

# Identificación de Bacilos Gram negativos Anaerobios y Clostridium a través de los Métodos de API y Minitec<sup>1</sup>

Charles W. Hanson, Rodrigo Cassorla,<sup>1</sup> William J. Martin.<sup>1, 2</sup>

## API and Minitec Systems in Identification of Clinical Isolates of Anaerobic Gram-Negative Bacilli and Clostridium Species

A comparison of the API and Minitec methods of biochemical testing was made on a variety of anaerobic bacteria. Although API and Minitec results were not compared to more standardized or conventional procedures of identification, multiple repeat testing of the two systems was done on routine clinical isolates and known organisms to determine (i) whether the reactions were reliably consistent, (ii) the ease of reading the two systems with respect to the frequency of questionable results, and (iii) the percentage of routine clinical isolates for which each system yielded an identification. The Minitec system gave a much lower incidence of difficult to interpret reactions. The two systems were comparable in terms of reproducibility and capability of yielding an identification of the anaerobic gram-negative bacilli and Clostridium species, but were unsatisfactory for routine use on most of the other anaerobic bacteria isolated.

La potencial severidad de las infecciones por gérmenes anaerobios ha establecido la necesidad de una identificación rápida y correcta de los organismos involucrados, lo que a su vez permite un tratamiento antimicrobiano adecuado y precoz. Los estudios bioquímicos convencionales de anaerobios son lentos y caros y están más allá de las capacidades de demasiados Laboratorios Químicos. Esta necesidad de un sistema simplificado ha llevado al desarrollo de varios procedimientos miniaturizados. Nuestro propósito fue evaluar 2 sistemas de interés, el método de API (Analytab Products, Inc., Plainview, N.Y.) y de Minitec (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) para determinar su utilidad en la identificación de bacterias anaeróbicas. Especialmente, pruebas repetidas de los procedimientos fueron hechas en aislados clínicos rutinarios para determinar: 1. Si estas reacciones eran confiablemente consistentes. 2. Precisión de lectura, en lo que se refiere a la frecuencia de resultados dudosos. 3. El porcentaje de aislados clínicos para el cual cada sistema era capaz de entregar una identificación.

No está dentro de los propósitos de esta investigación comparar el API y el Minitec con los procedimientos tradicionales, ya que esto ha sido hecho en otras publicaciones.<sup>6, 14, 18, 20</sup> Nuestra preocupación básica son los resultados ambiguos

y conflictivos que se encuentran en el uso diario de los procedimientos en los Laboratorios de Microbiología.

## MATERIAL Y METODO

### Organismos y tratamiento de los cultivos.

Los organismos usados fueron aquellos aislados del trabajo clínico habitual y algunos cultivos de la colección de la Universidad de California, sede Los Angeles. El tratamiento de los cultivos<sup>3, 12, 13</sup> y los medios<sup>7</sup> han sido previamente descritos.

Cada aislado fue inoculado sobre la mitad de una placa de agar sangre para anaerobios<sup>7</sup> y fue incubado anaeróticamente a 35 grados centígrados en un jarro Gas-Pak. Una placa comercial de agar sangre fue también inoculada e incubada aeróticamente a 35° para servir como control de contaminación. Después de 48 horas de incubación las colonias fueron cosechadas con una tórula de algodón estéril.

### Inoculación, Incubación y Lectura de la cinta de API.

Las bacterias fueron dejadas en suspensión agitando la tórula de algodón en una ampolla de inoculación hasta alcanzar una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^8$  y con posterioridad fueron inoculadas a las cintas de API de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Las cintas fueron incubadas anaeróticamente a 35° en los jarros Gas-Pak. Después de 48 horas fueron retiradas de los jarros, agregándose indica-

<sup>1</sup>Reimpresión de un artículo publicado en: Journal of Clinical microbiology July 1979, pp. 14-18.

<sup>2</sup>Departments of Pathology, and Microbiology and Immunology, Clinical Laboratory, Microbiology Section, UCLA Center for the Health Sciences, Los Angeles, California 90024.

dor de bromocresol púrpura al 0,02 a todos los sustratos de carbohidrato o alcohol antes de la lectura.

El color púrpura fue interpretado como negativo y el amarillo como positivo.

Reacciones dudosas que no eran claramente amarillas o púrpura fueron interpretadas como  $\pm$ . Todos los demás ensayos fueron realizados de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes.

#### *Inoculación, Incubación y Lectura de las bandejas de Minitec.*

Los organismos fueron suspendidos agitando la tórua de algodón en una ampolla de medio de inoculación para Minitec a una densidad de aproximadamente  $5 \times 10^9$  células x ml. La pipeta de Minitec fue usada para inocular los discos de papel filtro que contienen los sustratos en estudio. Estas placas fueron incubadas en jarros Gas-Pak a 35°.

Después de 48 horas estas placas fueron retiradas de los jarros agregándose indicador de rojo fenol a 0,025% a todos aquellos sustratos con alcohol y carbohidratos inmediatamente antes de la lectura. El color rojo fue valorado como negativo y el amarillo como positivo. Reacciones equívocas en las cuales ni el color amarillo ni el rojo estaba claramente definido fueron interpretados como  $\pm$ .

Con ambos sistemas la hidrólisis de la Esculina fue determinada por la ausencia de fluorescencia al ser expuesta a la luz ultravioleta de 360 nm. Controles de viabilidad y de contaminación fueron efectuados simultáneamente en cada organismo estudiado, inoculando 2 placas de agar sangre tanto aeróbica como aneróticamente. Los resul-

tados fueron interpretados de acuerdo a las tablas de identificación entregadas con ambos sistemas.

En aquellas situaciones en las cuales una identificación de género especie no fue posible con un determinado microsistema o cuando había desacuerdo entre ambos sistemas o ambas situaciones, el género correcto fue determinado usando a tinción de Gram., morfología celular a partir del tioglicolato, presencia o ausencia de esporas, cromatografía y estudios bioquímicos similares a aquellos sugeridos por Porschen y Stalons.<sup>17</sup>

Nuestros resultados fueron reevaluados a la luz de un índice analítico entregado por API.

## RESULTADOS

Una evaluación preliminar de los métodos de API y Minitec fue hecha en 114 organismos conocidos y los resultados comparados con el manual de laboratorio para anaerobios del Instituto Politécnico de Virginia. Los resultados obtenidos con el Minitec y en especial con el API generalmente están de acuerdo con los datos del Instituto Politécnico de Virginia. Sin embargo, se hizo evidente que la comparación de resultados de un sistema con el otro no era estrictamente válido, debido a las diferencias entre ellos en lo referente a uso de buffers, indicadores de PH, y el tamaño del inóculo de ambos procedimientos. Pese a éstas consideraciones Minitec utiliza las tablas del CDC.

Más aún, al usar este enfoque en un número limitado de organismos desconocidos, la frecuencia de identificación no fue mayor que cuando los resultados obtenidos de cada sistema fueron comparados con sus propias tablas de identificación.

Se hizo evidente en las etapas iniciales de este

Tabla 1

Reproductibilidad de reacciones sobre sustratos que afecta identificación final a nivel de género especie.

Organismo	N.º de organismos	% de acuerdo tests múltiples	
		API	MINITEC
Clostridium species	58	92,0	85,0
Bacteroides species	84	95,5	95,8
Fusobacterium species	21	91,3	89,5
Cocos gram positivos	17	93,7	96,3
Bacilos gram positivos no formados de espora	17	90,4	89,8
Promedio total		92,6	91,3

estudio que en un número significativo de oportunidades, las pruebas repetidas del mismo organismo con ambos procedimientos no daba consistentemente los mismos resultados, debido a la variabilidad entre las reacciones de los sustratos. 197 aislados clínicos fueron evaluados con ambos métodos en lo que se refiere a la facilidad de lectura y reproductibilidad de resultados con el mismo organismo.

Los sustratos usados fueron los siguientes: Indol, Urea, Glucosa, Manitol, Lactosa, Sacarosa, Maltosa, Salicina, Xilosa, Arabinosa, H<sub>2</sub>S, Esculina, Glicerol, Celobiosa, Manosa, Rafinosa, Sorbitol, Raminosa, Trehalosa. La gelatina y la Melesitosa no estaban presentes en el API.

La Tabla 1 presenta los porcentajes de reproductibilidad obtenidos con pruebas repetidas del mismo organismo con un mínimo de tres veces en días diferentes. Poca diferencia fue observada entre ambos métodos. La reproductibilidad mostró ser buena en lo que se refiere a Bacteroides, pero menor en lo que se refiere a otros géneros de bacterias anaeróbicas. Los sustratos que más frecuentemente daban resultados variables con el método de API fueron el Indol, Xilosa, Esculina y Trealosa, y con el Minitec la Salicina, el H<sub>2</sub>S, la Esculina la Celobiosa, Rafinosa y Trehalosa habitualmente entregaron resultados variables. En ambos casos la variabilidad de estas reacciones afectaban la identificación final.

La Tabla 2 muestra el porcentaje de lecturas dudosas observadas con ambos sistemas. Estos datos indican que el sistema de API tiene un mayor grado de variabilidad, requiriendo que el observador efectúe una evaluación sobre la reacción en términos de positivo y negativo. En este aspecto, este problema estaba presente en prácticamen-

te todos los sustratos del sistema API. En el Minitec los sustratos más habitualmente involucrados en esta evaluación eran Indol, Manitol, Maltosa, Salicina, Xilosa, Arabinosa, Glicerol, Celobiosa, Sorbitol, Raminosa y Trehalosa.

Sólo en forma excepcional se utilizó el API y el Minitec en la identificación de cocos anaeróbicos y bacilos gram positivos no formadores de espora. Nuestro laboratorio ha eliminado la evaluación de estas bacterias anaeróbicas excepto en un pequeño número de casos debido a un muy bajo porcentaje de éxitos favorables.

Es por lo anterior que nuestros esfuerzos estuvieron orientados hacia los bacilos gram negativos anaerobios y a los clostridium.

Se hicieron intentos de identificar a 272 aislados clínicos de bacterias anaeróbicas usando cada uno de los dos sistemas para cada aislado. Los resultados de cada evaluación fueron interpretados a partir de las tablas de identificación entregadas con el sistema usado.

Los datos que se presentan en la Tabla 3 informan sobre el número de cepas de cada género y el porcentaje del cual obtuvo una identificación. API dio un porcentaje levemente superior de identificación a excepción del género fusobacterium en cuyo caso el sistema Minitec fue superior, debido básicamente a la reproductibilidad de su reacción de Indol.

La Tabla 4 muestra el porcentaje de incapacidad de los dos procedimientos para identificar bacterias anaeróbicas. El porcentaje de aislados identificados por uno u otro de ambos métodos se da en la columna de la derecha. Debe ser enfatizado que las cifras en esta columna no están orientadas a sugerir que uno u otro sistema dio la identificación correcta, sino que solamente dentro de

Tabla 2

Porcentaje de lecturas dudosas observadas con cada sistema con los siguientes grupos de anaerobios

Organismo	N.º de organismos	% de lectura dudosa	
		API	MINITEC
Clostridium species	58	4.8	3.9
Bacteroides species	84	4.5	2.2
Fusobacterium species	21	8.5	2.3
Cocos gram positivos	17	7.1	0.6
Antinomyces species	3	7.5	1.5
Eubacterium lentum	5	4.8	1.0
Promedio total		6.2	1.9

**Tabla 3**

Anaerobios identificados por API y Minitec

Organismo	N.º cepas		N.º cepas identificadas		% identificado	
	API	Minitec	API	Minitec	API	Minitec
Bacteroides species	194	194	118	112	61	58
Clostridium species	34	34	16	15	47	44
Fusobacterium species	16	16	1	8	6	50
Peptococcus species	9	9	3	3	33	33
Peptostreptococcus species	7	7	0	0	0	0
Anaerobios gram positivo no formadores de espora	10	10	0	0	0	0
Bacilos gram negativos no identificables.	2	2	0	0	0	0
% promedio identificado					51	51

**Tabla 4**

Capacidad de API y Minitec para identificar anaerobios

Organismos	N.º cepas	API Minitec en desacuerdo	API y Minitec		% identificado por cada sistema
			de acuerdo pero sin identificación	de acuerdo en identificación	
Bacteroides species	194	34	75	85	61
Fusobacterium species	16	8	5	3	69
Clostridium species	34	2	18	14	47
Peptococcus species	9	0	7	2	22
Peptostreptococcus species	7	0	7	0	0
Anaerobic, gram positive, non sporeforming bacilli	10	0	10	0	0
					54

**Tabla 5**

Porcentaje de Bacilos gram negativos y clostridium identificados con API

Género	N.º cepas	Cepas identificadas con:	
		Índice Inicial	Íntex analítico
Clostridium species	31	17 (54.8)	21 (67.6)
Bacteroides species	96	49 (51.0)	70 (72.9)
Fusobacterium species	5	2 (40.0)	3 (60.0)
Other	8	2 (25.0)	2 (25.0)
<b>Total</b>	<b>140</b>	<b>70 (50)</b>	<b>96 (68)</b>

este esquema de trabajo se logró una identificación.

Poco después de haber completado esta investigación, API ha entregado un índice de perfil analítico considerablemente ampliado. A la luz de esta nueva información nuestros resultados de 140 bacilos gram negativos y clostridium fueron

revaluados. La Tabla 5 muestra que el éxito favorable de la identificación mejoró aproximadamente en 18% sobre lo que habíamos obtenido previamente con el índice original: En detalle, 13% de mejoría para las especies de clostridium, un 22% en los bacteroides y aparentemente un 20% con los muy escasos fusobacterium estudiados.

## DISCUSION

Numerosos investigadores han evaluado test miniaturizados para la identificación de bacterias anaeróbicas.<sup>6, 14, 18, 20</sup> Muchos de los organismos usados en estos estudios eran anaerobios muy bien definidos y característicos, obtenidos de colecciones de los laboratorios.<sup>14, 18, 20</sup> La comparación de API Minitec y métodos convencionales a veces resultaba en más de un 90% de concordancia. Sin embargo, nuestra experiencia apunta a un mucho menor porcentaje de identificación, al nivel de especie, si se trabaja con muestras clínicas incógnitas enviadas al laboratorio para su identificación. Una revisión preliminar de nuestros resultados con el método de API de 568 aislados clínicos de bacilos gram negativos y clostridium mostraron un porcentaje de eficacia del orden del 50%. El índice analítico reciente del método de API parece ofrecer ciertas esperanzas en este aspecto, ya que parece proporcionar un mayor porcentaje de identificación a nivel de especie, a pesar de que algunos de estos aislados tienen gran porcentaje de variabilidad individual.

Evaluaciones de reproductibilidad han sido efectuadas con sistemas miniaturizados, diseñados básicamente para su uso con bacterias facultativas.<sup>2, 6, 11</sup> Estas evaluaciones también encontraron resultados diversos al reiterar las pruebas con el mismo aislado. Por ejemplo, en un estudio<sup>2</sup> sólo el 55% de los aislados dio reacciones idénticas en pruebas reiteradas con el método de API, pero se obtuvo un 97,9% de identificación a nivel de género especie, lo que se debe probablemente al mayor número de enterobacteriáceas involucradas. A la luz de estos datos, el 90% de reproductibilidad obtenido con bacterias anaeróbicas no es un problema considerable, sino uno debe basarse en tablas simplificadas de estos sistemas. Muchos desacuerdos en la identificación a nivel de especie fueron debidos a las lecturas dudosas de los distintos sustratos bioquímicos. Minitec tuvo un mejor rendimiento en este aspecto, lo que es probablemente atribuible a la mayor densidad microbiana ( $5 \times 10^9$ ) que requiere para su inóculo. Apoyando este planteamiento, la incubación anaeróbica no es necesaria tanto con el API como con el Minitec para identificar un bacteroides fragilis, lo que sugiere que a una determinada densidad bacteriana la actividad enzimática residual puede ser más importante que la multiplicación

microbiana, para la utilización de los sustratos. (16 datos no publicados).

Cuando los sustratos de API o del Minitec estaban en desacuerdo o cuando estaban de acuerdo en la identificación de un determinado aislado nos sentimos obligados a buscar una identificación inequívoca a través de métodos estandarizados o convencionales. Considerando las exigencias de un laboratorio clínico normal nuestro objetivo era simplemente determinar cuál de los 2 procedimientos más frecuentemente entregaba una identificación. Sólo el 50% de las bacterias anaeróbicas estudiadas fueron identificadas por uno u otro sistema y en el 16% de estos casos el API y el Minitec estaban en desacuerdo en su identificación.

No parece razonable esperar total acuerdo entre ambos métodos estudiados o con algún otro sistema empleado, dado que las condiciones de ensayo en cualquier procedimiento pueden diferir de aquellas usadas en otros.<sup>19</sup> De tal manera, reacciones bioquímicas idénticas obtenidas de un determinado organismo usando diferentes sistemas no parecen lógicas de esperar. Sin embargo, estos sistemas deben ser internamente reproductibles y sus tablas de identificación suficientemente completas como para permitir una identificación satisfactoria de la mayoría de las bacterias obtenidas de muestras adecuadas. El desacuerdo entre varios sistemas es un problema mayor en la comparación de resultados entre distintos laboratorios, pero pueden no ser serias sobre la base de un solo laboratorio si se usa el mismo procedimiento, en forma consistente, y los resultados son reproductibles. Este criterio no ha sido resuelto satisfactoriamente. Sin embargo, el nuevo índice analítico del API ha mejorado esta identificación a un aceptable 68%.

Algunos investigadores han argumentado que no es necesario identificar completamente todas las bacterias anaeróbicas. Sin embargo, este planteamiento es contrario a los fundamentos de una microbiología bien entendida.<sup>10</sup> Ya que existen numerosos tests y éstos pueden realizarse en cierto grado de flexibilidad, este argumento contrario a la identificación completa hasta el nivel de especie pierde gran parte de su significado.

En general nuestros resultados muestran que con algunas de las bacterias anaeróbicas más frecuentemente aisladas y de rápido crecimiento ambos tests son satisfactorios obteniendo ventaja el método de API debido a un nuevo índice analítico

co. Sin embargo, cada sistema mostró una menos que satisfactoria capacidad de identificar a aquellos anaerobios de lento crecimiento o exigentes o ambos. Esta diferencia probablemente tiene una relación directa con la incapacidad de estos organismos de lento crecimiento, para alcanzar una densidad de inóculo adecuada para la utilización óptima de los sustratos en cada sistema. Afortunadamente las bacterias anaeróbicas, para las que estos sistemas son apropiados, son aproximadamente el 50% de las bacterias de importancia clínica aisladas en un laboratorio de anaerobios.

#### REFERENCIAS

- <sup>1</sup> Blank, F.C. Identification of anaerobic bacteria. Letter to the editor. *Am. Soc. Microbiol. News* 42: 393-394, 1976.
- <sup>2</sup> Butler, D.A., C.M. Lobregat, and T.L. Cavan. Reproducibility of the Analytab (API 20 E) system. *J. Clin. Microbiol.* 2: 322-326, 1975.
- <sup>3</sup> Dowell, V.R., and T.M. Hawkins. Laboratory methods in anaerobic bacteriology. Center for Disease Control. Atlanta, Ga, 1974.
- <sup>4</sup> Finegold, S.W., J. Bartlett, A.W. Chow, O.J. Flora, S.L. Gorbach, E.J., Horder, and F.P. Tally. UCLA Conference. Management of anaerobic infections. *Ann. Intern Med.* 83: 375-389, 1975.
- <sup>5</sup> Gorbach, S.L., and J.G. Bartlett. Medical progress: anaerobic infections. *N. Engl. J. Med.* 290: 1177-1184-1237-1244, 1289-1294, 1974.
- <sup>6</sup> Hansen, S.L., and B.J. Stewart. Comparison of API and Minitek to Center for Disease Control methods for the biochemical characterization of anaerobes. *J. Clin. Microbiol.* 4: 227-231, 1976.
- <sup>7</sup> Hanson, C.W., and W.J. Martin. Evaluation of enrichment, storage, and age of blood agar medium in relation to its ability to support growth of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 4: 394-399, 1976.
- <sup>8</sup> Hanson, C.W., F. Marso, and W.J. Martin. Comparison of the Minitek test system with a conventional screening procedure for identification of Enterobacteriaceae. *Health Lab. Science.* 15: 3-8, 1978.
- <sup>9</sup> Holdeman, L.V., E.P. Cato and W.E.C. Moore. Anaerobic bacteriology manual. Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Va, 1977.
- <sup>10</sup> Holdeman, L.V. Identification of clinical bacteria. Letter to the editor. *Am. Soc. Microbiol. News* 42: 264-265, 1976.
- <sup>11</sup> Holmes, B., W.R. Wilcox, S.P. La Page, and H. Malnick. Test reproducibility of the API (20 E), Enterotube, and Pathotek systems. *J. Clin. Pathol.* 30: 381-387, 1977.
- <sup>12</sup> Martin, W.J. Practical method for isolation of anaerobic bacteria in the clinical laboratory. *Appl. Microbiol.* 22: 1168-1171, 1971.
- <sup>13</sup> Martin, W.J. Isolation and identification of anaerobic bacteria in the clinical laboratory. *Mayo Clin. Proc.* 49: 300-308, 1974.
- <sup>14</sup> Moore, H.B., V.L. Sutter, and S.M. Finegold. Comparison of three methods for biochemical testing of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1: 13-24, 1975.
- <sup>15</sup> Porschen, R.K., and D.R. Stalons. Evaluation of simplified dichotomous schemata for the identification of anaerobic bacteria from clinical material. *J. Clin. Microbiol.* 3: 161-171, 1976.
- <sup>16</sup> Schreckenberger, P.C., and D.J. Blazevic. Rapid fermentation testing of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 3: 313-317, 1976.
- <sup>17</sup> Stalons, D.R., and H.K. Porschen. Identification of anaerobic bacteria. Letter to the editor. *Am. Soc. Microbiol. News* 42: 393, 1976.
- <sup>18</sup> Stargel, M.D., F.S. Thompson, S.E. Phillips, C.L. Lombard, and V.R. Dowell, Jr. Modification of the Minitek miniaturized differentiation system for characterization of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 3: 291-301, 1976.
- <sup>19</sup> Stargel, M., D.C.L. Lombard, and V.R. Dowell. Alternative procedures for identification of anaerobic-bacteria. *Am. J. Med. Technol.* 44: 709-722, 1978.
- <sup>20</sup> Starr, S.E., F.S. Thompson, V.R., Dowell, Jr., and A. Balows. Micromethod system for identification of anaerobic bacteria. *App. Microbiol.* 25: 713-717, 1973.