampicilina-sulbactama mostró actividad variable de acuerdo a la especie analizada, aun- que si se comparan los resultados del citado estudio con

los del relevamiento realizado en el año 2002 se observa que su actividad se mantuvo a través del tiempo (92% y 86% de sensibilidad, respectivamente) (18).

Dentro de los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos, el metronidazol y la tigeciclina son los que mostraron la mejor actividad. Es importante destacar que el metronidazol, un antibiótico tradicionalmente utilizado para el tratamiento de infecciones por anaerobios, continúa mostrando una excelente actividad frente a estas bacterias.

La moxifloxacina, utilizada para el tratamiento de las infecciones abdominales, presentó una actividad variable según la especie. Es un antibiótico que debe ser monitoreado, debido a que si bien en nuestro medio la sensibilidad global fue del 91%, se observó un corrimiento de las CIM hacia los valores de resistencia.

Los niveles de resistencia a la clindamicina fueron inaceptablemente altos como para utilizar dicho antibiótico en forma empírica frente a este grupo bacteriano. Con respecto al relevamiento anterior, se observó un aumento del porcentaje de resistencia durante el último período (25% de resistencia en *B. fragilis* y 48% en las otras especies del grupo *Bacteroides fragilis*) (18).

### *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. y *Fusobacterium* spp.

Las especies de los géneros *Prevotella*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium* fueron muy sensibles a la mayoría de los antibióticos probados, excepto a la ampicilina, especialmente *Prevotella* spp., y a los macrólidos en el caso de *Fusobacterium* spp. (35) Tabla 5.

### *Clostridium* spp., *Clostridium difficile* y cocos gram positivos

Los clostridios estudiados, con la excepción de *C. difficile*, mostraron buena sensibilidad a los antibióticos ensayados. La ampicilina y la clindamicina fueron los antibióticos que presentaron menor actividad. Los 7 aislamientos de *C. perfringens* que se evaluaron no mostraron resistencia a los  $\beta$ -lactámicos (35). Tabla 5.

*C. difficile* mostró un perfil característico de mayor resistencia a los antibióticos. Sin embargo, el metronidazol y la vancomicina demostraron una buena actividad *in vitro*. En un relevamiento realizado en el 2006 (Tabla 6), sobre 52 aislamientos no se detectó resistencia al metronidazol ni a la vancomicina, antibióticos de elección en el tratamiento de las infecciones causadas por *C. difficile* (23).

Los cocos gram positivos presentaron bajos niveles de resistencia a la ampicilina y a la clindamicina. Este último antibiótico conservó más del 95% de actividad frente a estas bacterias (35). Tabla 5.

## 3. CUÁNDO Y POR QUÉ REALIZAR LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

La realización de las pruebas de sensibilidad en la bacteriología anaerobia no es un evento rutinario, sino

Tabla 3. Mecanismos de resistencia adquirida

Antibiótico	Mecanismo de resistencia	Gen	Especie anaerobia	Características
<b>β-lactámicos</b>				
	Enzimas inactivantes <sup>(1)</sup>			
	Cefalosporinasa clase 2e		Grupo <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides</i> spp <i>Prevotella</i> spp	En cromosoma No transferible Confiere resistencia a ampicilina y penicilina
	Cefoxitina	<i>cepA</i> <i>cfxA</i>	<i>Bilophila wadsworthia</i> Grupo <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Prevotella</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp.	Inh. por inhibidores de β-lactamasas Transferible por plásmidos o Transposones Confiere resistencia a cefoxitina y cefotaxima
	Penicilinas		<i>Fusobacterium</i> spp. <i>Clostridium</i> spp. (no <i>C. perfringens</i> )	Inh. por inhibidores de β-lactamasas
	Carabapenemasa clase B grupo 3	<i>ccrA cfiA</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	Metaloenzima En cromosoma Transferible No inh. por inhibidores de β-lactamasas. Confiere resistencia a todos los β lactámicos y carbapenemes
	Baja afinidad de PLP <sup>(2)</sup>			
	Alteraciones en PLP1 o PLP2		<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Veillonella</i> spp. Cocos gram positivos	Confiere resistencia a las cefalosporinas
	Alteraciones en la permeabilidad			
	Alteraciones en ≥ 1 porina		<i>Bacteroides</i> spp. <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Fusobacterium</i> spp.	Confiere resistencia a ampicilina-sulbactama
<b>Clindamicina</b>				
	Alteraciones en el sitio blanco <sup>(3)</sup>			
	Metilasa de la subunidad 23S del ARN	<i>erm F, G, S, Q, P, Z, B</i>	Grupo <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Prevotella</i> spp. <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium difficile</i> Cocos gram positivos	En cromosoma, plásmidos y Transposones Transferible Confiere resistencia de alto nivel
<b>Quinolonas</b>				
	Alteraciones en el sitio blanco <sup>(4)</sup>			
	Mutaciones en la ADN girasa	<i>gyr A</i> <i>gyr A, B</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium difficile</i>	Transferible Confiere resistencia de alto nivel
	Bombas de eflujo ≥1 bomba de eflujo		<i>Bacteroides</i> spp. <i>Bacteroides fragilis</i>	Confiere resistencia a todas las quinolonas
<b>Metronidazol</b>				
	Enzimas inactivantes <sup>(5)</sup>			
	Nitroimidazol reductasa	<i>nim A-G</i>	Grupo <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides</i> spp. <i>Finogdía magna</i>	En cromosoma y plásmidos Transferible Inducible por exposición prolongada a metronidazol en mutantes de laboratorio
<b>Tetraciclinas</b>				
	Alteraciones en el sitio blanco y Bombas de eflujo <sup>(6)</sup>			
	Proteínas protectoras ribosomales	<i>tet A, B, M, O, Q, S, W,</i>	Grupo <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Porphyromonas</i> spp. <i>Prevotella</i> spp.	En transposones conjugativos Transferible
	Proteínas de eflujo energía dependiente	otros	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Veillonella</i> spp. <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Bifidobacterium</i> spp.	
<b>Tigeciclina</b>				
	Desconocido <sup>(7)</sup>			
	Desconocido		<i>Bacteroides</i> spp.	Rara
<b>Cloranfenicol</b>				
	Enzimas inactivantes			
	Cloranfenicol acetil transferasa		<i>cat P, Q, D</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium difficile</i>	Constitutiva En cromosomas y transposones

<sup>(1)</sup>Appelbaum *et al.* (2)Giraud-Morin *et al.* (25), Mättö *et al.* (38), Podglajen *et al.* (43); <sup>(2)</sup>Theron *et al.* (51), Wexler *et al.* (54); <sup>(3)</sup>Ackermann *et al.* (1), Cooper *et al.* (13); <sup>(4)</sup>Bachoual *et al.* (3), Dridi *et al.* (15); <sup>(5)</sup>Theron *et al.* (50), Trinh *et al.* (52); <sup>(6)</sup>Scott *et al.* (47), Villedieu *et al.* (53); <sup>(7)</sup>Hecht DW (30).

**Tabla 4.** Actividad *in vitro* de 10 antibióticos frente a 363 aislamientos del grupo *Bacteroides fragilis*

Microorganismos/ Antibióticos	Sensible	Categoría (%) Intermedio	Resistente
<i>Bacteroides fragilis</i> (N = 198)			
Ampicilina-sulbactama	97	1,5	1,5
Piperacilina-tazobactama	99	0	1
Cefoxitina	82,8	11,1	6,1
Ertapenem (n = 126)	96	1,6	2,4
Imipenem	98,5	0	1,5
Doripenem (n = 159)	97,5	0,6	1,9
Clindamicina	74,7	2,5	22,7
Metronidazol	100	0	0
Moxifloxacina	89,9	2,0	8,1
Tigeciclina	99,5	0,5	0
<i>Bacteroides thetaiotaomicron / ovatus</i> (N = 69)			
Ampicilina-sulbactama	87	8,7	4,3
Piperacilina-tazobactama	98,6	1,4	0
Cefoxitina	49,3	27,5	23,2
Ertapenem (n = 49)	89,8	4,1	4,1
Imipenem	98,6	0	1,4
Doripenem (n = 58)	96,6	0	3,4
Clindamicina	42	18,8	39,1
Metronidazol	100	0	0
Moxifloxacina	89,9	2,9	7,2
Tigeciclina	100	0	0
<i>Bacteroides caccae</i> (N = 30)			
Ampicilina-sulbactama	90	10	0
Piperacilina-tazobactama	100	0	0
Cefoxitina	63,3	16,7	20
Ertapenem (n = 19)	94,7	5,3	0
Imipenem	100	0	0
Doripenem (n = 25)	96	4	0
Clindamicina	63,3	10	26,7
Metronidazol	100	0	0
Moxifloxacina	86,7	6,7	6,7
Tigeciclina	96,7	3,3	0
<i>Bacteroides vulgatus</i> (N=27)			
Ampicilina-sulbactama	74,1	18,5	7,4
Piperacilina-tazobactama	96,3	0	3,7
Cefoxitina	81,5	7,4	11,1
Ertapenem (n = 24)	100	0	0
Imipenem	100	0	0
Doripenem	100	0	0
Clindamicina	66,7	3,7	29,6
Metronidazol	100	0	0
Moxifloxacina	81,5	3,7	14,8
Tigeciclina	100	0	0
Otras especies del grupo <i>Bacteroides fragilis</i> (N = 39) <sup>(1)</sup>			
Ampicilina-sulbactama	87,2	10,3	2,6
Piperacilina-tazobactama	97,4	2,6	0
Cefoxitina	61,5	20,5	17,9
Ertapenem (n = 34)	97,1	0	2,9
Imipenem	100	0	0
Doripenem (n = 37)	100	0	0
Clindamicina	51,3	7,7	41
Metronidazol	100	0	0
Moxifloxacina	79,5	5,1	15,4
Tigeciclina	94,9	5,1	0

N: número total de aislamientos evaluados; n: número de aislamientos evaluados frente a dicho antibiótico. <sup>(1)</sup>*Parabacteroides (Bacteroides) distasonis*, 7; *Bacteroides uniformis*, 7; *Bacteroides stercoris*, 7; *Bacteroides merdae*, 2; *Bacteroides* spp., 16. Para la tigeciclina se utilizaron los puntos de corte propuestos por la Food and Drug Administration (µg/ml), sensible ≤ 2, intermedio = 4, resistente ≥ 8.

Tabla 5. Actividad in vitro de 10 antibióticos frente a bacterias anaerobias diferentes de las incluidas en el grupo *B. fragilis*

Microorganismos / Antibióticos	Rango	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) CIM50	CIM90	Sensible	Categoría (%) <sup>(6)</sup> Intermedio	Resistente
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (N=14)						
Ampicilina	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	100	0	0
Ampicilina-sulbactama	$\leq 0,25-0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	100	0	0
Cefoxitina	$\leq 0,125-0,5$	$\leq 0,125$	0,5	100	0	0
Ceftriaxona	$\leq 4$	$\leq 4$	$\leq 4$	100	0	0
Imipenem	$\leq 0,015-0,25$	0,03	0,125	100	0	0
Piperacilina	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	100	0	0
Piperacilina-tazobactama	$\leq 0,06-0,5$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	100	0	0
Clindamicina	$\leq 0,03-0,125$	$\leq 0,03$	0,125	100	0	0
Metronidazol	$\leq 0,125-4$	$\leq 0,125$	0,5	100	0	0
Azitromicina	$\leq 0,06-8$	0,125	2	57	7	36
Otros <i>Fusobacterium</i> spp. (N=12) <sup>(1)</sup>						
Ampicilina	$\leq 0,25-1$	$\leq 0,25$	1	75	25	0
Ampicilina-sulbactama	$\leq 0,25-2$	$\leq 0,25$	2	100	0	0
Cefoxitina	$\leq 0,125->128$	$\leq 0,125$	4	91,6	0	8,3
Ceftriaxona	$\leq 4-16$	$\leq 4$	4	100	0	0
Imipenem	$\leq 0,015-1$	0,03	1	100	0	0
Piperacilina	$\leq 1-16$	$\leq 1$	4	100	0	0
Piperacilina-tazobactama	$\leq 0,06-8$	$\leq 0,06$	4	100	0	0
Clindamicina	$\leq 0,03->16$	$\leq 0,03$	2	91,6	0	8,3
Metronidazol	$\leq 0,125-2$	0,25	1	100	0	0
Azitromicina	0,25->16	1	16	38,5	15,4	46
<i>Prevotella</i> spp. (N=21) <sup>(2)</sup>						
Ampicilina	$\leq 0,25->64$	0,5	16	47,6	9,5	42,8
Ampicilina-sulbactama	$\leq 0,25-4$	0,5	2	100	0	0
Cefoxitina	$\leq 0,125-16$	0,5	4	100	0	0
Ceftriaxona	$\leq 4-16$	$\leq 4$	8	100	0	0
Imipenem	$\leq 0,015-0,25$	0,125	0,125	100	0	0
Piperacilina	$\leq 1-32$	2	16	100	0	0
Piperacilina-tazobactama	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	100	0	0
Clindamicina	$\leq 0,03->8$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	95,2	0	4,7
Metronidazol	$\leq 0,125-2$	1	1	100	0	0
Azitromicina	$\leq 0,06-16$	$\leq 0,06$	2	82	0	18
<i>Porphyromonas</i> spp. (N=10) <sup>(3)</sup>						
Ampicilina	$\leq 0,25-0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	100	0	0
Ampicilina-sulbactama	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	$\leq 0,25$	100	0	0
Cefoxitina	$\leq 0,125-2$	$\leq 0,125$	0,5	100	0	0
Ceftriaxona	$\leq 4$	$\leq 4$	$\leq 4$	100	0	0
Imipenem	0,03-0,25	0,125	0,25	100	0	0
Piperacilina	$\leq 1$	$\leq 1$	$\leq 1$	100	0	0
Piperacilina-tazobactama	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	100	0	0
Clindamicina	$\leq 0,03-8$	$\leq 0,03$	$\leq 0,03$	90	0	10
Metronidazol	$\leq 0,125-0,5$	0,25	0,25	100	0	0
Azitromicina	$\leq 0,06-0,125$	$\leq 0,06$	0,125	100	0	0
<i>Clostridium difficile</i> (N=10)						
Ampicilina	2-4	2	4	0	0	100
Cefoxitina	4->16	>16	>16	10	0	90
Ceftriaxona	16-128	64	128	10	10	80
Imipenem	0,25-16	4	8	50	40	10
Piperacilina	$\leq 1-8$	4	8	100	0	0
Piperacilina-tazobactama	1-8	4	8	100	0	0
Clindamicina	0,5-16	16	16	30	10	60
Metronidazol	0,25-2	0,5	1	100	0	0
Otros <i>Clostridium</i> spp. (N=12) <sup>(4)</sup>						
Ampicilina	$\leq 0,25-2$	0,5	1	75	16,6	8,3
Ampicilina-sulbactama	$\leq 0,125-0,5$	$\leq 0,125$	0,25	100	0	0
Cefoxitina	$\leq 0,25-2$	0,5	1	100	0	0
Ceftriaxona	$\leq 0,125-64$	0,5	4	91,6	0	8,3
Imipenem	0,03-0,25	0,06	0,25	100	0	0
Piperacilina	$\leq 1-16$	$\leq 1$	$\leq 1$	100	0	0
Piperacilina-tazobactama	$\leq 0,06-4$	$\leq 0,06$	0,5	100	0	0
Clindamicina	$\leq 0,125->32$	0,5	8	75	8,3	16,6
Metronidazol	0,125-4	1	2	100	0	0
Cocos gram positivos (N=22) <sup>(5)</sup>						
Ampicilina	$\leq 0,25-8$	$\leq 0,125$	1	86,3	4,5	9
Ampicilina-sulbactama	$\leq 0,125-32$	$\leq 0,125$	4	95,4	0	4,5
Cefoxitina	$\leq 0,125-16$	$\leq 0,125$	4	100	0	0
Ceftriaxona	$\leq 0,125-8$	$\leq 0,125$	2	100	0	0
Imipenem	$\leq 0,004-0,5$	0,015	0,5	100	0	0
Piperacilina	$\leq 0,5-16$	$\leq 0,5$	2	100	0	0
Piperacilina-tazobactama	$\leq 0,06-16$	$\leq 0,06$	2	100	0	0
Clindamicina	$\leq 0,03->32$	0,5	2	95,4	0	4,5
Metronidazol	$\leq 0,125-2$	0,5	1	100	0	0
Azitromicina	$\leq 0,125->32$	1	>32	41	9	50

N: número total de aislamientos evaluados

<sup>(1)</sup>*F. necrophorum* (n=6), *F. mortiferum* (n=4), *F. varium* (n=2), <sup>(2)</sup>*P. intermedia/nigrescens* (n=11), *Prevotella* spp. (n=4), *P. denticola* (n=2), *P. melaninogenica* (n=2), *P. oralis* (n=1), *P. oris* (n=1), <sup>(3)</sup>*P. asaccharolytica* (n=8), *P. gingivalis* (n=1), *Porphyromonas* sp. (n=1), <sup>(4)</sup>*C. perfringens* (n=7), *C. sordellii* (n=2), *C. cadaveris* (n=1), *C. paraputrificum* (n=1), *C. tertium* (n=1), <sup>(5)</sup>*Peptostreptococcus* spp. (n=14), *P. anaerobius* (n=8), <sup>(6)</sup>Para la azitromicina se utilizaron los puntos de corte de *Streptococcus pneumoniae* (CLSI 2006, en  $\mu\text{g/ml}$ ): sensible  $\leq 0,5$ , intermedio = 1, resistente  $\geq 2$ .

**Tabla 6.** Actividad *in vitro* de 12 antimicrobianos frente a 52 aislamientos de *Clostridium difficile*

Antibióticos	Rango (µg/ml)	MIC50	CIM (µg/ml)		Categoría (%) <sup>(1)</sup>		
			MIC90	Modo	Resistente	Intermedio	Sensible
<b>β-lactámicos</b>							
Ampicilina	≤ 0,06 - 4	0,5	2	0,5	13	23	64
Piperacilina	4 - >64	32	>64	32	15	13	72
Piperacilina-tazobactama	0,5 - >64	16	64	32	10	15	75
Ceftriaxona	1 - >128	16	64	16	21	17	62
Imipenem	≤ 0,06 - 16	4	8	4	2	12	86
<b>No β-lactámicos</b>							
Vancomicina	0,125 - 2	0,5	1	0,5	0	0	100
Teicoplanina	≤ 0,03 - 2	0,125	0,125	0,125	0	0	100
Metronidazol	≤ 0,125 - 2	0,5	1	1	0	0	100
Clindamicina	0,25 - >64	64	>64	>64	58	11	31
Moxifloxacin	0,25 - 16	4	16	16	52	13	35
Azitromicina	0,25 - >64	32	>64	>64	56	10	35
Tigeciclina	≤ 0,016- 0,03	≤ 0,016	0,03	≤ 0,016	0	0	100

<sup>(1)</sup> Se utilizaron los puntos de corte de *Staphylococcus* spp. (CLSI 2006, en µg/ml) para la vancomicina (sensible ≤ 2, intermedio 4 - 8, resistente ≥ 16) y para la teicoplanina (sensible ≤ 8, intermedio = 16, resistente ≥ 32); para la tigeciclina se emplearon los puntos de corte propuestos por la Food and Drug Administration (sensible ≤ 2, intermedio = 4, resistente ≥ 8).

que responde a objetivos epidemiológicos y clínicos específicos (4-6, 11, 21, 29, 30, 39, 49).

### 3.1. Fines epidemiológicos

**3.1.1.** Realizar la vigilancia en forma periódica, institucional y multicéntrica, con alcance local y regional, a fin de conocer los patrones de sensibilidad y detectar las resistencias emergentes con el objeto de orientar y eventualmente modificar los esquemas terapéuticos empíricos.

**3.1.2.** Evaluar nuevos agentes antimicrobianos.

### 3.2. Fines clínicos

**3.2.1.** La mayoría de las infecciones por anaerobios son polimicrobianas y el éxito del tratamiento involucra la combinación de intervenciones quirúrgicas (drenaje y desbridamiento) con el uso de terapia empírica de amplio espectro. Se justifica la realización de la prueba de sensibilidad ante el aislamiento de bacterias anaerobias en forma monomicrobiana o polimicrobiana de infecciones con focos endovasculares y/o que requieren tratamiento médico prolongado, y en las que la asistencia quirúrgica no siempre es posible. Tal es el caso de los abscesos hepáticos pequeños y múltiples, los abscesos en el SNC, en el pulmón u otros, las endocarditis, las osteomielitis y las bacteriemias refractarias al tratamiento.

**3.2.2.** Ante el aislamiento de bacterias anaerobias con probada resistencia a los antibióticos de elección y/o reconocida patogenicidad.

**3.2.3.** Ante el aislamiento de microorganismos infrecuentes, con perfiles de sensibilidad desconocidos o impredecibles.

## 4. CÓMO REALIZAR LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

### 4.1. Consideraciones generales

El método de referencia recomendado por el CLSI documento M11-A7 2007 (12) es la dilución en agar o método de Wadsworth. Otros métodos aprobados por este organismo son la microdilución en caldo y la detección de β-lactamasa. La prueba por medio de tiras con gradiente de concentración de antibióticos está sugerida como una alternativa más simple y rápida para el uso de rutina en el laboratorio clínico. La elución con discos es el método recomendado por la SBA como tamizaje para los organismos de crecimiento rápido (6). El D-test es de utilidad en cocos gram positivos para la detección del fenotipo de resistencia iMLS (44).

El medio de cultivo utilizado debe asegurar el adecuado desarrollo del microorganismo en estudio. Las CIM de los microorganismos utilizados como control de calidad deben estar dentro del rango de aceptación para cada antimicrobiano.

Con el fin de lograr la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados, la SBA recomienda seguir cuidadosamente las normas descritas en este documento.

### 4.2. Preparación del inóculo

**4.2.1.** Suspensión directa de colonias: se prepara una suspensión equivalente al patrón 0,5 de

la escala de Mc Farland y al patrón 1 para el método epsilométrico a partir de colonias en agar Brucella suplementado, o en cualquier otro agar que permita el crecimiento del microorganismo a las 24 a 48 horas de incubación. Las placas no deben exponerse más de 30 minutos a la atmósfera aeróbica para evitar células no viables en la suspensión.

**4.2.2. Método de crecimiento en medio líquido:** con microorganismos de crecimiento rápido como los del grupo *Bacteroides fragilis* o *Clostridium* spp., el inóculo se puede preparar a partir de un caldo Brucella incubado durante 6 a 24 horas en atmósfera anaeróbica o con una suspensión del microorganismo a partir de placas de 48 horas de incubación. Luego se ajusta la turbidez a una densidad equivalente al patrón 0,5 de la escala de Mc Farland.

### 4.3. Atmósfera y tiempo de incubación

Para las pruebas de sensibilidad, las muestras se incuban en atmósfera anaerobia (< 1% de O<sub>2</sub> y 4-7% de CO<sub>2</sub>) durante 48 horas. La atmósfera anaerobia puede lograrse en la cámara anaerobia (10% H<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> - 85% N<sub>2</sub>) o en jarras utilizando generadores comerciales. Se debe incluir un indicador de óxido-reducción como control de calidad de la anaerobiosis, la cual es indispensable para el desarrollo de los microorganismos y fundamental para que actúe el metronidazol.

### 4.4. Métodos para evaluar la sensibilidad de las bacterias anaerobias a los antimicrobianos

- 4.4.1. Dilución en agar
- 4.4.2. Microdilución en caldo
- 4.4.3. Epsilométrico
- 4.4.4. Elución en caldo con discos
- 4.4.5. Detección de β-lactamasas
- 4.4.6. D-test: prueba de difusión con doble disco

#### 4.4.1. Dilución en agar

Es el método de referencia. Permite evaluar prácticamente a todas las especies de anaerobios, aunque se debe tener presente que aquellas que invaden el medio pueden generar interferencias en la lectura de los resultados.

Es un método laborioso que permite probar simultáneamente un gran número de aislamientos, dependiendo de la capacidad del multiinoculador empleado. Es el método utilizado para validar otros métodos y para probar nuevas drogas. Es útil para realizar los estudios de vigilancia.

Medio de cultivo: agar Brucella suplementado con 5 µg/ml de hemina, 1 µg/ml de vitamina K1 y 5% de sangre lacada de carnero.

Las placas con antibióticos deben prepararse preferentemente en el día de uso, si bien pueden conservarse a 2 - 8 °C hasta 72 horas.

Inóculo final: aproximadamente 1x10<sup>5</sup> UFC/spot. Se emplea una suspensión de turbidez equivalente al 0,5 de la escala de Mc Farland.

Incubación: en atmósfera anaerobia, a 35 °C durante 48 horas.

Todo el procesamiento puede realizarse en atmósfera ambiental, teniendo la precaución de no exponer a los microorganismos al oxígeno durante un período superior a 1 hora.

Lectura e interpretación de los resultados: la lectura del punto final es una de las etapas más delicadas. En algunos casos puede llevar a interpretaciones ambiguas. La CIM es la concentración más baja de cada antimicrobiano que inhibe el crecimiento del organismo o donde se observa una marcada reducción del desarrollo (pátina, < 10 colonias pequeñas o 1-3 colonias medianas) comparado con la placa de control de desarrollo (sin antibiótico) y la de control de gota.

Controles. Control de desarrollo: incluirlo al comienzo y al final de cada serie; son placas inoculadas, sin antibiótico e incubadas en atmósfera anaerobia.

Control aerobio: inocular placas de agar chocolate sin antibiótico al comienzo y al final de cada serie e incubarlas en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5-7%.

Microorganismos utilizados como control: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, *Clostridium difficile* ATCC 700057 y *Eubacterium lentum* ATCC 43055.

#### 4.4.2. Microdilución en caldo

Utiliza pequeños volúmenes (100 µl) de caldo distribuidos en bandejas plásticas con pocillos (policubetas tipo ELISA). Es un método comercial, menos complejo y laborioso que el de referencia, que permite probar varios antibióticos simultáneamente. En la actualidad, está validado sólo para estudiar especies del grupo *B. fragilis* frente a agentes seleccionados, como la ampicilina-sulbactama, la cefoxitina, la clindamicina, el ertapenem, el metronidazol y la piperacilina.

Medio de cultivo: caldo Brucella suplementado con 5 µg/ml de hemina, 1 µg/ml de vitamina K1 y 5% de sangre lacada de caballo. El volumen mínimo que se debe utilizar es 0,1 ml de caldo por pocillo. Las bandejas con las diluciones del antibiótico pueden ser almacenadas a -70 °C.

Inóculo final: aproximadamente 1x10<sup>6</sup> UFC/ml.

Incubación: en atmósfera anaerobia a 35 °C durante 48 horas, en jarras o bolsas aptas para este tipo de placas o en cámara de anaerobiosis. Para evitar la evaporación, las placas deben ser cubiertas con una tapa plástica, semiabierto, que permita el intercambio gaseoso.

Lectura: la CIM es la mínima concentración donde no se observa desarrollo o donde se observa una disminución significativa del desarrollo con respecto al pocillo sin antibiótico.

Controles. Control de desarrollo: incluir un pocillo sin antibiótico con el inóculo, en la misma placa de la CIM, para evaluar si desarrolla el microorganismo en las condiciones de la prueba.

Control de esterilidad del caldo: incluir un pocillo con el medio sin inocular para verificar su esterilidad.

Microorganismos utilizados como control: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741, *Clostridium difficile* ATCC 700057 y *Eubacterium lentum* ATCC 43055.

#### 4.4.3. Epsilométrico

Este método está actualmente muy difundido para microorganismos exigentes, inclusive los anaerobios, ya que es muy fácil de realizar y permite tener rápidamente la CIM de un único microorganismo (10, 26, 34).

Medio de cultivo: agar Brucella suplementado con 5 µg/ml de hemina, 1 µg/ml de vitamina K1 y 5% de sangre lacerada de carnero. Este medio permite un mejor crecimiento bacteriano y es el que mostró mayor reproducibilidad en los valores de las CIM.

Inóculo: hisopar una placa con una suspensión equivalente al patrón 1 de la escala de Mc Farland. Luego de aproximadamente 10-15 minutos, aplicar la tira plástica con el gradiente de concentración del antimicrobiano. Se pueden colocar hasta 2 tiras en las placas de 100 mm de diámetro.

Incubación: incubar las placas dentro de los 30 minutos de inoculación en atmósfera anaerobia, a 35 °C durante 48 horas.

Lectura: la CIM es el valor donde la elipse de la zona de inhibición intercepta la tira. Algunas combinaciones microorganismo-droga pueden presentar dificultades en la lectura de la CIM.

#### 4.4.4. Elución en caldo con discos

Es un método sencillo, accesible, económico y al alcance de todos los laboratorios clínicos, aunque poco conocido. Este método no está aprobado por el CLSI debido

a que se han observado discrepancias en lo que respecta al comportamiento de algunos microorganismos frente a ciertos antibióticos cuando se lo comparó con el método de microdilución (que no es el método de referencia). El método ha sido reevaluado por la SBA por ser una prueba accesible para nuestros laboratorios (6). La validación se realizó mediante: a) la estandarización de las condiciones de la prueba (medio de cultivo, inóculo, incubación), b) la comparación con el método de referencia (dilución en agar), y c) el estudio de la reproducibilidad del método.

Las condiciones utilizadas fueron las siguientes:

Medio de cultivo: infusión cerebro corazón

Suplementos: hemina, 5 µg/ml  
vitamina K1, 1 µg/ml  
extracto de levadura, 50 mg/ml

Volumen: 5 ml por tubo

Inóculo: 0,1 ml de una suspensión del patrón  
0,5 Mc Farland

Incubación: anaerobiosis, a 35 °C durante 48 h

Cada ensayo debe constar de:

- Un tubo con el antibiótico a probar y el inóculo, TUBO DE LA PRUEBA

- Un tubo sin antibiótico con el inóculo, CONTROL DEL DESARROLLO

- Un tubo sólo con caldo, CONTROL DE ESTERILIDAD DEL MEDIO

En la Tabla 7 se detallan el número de discos y la concentración de cada antimicrobiano.

La manera en que se debe efectuar la lectura e interpretación de los resultados se indica en la Tabla 8.

El porcentaje de concordancia con el método patrón fue 98,5%. Sólo el 0,5% de las discrepancias fueron consideradas errores muy mayores, porcentaje que está por debajo de lo que es exigido en la literatura para que un método sea aceptable (1,5%). La SBA lo recomienda como método de tamizaje en aislamientos clínicos individuales. Los resultados de resistencia o sensibilidad no habituales deberán ser confirmados por el método de referencia (6).

**Tabla 7.** Esquema de trabajo para el método de elución con discos

Antibiótico	Potencia del disco (µg)	Nº de discos en 5 ml de BHI <sup>(1)</sup>	Concentración final (µg/ml) <sup>(2)</sup>
Ampicilina	10	1/10 ml	1
Ampicilina-sulbactama	10/10	8	16/16
Imipenem	10	3	6
Penicilina	2 U	5	2 U
Cefoxitina	30	5	30
Clindamicina	5	4	4
Metronidazol	50	1	10

<sup>(1)</sup> Excepto para ampicilina, que se prepara con 10 ml; <sup>(2)</sup>excepto penicilina, que se expresa en unidades.

**Tabla 8.** Lectura e interpretación de los resultados del método de elución con discos

Tubo con ATB	Control de desarrollo	Interpretación
Turbio <sup>(1)</sup>	turbio	resistente
Límpido	turbio	sensible
Límpido	límpido	no desarrolla: prueba no válida
Turbio	límpido	incoherente: prueba no válida

<sup>(1)</sup>Cualquier grado de turbidez comparado con el control (caldo sin inocular).

#### 4.4.5. Detección de $\beta$ -lactamasas

Para detectar la presencia de  $\beta$ -lactamasas en bacterias anaerobias se recomienda el método de la cefalosporina cromogénica (nitrocefín). Las cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas pueden ser consideradas resistentes a la penicilina y a la ampicilina independientemente de los resultados de otras pruebas adicionales de sensibilidad *in vitro*. El CLSI la recomienda para todos los organismos anaerobios con excepción del grupo *B. fragilis*, dado que la mayoría de los miembros de este grupo producen  $\beta$ -lactamasas y, por lo tanto, se deben considerar resistentes a la penicilina y a la ampicilina.

Cabe aclarar que algunos anaerobios pueden requerir hasta 30 minutos para producir una prueba positiva, y algunas cepas de *Parabacteroides (Bacteroides) distasonis* y de *B. fragilis* son resistentes a los  $\beta$ -lactámicos por otros mecanismos, que no son detectados por esta prueba (11, 12, 54).

#### 4.4.6. D-test: prueba de difusión con doble disco / tableta

La mayoría de las publicaciones muestran que la clindamicina presenta buena actividad frente a los cocos gram positivos; sin embargo, se ha comunicado resistencia a este antibiótico (8, 35, 40, 44). Si bien el fenotipo constitutivo fue el más frecuentemente observado, también fue detectado el fenotipo inducible (41). Con el fin de evaluar el mecanismo inducible, se ha propuesto una prueba de difusión con doble disco / tableta similar a la utilizada para cocos gram positivos aerobios. Esta se realiza hisopando un agar Brucella suplementado con 5  $\mu$ g/ml de hemina, 1  $\mu$ g/ml de vitamina K1 y 5% de sangre con un inóculo de turbidez similar al patrón 0,5 de Mc Farland. Luego se aplican los discos / tabletas de eritromicina (15  $\mu$ g) y de clindamicina (2  $\mu$ g) a una distancia de 10 a 15 mm de centro a centro. El achatamiento de la zona de inhibición alrededor del disco/tableta de clindamicina se interpreta como prueba positiva.

## 5. QUÉ ANTIBIÓTICOS PROBAR EN LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Ante el aislamiento de un anaerobio clínicamente significativo según las pautas ya expuestas, los antibióticos que se deben ensayar en el laboratorio clínico dependen del tipo de microorganismo, del sitio de la infección y de los patrones de resistencia nacionales, regionales y locales ya conocidos para ese microorganismo, los cuales orientan el esquema terapéutico empírico hasta contar con los resultados del caso en estudio (30, 55).

Teniendo en cuenta estas premisas y de acuerdo con el microorganismo en estudio, se sugiere seguir el siguiente protocolo de trabajo:

- Grupo *Bacteroides fragilis*. Determinar la sensibilidad a ampicilina-sulbactama, piperacilina-tazobactama y clindamicina.
- *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp. Detección de  $\beta$ -lactamasa con nitrocefín.
- *Veillonella* spp. Determinar la sensibilidad a penicilina, a ampicilina y a clindamicina.
- Cocos gram positivos. Determinar la sensibilidad a penicilina y a ampicilina-sulbactama.
- Bacilos gram positivos esporulados. En *Clostridium* no *C. perfringens*, detección de  $\beta$ -lactamasa con nitrocefín y determinación de la sensibilidad a clindamicina.
- Bacilos gram positivos no esporulados. Determinar la sensibilidad a penicilina y a clindamicina.

## 6. CEPAS CONTROL

Con el fin de monitorear los procedimientos de las pruebas de sensibilidad, deben utilizarse al menos dos de las siguientes cepas control para el método de dilución en agar y al menos una para el resto de los métodos (12).

- Bacteroides fragilis* ATCC 25285
- Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741
- Clostridium difficile* ATCC 700057
- Eubacterium lentum* ATCC 430557

## 7. CONSIDERACIONES FINALES

Las decisiones del cuerpo médico para el tratamiento de los pacientes gravemente enfermos dependen, en gran medida, de la información que emana del Servicio de Microbiología. Es por ello que las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos para los diferentes microorganismos y por los distintos métodos deben realizarse en condiciones óptimas y estandarizadas, para que sean reproducibles, confiables y permitan la detección de las variaciones en los patrones habituales de sensibilidad que alerten acerca de probables resistencias emergentes. Este documento pretende contribuir al crecimiento de la bacteriología clínica anaerobia en nuestro medio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann G, Degner A, Cohen SH, Silva J Jr, Rodloff AC. Prevalence and association of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 599-603.
- Appelbaum PC, Philippon A, Jacobs MR, Spangler SK, Gutmann L. Characterization of  $\beta$ -lactamases from non-*Bacteroides fragilis* group *Bacteroides* spp. belonging to seven species and their role in  $\beta$ -lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother 1990; 34: 2169-76.
- Bachoual R, Dubreuil L, Soussy CJ, Tankovic J. Roles of *gyrA* mutations in resistance of clinical isolates and *in vitro* mutants of *Bacteroides fragilis* to the new fluoroquinolone trovafloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1842-5.
- Betriu C, Culebras E, Gómez, M, López, F, Rodríguez-Aviar I, Picazo JJ. Resistance trends of the *Bacteroides fragilis* group over a 10-year period, 1997 to 2006, in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 2686-90.
- Bianchini H, Castello L, Fernández MI, Fernández Canigia L, Greco G, Hardie N, Di Martino A, Litterio M, Predari SC, Rollet R. Guía práctica para el procesamiento de muestras clínicas. Subcomisión Anaerobios. SADEBAC - AAM, 1995, Buenos Aires, Argentina.
- Bianchini H, Fernández Canigia L, Predari SC, Rollet R, Litterio M, Berestein P, Castello L, Di Martino A, Greco G, Hardie N. Broth disk elution method for anaerobic bacteria: a collaborative study to assess its reliability for clinical purposes. Anaerobe 1997; 3: 225-31.
- Bolmström A. Susceptibility testing of anaerobes with Etest. Clin Infect Dis 1993; 16 (Suppl 4): S367-70.
- Brazier J, Chmelar D, Dubreuil L, Feierl G, Hedberg M, Kalenic S, Kónönen E, Lundgren B, Malamou-Ladas H, Nagy E, Sullivan A, Nord CE. ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. European surveillance study on antimicrobial susceptibility of gram-positive anaerobic cocci. Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 316-20.
- Choi SY, Chang CE, Kim SC, So JS. Antimicrobial susceptibility and strain prevalence of Korean vaginal *Lactobacillus* spp. Anaerobe 2003; 9: 277-80.
- Citron DM, Ostavari A, Karlsson A, Goldstein EJC. Evaluation of the epsilometer (Etest) for susceptibility testing of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol 1991; 29: 2197-203.
- Citron MD, Poxton IR, Baron EJ. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic gram-negative rods. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology, 9th edition. Washington DC, ASM Press, 2007, p. 911-32.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, 2007; M11-A7. Wayne, PA, USA.
- Cooper AJ, Shoemaker NB, Salyers AA. The erythromycin resistance gene from the *Bacteroides* conjugal transposon Tc<sup>r</sup> Em<sup>r</sup> 7853 is nearly identical to *ermG* from *Bacillus sphaericus*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 506-8.
- Dali P, Giugliano ER, Vellozzi EM, Smith MA. Susceptibility of *Propionibacterium acnes* ophthalmic isolates to moxifloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2969-70.
- Dridi L, Tankovic J, Burghoffer B, Barbut F, Petit JC. *gyrA* and *gyrB* mutations are implicated in cross-resistance to ciprofloxacin and moxifloxacin in *Clostridium difficile*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3418-21.
- Engelkirk PG, Duben-Engelkirk J, Dowell Jr VR. Principles and Practice of Clinical Anaerobic Bacteriology. Belmont, California, Star Publishing, 1992.
- Euzéby JP. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Disponible en: [www.bacterio.cict.fr/html](http://www.bacterio.cict.fr/html). Consultado el 1° de diciembre de 2010.
- Fernández Canigia L, Castello L, Di Martino A, Greco G, Legaria MC, Litterio M, Predari SC, Rollet R, Rossetti A, Carloni G, Sarchi MI, Bianchini H. Susceptibility trends of *Bacteroides fragilis* group isolates from Buenos Aires, Argentina. Rev Argent Microbiol 2007; 39: 156-60.
- Fernández Canigia L, Di Martino A, Litterio M, Castello L, Fernández MI, Rollet R, Greco G, Predari SC, Bianchini H. Comparative *in vitro* activities of four macrolides at two pH values against gram-negative anaerobic rods other than the *Bacteroides fragilis* group. Anaerobe 1999; 5: 451-4.
- Fernández Canigia L, Legaria MC, Castello L, Predari SC, Di Martino A, Rossetti A, Rollet R, Carloni G, Bianchini H, Litterio M, otros participantes de la vigilancia. Actividad de 10 antimicrobianos frente a *Bacteroides* grupo *fragilis* según el origen de los aislamientos. XII Congreso Argentino de Microbiología, Resumen 27470. Rev Argent Microbiol 2010; 42 Supl 1: 237.
- Fernández Canigia L, Legaria MC, Castello L, Di Martino A, Predari SC, Rossetti A, Rollet R, Carloni G, Bianchini H, Litterio M y otros participantes de la vigilancia. Primer estudio nacional de vigilancia de la sensibilidad de *Bacteroides* grupo *fragilis*. IX Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología-SADI 2010, Resumen 26656, Mar del Plata, Argentina.
- Fernández Canigia L, Litterio M, Cejas M, Legaria MC, Castello L, Predari SC, Di Martino A, Rossetti A, Rollet R, Carloni G, Bianchini H, Radice M, Gutkind G and the Anaerobic Group. Susceptibility pattern of *Bacteroides fragilis* group isolates against 10 antibiotics. Emergence of carbapenem resistance in Argentina. 50<sup>th</sup> ICAAC, 2010, Resumen 3736, Boston, EE.UU.
- Fernández Canigia L, Litterio M, Rossetti A, Legaria MC, Castello L, Rollet R, Di Martino A, Greco G, Carloni G, Bianchini H, Predari SC. Sensibilidad de *Clostridium difficile* frente a diferentes antimicrobianos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Congreso SADEBAC 2006, 25 ANIVERSARIO, Resumen 15487, Buenos Aires, Argentina.
- Gal M, Brazier JS. Metronidazole resistance in *Bacteroides* spp. carrying *nim* genes and the selection of slow-growing metronidazole-resistant mutants. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 109-16.
- Giraud-Morin C, Madinier I, Fosse T. Sequence analysis of *cfxA2*-like  $\beta$ -lactamases in *Prevotella* species. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 1293-6.
- Glupczynski Y, Berhin C, Nizet H. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Belgium as determined by Etest methodology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 261-7.
- Goldstein EJC, Citron DM, Warren YA, Tyrrell KL, Merriam CV, Fernández H. *In vitro* activity of moxifloxacin against 923 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 148-55.
- Goldstein EJC, Citron DM, Merriam CV, Warren Y, Tyrrell K, Fernandez HT. *In vitro* activities of dalbavancin and nine comparator agents against anaerobic gram-positive species and corynebacteria. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 1968-71.
- Hecht DW. Evolution of anaerobe susceptibility testing in the United States. Clin Infect Dis 2002; 35 (Suppl 1): S28-35.
- Hecht DW. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. Anaerobe 2006; 12: 115-21.
- Jousimies-Somer HR, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual, 6th edition. Belmont, California, Star Publishing, 2002.

32. Könönen E, Wade W. *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive rods. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (editores). Manual of Clinical Microbiology, 9th edition. Washington DC, ASM Press, 2007, p. 872-88.
33. Legaria MC, Litterio M, Castello L, Di Martino A, Predari SC, Rossetti A, Rollet R, Carloni G, Bianchini H, Rocchi M, Fernández Caniglia L. *Bacteroides* grupo *fragilis* resistentes a imipenem, ertapenem, doripenem y piperacilina-tazobactam: primeros aislamientos en Argentina. IX Congreso Argentino de la Sociedad Argentina de Infectología- SADI 2010, Resumen 26983, Mar del Plata, Argentina.
34. Letournel-Glomaud C, Houssaye CS, Milhailha L, Ghnassia JC. Etest antibiotics susceptibility of strict anaerobic bacteria. *Anaerobe* 2003; 9: 281-4.
35. Litterio M, Bianchini H, Carloni G, Di Martino A, Fernández Caniglia L, Greco G, Legaria C, Rollet R, Rossetti A, Predari SC, Castello L. Actividad *in vitro* de 10 antimicrobianos frente a bacterias anaerobias. Estudio multicéntrico, 1999-2002. *Rev Argent Microbiol* 2004; 36: 130-5.
36. Litterio M, Carloni G, Bianchini H, Castello L, Fernández Caniglia L, Greco G, Legaria C, Rollet R, Rossetti A, Predari SC, Di Martino A. Actividad *in vitro* de los miembros del grupo macrólido-azálico-ketólido frente a bacterias anaerobias. Estudio multicéntrico. Subcomisión de Bacterias Anaerobias SADEBAC-AAM. Reunión Científica Microbiología 2003, Resumen P O20, p. 25, Buenos Aires, Argentina.
37. Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlung C. Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1253-6.
38. Mättö J, Asikainen S, Väisänen ML, von Troil-Lindén B, Könönen E, Saarela M, Salminen K, Fingold SM, Jousimies-Somer H.  $\beta$ -lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella palliens*, genotypes and *in vitro* susceptibilities to selective antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2383-8.
39. Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ, McDermott L, Wagener MW, Harrell L, Snyderman DR. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 870-6.
40. Nord CE, Lindmark A, Person I. Susceptibility of anaerobic bacteria to FCE 22101. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 831-3.
41. Ohm-Smith, MJ, Sweet RL, Hadley WK. Occurrence of clindamycin-resistant anaerobic bacteria isolated from cultures taken following clindamycin therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 30: 11-4.
42. Oprica C, Nord CE, on behalf of the ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11: 204-13.
43. Podglajen I, Breuil J, Collatz E. Insertion of a novel DNA sequence, IS1186, upstream of the silent carbapenemase gene *cfiA*, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. *Mol Microbiol* 1994; 12: 105-14.
44. Reig M, Moreno A, Baquero F. Resistance of *Peptostreptococcus* spp. to macrolides and lincosamides: inducible and constitutive phenotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 662-4.
45. Rogers MB, Parker AC, Smith J. Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* reveals a new subgroup of Ambler class A  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2391-400.
46. Rosenblatt JE, Gustafson DR. Evaluation of the Etest for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 22: 279-84.
47. Scott KP, Melville CM, Barbosa TM, Flint HJ. Occurrence of the new tetracycline resistance gene *tet(W)* in bacteria from the human gut. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 775-7.
48. Shames R, Satti F, Vellozzi EM, Smith MA. Susceptibilities of *Propionibacterium acnes* ophthalmic isolates to ertapenem, meropenem, and cefepime. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4227-8.
49. Snyderman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Golan Y, Hecht DW, Goldstein EJ, Harrell L, Jenkins S, Newton D, Pierson C, Rihs JD, Yu VL, Venezia R, Finegold SM, Rosenblatt JE, Gorbach SL. Lessons learned from the anaerobe survey: historical perspective and review of the most recent data (2005-2007). *Clin Infect Dis* 2010; 50 (Suppl 1): S23-36.
50. Theron MM, Janse van Rensburg MN, Chalkley LJ. Nitroimidazole resistance genes (*nimB*) in anaerobic gram-positive cocci (previously *Peptostreptococcus* spp.). *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 240-2.
51. Theron MM, Janse van Rensburg MN, Chalkley LJ. Penicillin-binding proteins involved in high-level piperacillin resistance in *Veillonella* spp. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 120-2.
52. Trinh S, Haggoud A, Reyssat G, Sebald M. Plasmids pIP419 and pIP421 from *Bacteroides*: 5-nitroimidazole resistance genes and their upstream insertion sequence elements. *Microbiology* 1995; 141: 929-35.
53. Villedieu A, Diaz-Torres ML, Hunt N, McNab R, Spratt DA, Wilson M, Mullany P. Prevalence of tetracycline resistance genes in oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 878-82.
54. Wexler H, Halebian S. Alterations to the penicillin-binding proteins in the *Bacteroides fragilis* group: a mechanism for non- $\beta$ -lactamase mediated cefoxitin resistance. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 7-20.
55. Yao JDC, Moellering RC. Antibacterial agents. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of Clinical Microbiology, 9th edition. Washington DC, ASM Press, 2007, p. 1077-113.