

Actividad “in vitro” de 10 antimicrobianos frente a bacterias anaerobias. Estudio multicéntrico, 1999-2002

M. LITTERIO^{1*}, H. BIANCHINI², G. CARLONI³, A. DI MARTINO⁴, L. FERNÁNDEZ CANIGIA⁵, G. GRECO⁶, C. LEGARIA⁷, R. ROLLET⁸, A. ROSSETTI⁹, S.C. PREDARI¹⁰, L. CASTELLO¹⁰

¹ Hospital Nacional de Pediatría Juan P. Garrahan, ² Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Dr. Norberto Quirno (CEMIC), ³ Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires, ⁴ Sanatorio Mitre, ⁵ Hospital Alemán, ⁶ Hospital Italiano, ⁷ Hospital de Agudos Enrique Tomé, ⁸ Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco J. Muñiz, ⁹ H.I.G.A. Pte. Perón. Avellaneda. Pcia. de Buenos Aires, ¹⁰ Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Universidad de Buenos Aires.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina

* Correspondencia. E-mail: mlitteri@garrahan.gov.ar

RESUMEN

Se evaluó la actividad de ampicilina, ampicilina-sulbactama, cefoxitina, ceftriaxona, imipenem, piperacilina, piperacilina-tazobactama, clindamicina, metronidazol y azitromicina frente a 166 cepas de bacterias anaerobias aisladas en 8 hospitales de Buenos Aires. Se estudiaron: *Bacteroides* grupo *fragilis* (65), *Fusobacterium* spp. (26), *Prevotella* spp. (21), *Porphyromonas* spp. (10), *Clostridium difficile* (10), otros clostridios (12) y cocos gram-positivos (22). Las CIMs se determinaron usando el método patrón de dilución en agar recomendado por el NCCLS, documento M11-A5. Los antibióticos más activos fueron metronidazol y piperacilina-tazobactama que exhibieron valores de CIM₉₀ ≤ 2 µg/ml y ≤ 4 µg/ml frente a los microorganismos gram-negativos y ≤ 2 µg/ml y ≤ 8 µg/ml frente a los microorganismos gram-positivos, respectivamente. Entre los β-lactámicos el orden de actividad frente a bacilos gram-negativos fue: imipenem > piperacilina > cefoxitina > ceftriaxona > ampicilina. En gram-positivos la actividad decreciente fue: piperacilina > imipenem > cefoxitina > ceftriaxona > ampicilina. La mayoría de las especies estudiadas mostraron distintos niveles de resistencia con clindamicina y azitromicina. Sin embargo, el 90% de las cepas de *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas* spp. fue inhibido por una concentración de 0,125 µg/ml de clindamicina y azitromicina, respectivamente.

Palabras clave: bacterias anaerobias, sensibilidad, resistencia

SUMMARY

“In vitro” activity of ten antimicrobial agents against anaerobic bacteria. A collaborative study, 1999-2002. The antimicrobial activity of ampicillin, ampicillin-sulbactam, cefoxitin, ceftriaxone, imipenem, piperacillin, piperacillin-tazobactam, clindamycin, metronidazole, and azitromycin was assessed against 166 strains of anaerobic bacteria recovered from eight hospitals in Buenos Aires. The strains studied were *Bacteroides fragilis* group (65), *Fusobacterium* spp. (26), *Prevotella* spp. (21), *Porphyromonas* spp. (10), *Clostridium difficile* (10), other clostridia (12), and gram-positive cocci (22). The MICs were determined by the agar dilution method according to NCCLS document M11-A5. Metronidazole and piperacillin-tazobactam were the most active antimicrobial agents tested and exhibited MIC₉₀ values of ≤ 2 µg/ml and ≤ 4 µg/ml against gram-negative organisms, and ≤ 2 µg/ml, and ≤ 8 µg/ml against gram-positive organisms, respectively. Among β-lactams the activity against gram-negative rods was in the following order: imipenem > piperacillin > cefoxitin > ceftriaxone > ampicillin. Among the gram-positive bacteria the decreased activity was: piperacillin > imipenem > cefoxitin > ceftriaxone > ampicillin. The majority of the species studied showed different degrees of resistance to clindamycin and azitromycin. Nevertheless, 90% of *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas* spp. isolates were inhibited by 0.125 mg/ml of clindamycin and azitromycin, respectively.

Key words: anaerobic bacteria, susceptibility, resistance

Las bacterias anaerobias son parte de la microbiota residente humana y en ocasiones están involucradas en procesos infecciosos, generalmente de naturaleza polimicrobiana (9,10). El incremento de la resistencia a los agentes antimicrobianos, especialmente entre los bacilos gram-negativos, justifica revisiones periódicas de los perfiles de sensibilidad los cuales permiten detectar la emergencia de cepas resistentes y las tendencias en hospitales y áreas geográficas diferentes (2, 5). Esta información constituye una ayuda importante para el médico en el momento de elegir el tratamiento empírico más adecuado.

Se estudiaron 166 aislamientos únicos y sucesivos de bacterias anaerobias recuperados de muestras clínicas entre 1999 y 2002 en 8 hospitales de Buenos Aires: Hospital Nacional de Pediatría Juan P. Garrahan, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas Dr. Norberto Quirno (CEMIC), Sanatorio Mitre, Hospital Alemán, Hospital Italiano, Hospital de Agudos Enrique Tornú, Hospital de Enfermedades Infecciosas Francisco J. Muñiz e Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari. Se evaluó la actividad "in vitro" de ampicilina, ampicilina-sulbactama, cefoxitina, ceftriaxona, imipenem, piperacilina, piperacilina-tazobactama, clindamicina, metronidazol y azitromicina. Los microorganismos estudiados fueron: *Bacteroides* grupo *fragilis* (65), *Fusobacterium* spp. (26), *Prevotella* spp. (21), *Porphyromonas* spp. (10), *Clostridium difficile* (10), otros clostridios (12), cocos gram-positivos (22). Las bacterias se identificaron de acuerdo a los métodos bioquímicos convencionales (25). Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) se determinaron usando agar Brucella (Laboratorios Britania S.A.) suplementado con 5 µg/ml de hemina, 1 µg/ml de vitamina K1 y 5% de sangre ovina hemolizada, según el método patrón recomendado por las normas del NCCLS documento M11-A5 (19). Se utilizaron las cepas de *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 y *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 como controles. Los puntos de corte y la clasificación de las categorías usadas fueron las recomendadas por el NCCLS. No existiendo un punto de corte de resistencia para azitromicina en relación a las bacterias anaerobias, se optó por usar 2 µg/ml según lo recomendado para *Streptococcus pneumoniae* (20).

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos de CIM₅₀, CIM₉₀ y CIM más frecuente (modo) para las distintas especies y antibióticos probados.

El grupo *Bacteroides fragilis* presentó diferentes grados de resistencia a ampicilina-sulbactama, cefoxitina, ceftriaxona, piperacilina y clindamicina, con total sensibilidad a imipenem, piperacilina-tazobactama y metronidazol. Ampicilina y azitromicina no fueron antibióticos activos frente a este grupo de microorganismos.

No hubo diferencias apreciables entre *B. fragilis* y las otras especies del grupo *B. fragilis* en la resistencia a ampicilina y azitromicina. En cambio, sí hubo diferencias (más del 5%) en los porcentajes de resistencia de *B. fragilis* y otras especies del grupo *B. fragilis* frente a ampicilina-sulbactama, cefoxitina, ceftriaxona, piperacilina y clindamicina. Aldridge *et al* (2) comparando las actividades de distintos agentes antimicrobianos frente a *B. fragilis* y especies no *B. fragilis*, también encontraron diferencias (iguales o mayores al 5%) para ampicilina-sulbactama y clindamicina, pero no entre los valores de cefoxitina. Hasta el momento la resistencia a ampicilina-sulbactama había sido reportada en otros países (2, 3) pero no en Argentina, donde sólo habían sido informadas 2 cepas con sensibilidad disminuida (CIM = 4 µg/ml) (5) y 7 cepas con sensibilidad intermedia a este antibiótico (CIM = 16 µg/ml) (17). Por lo tanto, es importante resaltar la emergencia de resistencia a ampicilina-sulbactama en *B. fragilis* (3,2%) y en otras especies del grupo (8,8%), no detectada en relevamientos efectuados con anterioridad en nuestro medio (4, 17). Aunque las cepas resistentes tuvieron valores de CIM iguales al punto de corte de resistencia, es decir, resistencia de bajo nivel (32/16 µg/ml), el valor de CIM₉₀ para *B. fragilis* fue 8 µg/ml y para las otras especies del grupo llegó a 16 µg/ml. De las combinaciones β-lactámico-inhibidor de β-lactamasa, piperacilina-tazobactama fue más efectiva que ampicilina-sulbactama. Todas las cepas de *Bacteroides* grupo *fragilis* resultaron inhibidas por 8 µg/ml de piperacilina-tazobactama. En cuanto a las cefalosporinas, ceftriaxona tuvo menor actividad que cefoxitina, con CIM₉₀ > 128 µg/ml y 64 µg/ml respectivamente, para todos los aislamientos de *Bacteroides* grupo *fragilis*. En la literatura se reportaron valores comparables a los que aquí presentamos (3). Las cepas de *B. fragilis* se mostraron más sensibles a clindamicina que las de *B. no fragilis*. El grupo *B. fragilis* no mostró variaciones mayores a un 5% en los porcentajes de resistencia a clindamicina, cuando comparamos los datos actuales con un estudio que efectuamos anteriormente (17). Sin embargo, hemos observado una variación mayor a un 10% al comparar el estudio actual con lo que reportamos a principios de la década del '90 (4). No detectamos cepas de *Bacteroides* grupo *fragilis* resistentes a imipenem y piperacilina-tazobactama, a diferencia de lo informado por otros autores (15, 24, 26).

Los antimicrobianos ensayados, a excepción de azitromicina, exhibieron buena actividad sobre la casi totalidad de los aislamientos del género *Fusobacterium*. Todas las cepas de *F. nucleatum* fueron sensibles a penicilinas y cefalosporinas. Estos resultados permiten inferir que nuestras cepas no fueron productoras de

β-lactamasas, aunque en un estudio reciente se encontraron cepas de *F. nucleatum* productoras de β-lactamasa con CIM a penicilina entre 0,5 y 1 µg/ml (21). El alto grado de sensibilidad obtenido frente a clindamicina concuerda con los datos comunicados por otros autores (14, 15, 18). Los porcentajes de resistencia a azitromicina fueron elevados (36% en *F. nucleatum* y 46% en las otras fusobacterias). La baja actividad de este antimicrobiano fue comparable a lo reportado por Citron *et al* y Ednie *et al* (6, 8). En el presente relevamiento no se detectó resistencia a metronidazol entre las fusobacterias, sin embargo cabe

destacar el informe de aislamientos resistentes en otras latitudes (16).

Las especies de *Prevotella* mostraron 100% de sensibilidad a la mayoría de los antibióticos ensayados a excepción de ampicilina, clindamicina y azitromicina. Para todos los antibióticos la CIM más frecuente fue inferior al punto de corte de sensibilidad. La total recuperación de la actividad del β -lactámico con el agregado de sulbac-tama sugiere que dicha resistencia se debió a la producción de β -lactamasas, descritas con anterioridad en este grupo de bacilos gram-negativos (22). Del 42,8% de cepas resistentes a ampicilina, sólo 2 exhibieron alto nivel de resistencia (CIM > 64 $\mu\text{g/ml}$). Un solo aislamiento resultó resistente a clindamicina (CIM > 8 $\mu\text{g/ml}$) y cuatro a azitromicina con CIMs entre 2 y 16 $\mu\text{g/ml}$. Otros autores también han mostrado resistencia a ampicilina y penicilina en el género *Prevotella* y una actividad variable de clindamicina (7, 13, 14). No fueron encontradas cepas resistentes a metronidazol, sin embargo, han sido reportadas por otros autores (15, 16).

Con la excepción de una cepa resistente a clindamicina (CIM > 8 $\mu\text{g/ml}$), todos los antibióticos probados fueron en un 100% activos frente a *Porphyromonas* spp. Otros autores describieron *Porphyromonas* spp. productoras de β -lactamasa y con resistencia a penicilina (2, 18).

Todas las cepas de *Clostridium perfringens* fueron uniformemente sensibles a los antibióticos probados. Entre las especies de *Clostridium* no *C. perfringens*, una cepa de *C. tertium* y otra de *C. paraputrificum* mostraron cierto grado de resistencia a ampicilina, ceftriaxona, clindamicina y azitromicina. Por otro lado, *C. difficile* presentó porcentajes de resistencia notablemente superiores con respecto al resto de las especies estudiadas y además, exhibió un 10% de resistencia a imipenem, dato en concordancia con lo referido en la literatura (11, 26). Si bien *C. difficile* mostró un 100% de resistencia a ampicilina, los valores de CIM obtenidos fueron iguales al punto de corte de resistencia o una dilución por encima del mismo. Ningún clostridio fue resistente a las asociaciones con inhibidores de β -lactamasas. La resistencia a clindamicina entre las cepas de *C. difficile* (CIM = 16 mg/ml) no pudo considerarse de alto nivel como la descrita por Ackermann *et al* (1). Todas las cepas de clostridios fueron sensibles a metronidazol. Un estudio de Peláez *et al* (23) que evaluó 415 cepas de *C. difficile*, reportó un 6,3% de resistencia a metronidazol con CIM > 32 $\mu\text{g/ml}$. Según los autores, dicha resistencia carece de significación clínica en el tratamiento de la diarrea asociada a *C. difficile*, debido a las altas concentraciones alcanzadas por la droga a nivel intestinal.

El género *Peptostreptococcus* exhibió baja resistencia a ampicilina, ampicilina-sulbactama y clindamicina y alta a azitromicina. *P. anaerobius* fue la especie más frecuente y la única que mostró resistencia a ampicilina y ampicilina-sulbactama. Hasta el momento, la producción de β -lactamasa no ha sido descrita entre los cocos gram-positivos anaerobios y la resistencia a ampicilina, en la literatura, fue similar a lo informado en este trabajo (7, 11). Azitromicina no tuvo buena actividad sobre los cocos gram-positivos estudiados, resultado similar al reportado por Goldstein *et al* (12). Metronidazol mostró total actividad sobre los cocos gram-positivos, a diferencia de lo observado por otros autores (7, 26). Debido a que la taxonomía de estos microorganismos se encuentra aún en revisión, es posible que en las series mencionadas se hayan incluido cepas aerotolerantes.

En el relevamiento epidemiológico realizado el dato sobresaliente ha sido la aparición, en nuestro medio, de resistencia a ampicilina-sulbactama entre *Bacteroides* grupo *fragilis*. Estos microorganismos continúan siendo los anaerobios con el mayor perfil de resistencia. Frente al total de cepas estudiadas, piperacilina-tazobactama y metronidazol fueron los antibióticos más activos. Entre los β -lactámicos el orden de actividad frente a los bacilos gram-negativos fue: imipenem > piperacilina > cefoxitina > ceftriaxona > ampicilina. En cambio, frente a los gram-positivos el mismo fue: piperacilina > imipenem > cefoxitina > ceftriaxona > ampicilina. Azitromicina no mostró actividad uniforme frente a los aislamientos estudiados, a excepción de *Prevotella* spp. y *Porphyromonas* spp.

Conscientes de las dificultades en el estudio de la sensibilidad de las bacterias anaerobias en el trabajo diario para la mayoría de los centros nacionales, y de la importancia de evaluaciones periódicas para detectar la emergencia de cepas resistentes y las tendencias, hemos querido mostrar los datos locales actualizados, con fines epidemiológicos y terapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ackermann G, Degner A, Cohen S, Silva J, Rodloff A (2003) Prevalence and association of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) resistance to moxifloxacin in *Clostridium difficile*. J. Antimicrob. Chemother. 51: 599-603.
2. Aldridge K, Ashcraft D, Cambre K, Pierson C, Jenkins S, Rosenblatt J (2001) Multicenter survey of the changing in vitro

- antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1238-1243.
3. Aldridge K, Ashcraft D, O'Brien M, Sanders Ch (2003) Bacteremia due to *Bacteroides fragilis* group: distribution of species, b-lactamase production, and antimicrobial susceptibility patterns. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 148-153.
 4. Bianchini H, Berenstein P, Notario R, Litterio M, Greco G, Hardie N, *et al* (1994) Estudio multicéntrico de la sensibilidad de bacterias anaerobias en la Argentina. *Infect. y Microbiol. Clín.* 6: 7-19.
 5. Bianchini H, Fernández Cangia L, Bantar C, Smayevsky J (1997) Trends in antimicrobial resistance of the *Bacteroides fragilis* group: a 20 year study at a medical center in Buenos Aires, Argentina. *Clin. Infect. Dis.* 25 (Suppl 2): 268-269.
 6. Citron D, Appleman M (2001) Comparative in vitro activities of ABT-773 against 362 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 345-348.
 7. Citron D, Merriam C, Tyrrell K, Warren Y, Fernandez H, Goldstein E (2003) In vitro activities of ramoplanin, teicoplanin, vancomycin, linezolid, bacitracin, and four other antimicrobials against intestinal anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2334-2338.
 8. Ednie L, Jacobs M, Appelbaum P (1997) Comparative antianaerobic activities of the ketolides HMR 3647 (RU 66647) and HMR 3004 (RU 64004). *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 2019-2022.
 9. Finegold S (1995). Anaerobic infections in humans: an overview. *Anaerobe* 1: 3-9.
 10. Finegold SM (1995) Anaerobic bacteria: general concepts. En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Ed), *Principles and practice of infectious diseases*, Churchill Livingstone Inc. USA, p. 2156-2173.
 11. Goldstein E, Citron D, Merriam C, Warren Y, Tyrrell K, Fernandez H (2003) In vitro activities of daptomycin, vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and five other antimicrobials against 307 gram-positive anaerobic and 31 *Corynebacterium* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 337-341.
 12. Goldstein E, Citron D, Merriam C, Warren Y, Tyrrell K, Fernandez H (2003) In vitro activities of telithromycin and 10 oral agents against aerobic and anaerobic pathogens isolated from antral puncture specimens from patients with sinusitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1963-1967.
 13. Goldstein E, Citron D, Merriam C, Warren Y, Tyrrell K, Fernandez H (2002) Comparative in vitro activity of faropenem and 11 other antimicrobial agents against 405 aerobic and anaerobic pathogens isolated from skin and soft tissue infections from animal and human bites. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 411-420.
 14. Goldstein E, Citron D, Merriam C, Warren Y, Tyrrell K, Fernandez H (2003) In vitro activities of ABT-492, a new fluoroquinolone, against 155 aerobic and 171 anaerobic pathogens isolated from antral sinus puncture specimens from patients with sinusitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3008-3011.
 15. Hoellman D, Kelly L, Jacobs M, Appelbaum P (2001) Comparative antianaerobic activity of BMS 284756. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 589-592.
 16. Kleinkauf N, Ackermann G, Schaumann R, Rodloff A (2001) Comparative in vitro activities of gemifloxacin, other quinolones, and nonquinolone antimicrobials against obligately anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 1896-1899.
 17. Litterio M, Castello L, Rollet R, Di Martino A, Greco G, Fernández Canigia L, *et al* (1999) Susceptibility of anaerobic gram-negative rods to trovafloxacin and other eight antibiotics. A collaborative study from Argentina. *Drugs* 58 (Suppl 2): 193-194.
 18. Milazzo I, Blandino G, Caccamo F, Musumeci R, Nicoletti G, Speciale A (2003) Faropenem, a new oral penem: antibacterial activity against selected anaerobic and fastidious periodontal isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 721-725.
 19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2001) *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved standard- Fifth edition*. NCCLS document M11-A5, Wayne, PA, USA.
 20. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twelfth Informational Supplement*. NCCLS document M100-S12, Wayne, PA, USA.
 21. Nyfors S, Könönen E, Syrjänen R, Komulainen E, Jousimies-Somer H (2003) Emergence of penicillin resistance among *Fusobacterium nucleatum* populations of commensal oral flora during early childhood. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 107-112.
 22. Nyfors S, Könönen E, Takala A, Jousimies-Somer H (1999) b-lactamase production by oral anaerobic gram-negative species in infants in relation to previous antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1591-1594.
 23. Peláez T, Alcalá L, Alonso R, Rodríguez-Crèixems M, García-Lechuz J, Bouza E (2002) Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 1647-1650.
 24. Snyderman D, Jacobus N, McDermott L, Ruthazer R, Goldstein E, Finegold S *et al* (2002) In vitro activities of newer quinolones against *Bacteroides* group organisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3276-3279.
 25. Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong C, Wexler HM, Finegold SM (1993) *Wadsworth anaerobic bacteriology manual*, 5th ed. Star Publishing Company, Belmont, CA.
 26. Wexler H, Molitoris D, St. John S, Vu A, Read E, Finegold S (2002) In vitro activities of faropenem against 579 strains of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3669-3675.