



Bakterie beztlenowe nadal wyzwaniem dla współczesnej medycznej diagnostyki mikrobiologicznej

Anaerobic bacteria as a challenge for modern medical microbiological diagnostics

Marta Kierzkowska^{1, D, F}, Anna Majewska^{1, A–F}, Grażyna Młynarczyk^{1, F}

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Polska

A – Koncepcja i projekt badania, B – Gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – Analiza i interpretacja danych, D – Napisanie artykułu, E – Krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Kierzkowska M, Majewska A, Młynarczyk G. Bakterie beztlenowe nadal wyzwaniem dla współczesnej medycznej diagnostyki mikrobiologicznej. Med Og Nauk Zdr. 2020; 26(4): 360–365. doi: 10.26444/monz/125901

■ Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy. Bakterie beztlenowe są składnikiem naturalnego mikrobiomu człowieka. Wiele z nich charakteryzuje się niską patogennością, ale mogą powodować zakażenia oportunistyczne i zakażenia mieszane. Niektóre gatunki są bezwzględnie patogenne. Celem pracy jest ukazanie problemów, które pojawiają się na każdym etapie badania mikrobiologicznego z udziałem bakterii beztlenowych.

Opis stanu wiedzy. Nader często, ze względu na trudności techniczne i koszt badania, diagnostyka mikrobiologiczna w kierunku bakterii beztlenowych prowadzona jest w stosunkowo nielicznych laboratoriach mikrobiologicznych. Pomijanie tych bakterii w rutynowym badaniu mikrobiologicznym wpływa na niedoszacowanie ich udziału w etiologii zakażeń oraz uniemożliwia monitorowanie oporności na antybiotyki. Szczególnie często wśród beztlenowców izolowane są szczepy odporne na klindamycynę, antybiotyki beta-laktamowe skojarzone z inhibitorem beta-laktamaz, pojawiają się także izolaty odporne na karbapenemy. Problem oporności dotyczy głównie beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych.

Podsumowanie. Właściwa procedura badania – od etapu kwalifikacji próbki do interpretacji otrzymanego wyniku – wpływa na wiarygodność wyniku. Mikrobiologiczne oznaczanie lekowrażliwości bakterii beztlenowych umożliwia śledzenie zmian lekooporności tej grupy bakterii, ustalanie zasad terapii empirycznej i kreowanie właściwej polityki antybiotykowej w szpitalu.

Słowa kluczowe

bakterie beztlenowe, e-test, hodowla beztlenowców, MALDI-TOF MS

■ Abstract

Introduction and objective. Anaerobic bacteria are a component of the human microbiome. Many of them are characterized by low pathogenicity, but some may cause opportunistic and polybacterial infections. Some species are absolutely pathogenic. The aim of the study is to show the problems that may appear at any stage of microbiological testing with the participation of anaerobic bacteria.

State of knowledge. Due to technical difficulties and the cost of the test, microbiological diagnostics of anaerobic bacteria is usually carried out in only a few microbial laboratories. The skipping of diagnoses of these bacteria in routine microbiological testing results in an underestimation of their involvement in the etiology of infections, and makes the monitoring of antibiotic resistance impossible. Among anaerobes strains resistant to clindamycin, beta-lactam antibiotics combined with a beta-lactamase inhibitor and carbapenems, are especially often isolated. The problem of resistance mainly concerns anaerobic Gram-negative rods.

Conclusion. The appropriate procedure, from the stage of sample qualification to the interpretation of the obtained outcome, exerts an effect on the reliability of the result, and significantly reduces the cost associated with the isolation and identification of anaerobic bacteria. Microbiological determination of drug susceptibility of anaerobic bacteria also allows assessment of resistance trends, establishing the principles of empirical therapy, and the creation of appropriate antibiotic policy in the hospital.

Key words

anaerobic bacteria, E-test, anaerobic culture, MALDI-TOF MS

WPROWADZENIE I CEL PRACY

Bakterie beztlenowe po raz pierwszy zostały opisane na początku lat 60. XIX wieku przez, pracującego nad procesami fermentacji Ludwika Pasteura, który określił je jako

anaérobies. Możliwości poznawania beztlenowców były wówczas istotnie ograniczone. Brak odpowiednich pożywek oraz trudności w zapewnieniu atmosfery pozbawionej tlenu uniemożliwiały izolację beztlenowców. Procedury laboratoryjne ukierunkowane na bakterie beztlenowe były stopniowo udoskonalane. Nadal jednak są pracochłonne i kosztowne, często więc pomijane w rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, co ostatecznie wpływa na niedoszacowanie udziału tych bakterii w etiologii zakażeń. Pomimo że niektóre beztlenowce uznaje się za mało patogenne, w sprzyjających

Adres do korespondencji: Anna Majewska, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Chałubińskiego 5, 02–004, Warszawa, Polska e-mail: amajewska@wum.edu.pl

Nadesłano: 3.04.2020; zaakceptowano do publikacji: 31.07.2020; publikacja online: 31.08.2020

warunkach mogą powodować zróżnicowane zakażenia głównie endogenne, ale także egzogenne w obrębie różnych tkanek i narządów (tab. 1).

Celem pracy jest ukazanie problemów związanych z laboratoryjną diagnostyką zakażeń z udziałem bakterii beztlenowych.

Tabela 1. Chorobotwórczość najistotniejszych klinicznie bakterii beztlenowych [1–4]

Rodzaj/gatunek	Zakażenia/choroby u ludzi
Pałeczki Gram-dodatnie	
<i>Actinomyces</i> spp.	promienica (szyjno-twarzowa, płucna, brzuszna, w obrębie miednicy, OUN), zapalenie kości, zapalenie szpiku, ropnie mózgu, zapalenie wsierdzia, zakażenie skóry
<i>Cutibacterium acnes</i>	trądzik, zakażenia u pacjentów ze sztucznymi implantami (zastawki, protezy kostne, cewniki), zakażenie kanalików łzowych
<i>Pseudopropionibacterium propionicum</i>	zakażenie skóry i jamy ustnej, zakażenie promieniczopodobne
<i>Mobiluncus</i> spp.	bakteryjna waginoza, zakażenia oportunistyczne
<i>Lactobacillus</i> spp.	zapalenie wsierdzia, bakteriemia
<i>Eubacterium</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.	niska wirulencja, zakażenia oportunistyczne
Pałeczki Gram-ujemne	
<i>Bacteroides</i> spp., <i>Parabacteroides</i> spp.	ropne zakażenia w obrębie jamy brzusznej (ropnie wątroby, trzustki, nerki, zapalenie dróg żółciowych, zapalenie wyrostka robaczkowego), zakażenia w ginekologii (zapalenie błony śluzowej macicy, ropień jajnika i jajowodu), ropień mózgu, zakażenie ucha środkowego, zapalenie zatok, ropień płuca, aspiracyjne zapalenie płuc, ropniak opłucnej, ropień okołolicy okołoodbytniczej, pourazowe zapalenie kości, szpiku i tkanek miękkich, bakteriemia, zakażenie rany, zapalenie żołądka i jelit (szczepy enterotoksyczne <i>B. fragilis</i>)
<i>Fusobacterium</i> spp.	zapalenie przyzębia, zgorzelinowe zapalenie jamy ustnej, zespół Lemierre'a, udział w anginie Plautau-Vincenta, ropień okołomigdałkowy, ropień płuc, mózgu, narządów miednicy małej, bakteriemia
<i>Prevotella</i> spp.	biofilm w postaci płytki nazębnej, choroby przyzębia ostre i przewlekłe zapalenie zatok, ropień (okołomigdałkowy, mózgu, w tkance płucnej), ostre i przewlekłe zapalenie zatok, zachyłkowe zapalenie płuc, zapalenie narządów miednicy małej, bakteriemia, septyczne zapalenie stawów, zapalenie wsierdzia, ZOMR, krwiopochodne zapalenie kości i stawów, zakażenie rany po pogryzieniu przez człowieka lub zwierzę
<i>Porphyromonas</i>	płytką nazębną, zapalenie przyzębia
Ziarenkowce Gram-dodatnie	
<i>Fingoldia magna</i> , <i>Parvimonas micra</i> , <i>Peptococcus</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp., <i>Anaerococcus</i> spp., <i>Peptoniphilus</i> spp., <i>Schleiferella</i> spp.	zakażenia oportunistyczne, głównie zakażenie tkanek miękkich, ran, kości, stawów, zakażenia związane z obecnością endoprotez, zakażenia stomatologiczne, zapalenie zatok, płuc, opłucnej, w obrębie dróg płciowych (zapalenie błony śluzowej macicy, ropień jajnika), ropnie wątroby
Ziarenkowce Gram-ujemne	
<i>Veillonella</i> spp.	niski potencjał chorobotwórczy, rzadko: zapalenie płuc, septyczne zapalenie zatok, mózgu
Laseczki	
<i>Clostridioides difficile</i>	biegunka, niedrożność jelit, <i>megacolon toxicum</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	zgorzel gazowa, zatrucie pokarmowe, bakteriemia (pochodzenia endogennego), martwicze zapalenie jelita cienkiego (typ C), biegunka poantybiotykowa
<i>Clostridium tetani</i>	porażenie spastyczne (tężec miejscowy, uogólniony)
<i>Clostridium botulinum</i>	porażenie wiotkie (botulizm)

Źródło: [1–4]

OPIS STANU WIEDZY

W ostatnich latach bakterie beztlenowe związane z człowiekiem budzą coraz większe zainteresowanie. Postęp w dziedzinie biotechnologii i rozwój technik diagnostycznych, głównie molekularnych, umożliwiają precyzyjną identyfikację drobnoustrojów wyizolowanych z zakażeń. Coraz więcej uwagi skupia również komensalna i symbiotyczna mikrobiota beztlenowa człowieka, jej udział w patogenezie zakażeń oraz w zachowaniu zdrowia. Dzięki opracowaniu nowych metod mikrobiologicznych zidentyfikowane są nieznane dotąd gatunki beztlenowców oraz dokonywane są zmiany w ich klasyfikacji taksonomicznej. Wcześniejsze podziały taksonomiczne opierano na konwencjonalnych metodach identyfikacji, tj. morfologii kolonii, obrazie mikroskopowym, wynikach testów biochemicznych. Obecnie za najlepsze narzędzie filogenetyczne uważana jest analiza całego genomu lub sekwencji kodujących 16S rRNA [5]. Zainteresowanie bakteriami rosnącymi w warunkach beztlenowych uzasadnia także obserwowany od początku XXI wieku wzrost odsetka izolatów opornych na antybiotyki [3]. Dotyczy to szczególnie antybiotyków beta-laktamowych skojarzonych z inhibitorem beta-laktamaz, karbapenemów i klindamycyny wśród pałeczek *Bacteroides* i *Parabacteroides* [3, 6–8], antybiotyków beta-laktamowych u pałeczek *Prevotella* oraz klindamycyny u beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich [9]. Monitorowania wymaga również wrażliwość na metronidazol izolatów *Clostridioides difficile* oraz *Bacteroides* spp. i *Parabacteroides* spp. [3].

Celem badania mikrobiologicznego jest izolacja i identyfikacja drobnoustroju z oceną wrażliwości szczepu bakterii na antybiotyki, co jest podstawą podejmowania decyzji terapeutycznych i ewentualnej korekty terapii empirycznej. Postępowanie to umożliwia także monitorowanie lekooporności patogenów wywołujących zakażenia pacjentów hospitalizowanych w danym oddziale lub ogólnie w szpitalu.

Bakterie beztlenowe mogą być izolowane z różnych materiałów klinicznych. Wiarygodność wyniku istotnie zależy od czynności przedlaboratoryjnych, tj. doboru próbki do badania, jej właściwego pobrania oraz zabezpieczenia podczas transportu do laboratorium. Ponadto wyzwaniem jest wymagająca doświadczenia interpretacja wyniku badania, zwłaszcza w przypadku izolacji wielu gatunków bakterii z miejsca zakażenia czy podejrzenia, że próbka została skontaminowana bakteriami rezydującymi w miejscu zakażenia [3, 9]. Dobór materiału diagnostycznego zależy od miejsca toczącego się procesu chorobowego. Mogą to być fizjologicznie jałowe płyny z jam ciała (płyn otrzewnowy, płyn z opłucnej, płyn stawowy), fragmenty tkanek oraz materiały pobrane za pomocą głębokiej aspiracji lub biopsji.

W wielu przypadkach pobranie takiej próbki wymaga zastosowania procedur chirurgicznych. Wymazy pobrane za pomocą wymazówki nie są zalecane, ale akceptowane w przypadku ran na skórze, np. po ugryzieniu. Ograniczona przydatność wymazów może wynikać z niewystarczającej objętości materiału oraz ryzyka zanieczyszczenia próbki bakteriami kolonizującymi powierzchnię skóry [3]. W tab. 2 zestawiono materiały do badań pod kątem bakterii beztlenowych wraz z ich klasyfikacją.

Opracowanie próbek klinicznych pod kątem obecności bakterii beztlenowych obejmuje kilka etapów. Po otrzymaniu materiału istotna jest makroskopowa ocena wyglądu próbki (kolor, obecność gazu, krwi) oraz zapachu. Kolejne etapy to

Tabela 2. Kategoryzacja materiałów do badań ukierunkowanych na bakterie beztlenowe

Kategoria A	
Materiały, z których mogą być z dużym prawdopodobieństwem hodowane wywołujące zakażenia bakterie beztlenowe	
Kategoria A1	
próbki materiałów pobrane z miejsc fizjologicznie jałowych (minimalna szansa kontaminacji mikrobiotą podczas pobrania)	zółć, krew, płyn jam ciała (biopsja, np. jamy stawowej, opłucnej, osierdzia), płyn mózgowo-rdzeniowy, szpik kostny, treść z ropnia mózgu, aspirat przezskórnej biopsji płuc, materiał pobrany śródoperacyjnie, płyn z ciała szklistego, punktat z jamy owodniowej
Kategoria A2	
próbki materiałów pobrane z miejsc, w których występują warunki beztlenowe (istnieje ryzyko zanieczyszczenia bakteriami rezydującymi w miejscu pobrania)	mocz pobrany przez nakłucie pęcherza moczowego, próbka z bronchoskopii z zastosowaniem fiberoskopu, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (konieczne badanie ilościowe), próbka pobrana poprzez przezskórną aspirację przetchnawiczą lub nakłucie płuca, płyn pobrany drogą punkcji narządów w miednicy (np. kuldocenteza), próbki z głębokich przetok, fragmenty tkanek miękkich (wątroba, śledziona, płuco, powięź, serce, kości, endometrium)
Kategoria A3	
próbki materiałów pobrane z miejsc z naturalnie występującą mikrobiotą (zawsze kontaminacja bakteriami rezydującymi w miejscu pobrania)	próbki ze śluzówki jamy ustnej, skóry: płyny pobrane przez nakłucie i aspirację ropnia w jamie ustnej, przewodzie słuchowym, nosie, gardle, płyn pobrany przez nakłucie jamy brzusznej (płyn z jamy otrzewnowej, zółć), płyn drenażowy
Kategoria B	
Materiały, które ze względu na lokalizację lub sposób pobrania charakteryzują się niskim prawdopodobieństwem izolowania bakterii beztlenowych oraz wysokim ryzykiem skontaminowania bakteriami tlenowymi	wymazy ran i owrzodzeń skóry (względna przydatność diagnostyczna i tylko jeśli pobrane zostały z podstawy zmiany po usunięciu zanieczyszczeń na jej powierzchni), niewłaściwe w odniesieniu do diagnostyki ukierunkowanej na bakterie beztlenowe są: wymazy z górnych dróg oddechowych (wyjątek stanowi zespół Lemierre'a), plwocina, wymaz z pochwy i szyjki macicy (wyjątek – bakteryjna waginoza), mocz pobrany przez cewnik, końcówka cewnika naczyniowego, treść jelita (także z kolostomii, ileostomii), materiał z drenażu przetoki

Źródło: [3, 9, 10].

ocena preparatu bezpośredniego barwionego metodą Grama, następnie posiew na podłoża płynne i stałe przeznaczone dla beztlenowców.

Bakterie beztlenowe charakteryzują się zróżnicowaną tolerancją na tlen i toksyczne formy tlenu (tj. nadtlenek wodoru, anion nadtlenkowy [O₂-], rodnik hydroksylowy OH* i tlen singletowy O₂*). Jest to związane ze zdolnością bakterii do syntezy enzymów (dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza) wymaganych do ich eliminacji [9]. Pałeczki z grupy *B. fragilis* oraz laseczki *Clostridium perfringens* i *C. septicum* tolerują stężenie 2–8% tlenu [3]. Wysoce aerotolerancyjnym gatunkiem jest *C. tertium* [11]. Bezwzględnych warunków beztlenowych (< 0,5% O₂) wymaga *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* oraz *C. sporogenes* [12]. Hodowla bakterii beztlenowych w warunkach laboratoryjnych prowadzona jest w temperaturze 37°C. Większość chorobotwórczych dla człowieka gatunków wymaga 48-godzinnej inkubacji *in vitro*. Laseczki *C. perfringens* oraz niektóre pałeczki z rodzaju *Bacteroides* wyrastają już po 24 godzinach hodowli. Bakterie wolniej rosnące to promieniowiec *Actinomyces israelii* oraz rzadki uropatogen, izolowany głównie od pacjentów z nefropatią zaporową *Actinotignum* (dawniej *Actinobaculum*) *schaalii*; kolonie pojawiają się po 7–14 dniach inkubacji [3, 13, 14]. Współcześnie inkubacja bakterii rosnących beztlenowo może odbywać się w anaerostatach wykonanych ze stali nierdzewnej lub poliwęglanu. Powietrze wypompowywane

jest z pojemnika manualnie lub automatycznie przy użyciu pompy membranowej, względnie zastępowane mieszaniną gazów. Atmosfera beztlenowa może być również generowana chemicznie za pomocą związków w postaci zredukowanej (dostępne na rynku, np. GAS-Pack-Kit, Genbag anaer, AnaeroGen). Mieszanka odtleniająca zawiera np. 0,5 g pyrogallolu, 0,25 g węgla potasu, 1 g ziemi okrzemkowej i generuje atmosferę o składzie 85% N₂, 10% H₂ oraz 5% CO₂ [3, 9, 15]. Kosztownym, ale wygodnym rozwiązaniem są komory anaerobowe (typu *glove box*), które umożliwiają stałe utrzymanie warunków beztlenowych od momentu inokulacji na podłoża hodowlane. Wydajność wszelkich systemów generujących atmosferę beztlenową powinna być systematycznie kontrolowana, np. z wykorzystaniem pasków wskaźnikowych (impregnowanych błękitem metylenowym lub resazuryną) [3].

W toku badania mikrobiologicznego należy poprowadzić hodowlę bakterii na wzbogaconych podłożach w atmosferze beztlenowej oraz kontrolnie na agarze z krwią w atmosferze tlenowej (test aerotolerancji) [2].

Beztlenowce rosną na pożywkach bakteriologicznych, które zawierają heminę (czynnik X) i krew. Są one źródłem hemu, niezbędnego do podziałów komórek bakterii. Suplementacja witaminą K stymuluje wzrost bakterii. Beztlenowce wymagają niskiego potencjału oksydoredukcyjnego, dlatego do hodowli używane są podłoża, których potencjał redox został obniżony, np. przez dodanie tioglikolanu lub kwasu askorbinowego [2]. W rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej używane są: podłoże Schaedler agar z 5% krwią baranią i witaminą K1, podłoże Wilkina-Chalgrena z 5% krwią baranią i witaminą K3, agar Columbia z dodatkiem krwi baraniej oraz podłoże Brucella agar z 10% krwią końską [2, 3, 9]. Do hodowli laseczek *C. difficile* stosuje się podłoże z krwią oraz cykloseryną, cefoksytyną i amfoterycyną B, a także dostępne na rynku podłoża chromogenne [3, 9]. Zastosowanie w diagnostyce laboratoryjnej znalazły także podłoża wybiórcze, pozwalające na izolowanie Gram-ujemnych pałeczek beztlenowych bezpośrednio z materiału klinicznego. Do izolacji pałeczek z grupy *B. fragilis* i *Bilophila wadsworthia* wykorzystuje się podłoże BBE (*Bacteroides* Bile Esculin, z żółcią, eskuliną i gentamicyną). Wyhodowanie bakterii umożliwia ocenę morfologii kolonii. Niektóre pałeczki z rodzajów *Prevotella* i *Porphyromonas* (ryc. 1) mają zdolność wytwarzania specyficznego dla nich barwnika wskutek asymilowania hemoglobiny z krwi zawartej w podłożu i konwertowania jej do protoheminy, która powoduje ciemnobrązowe lub czarne zabarwienie kolonii po kilkudniowej inkubacji. Cechą diagnostyczną jest również fluorescencja młodych kolonii w świetle lampy UV emitującej światło o długości 366 nm o barwie czerwonej (niektóre gatunki *Prevotella* i *Porphyromonas*) lub żółto-zielonej (*C. difficile*) [2]. Podłoża płynne stosowane do namnażania beztlenowców to bulion BHI (bulion mózgowo-sercowy) oraz bulion tioglikolanowy; bakterie rosną w nich w postaci zmętnienia z widocznym osadem na dnie probówki.

W diagnostyce zakażeń beztlenowcami dużą rolę odgrywa bezpośredni preparat mikroskopowy. Ocena mikroskopowa materiału klinicznego w przypadku aktinomykozy ma wyższą czułość diagnostyczną w porównaniu z metodą hodowli. Jest również niezbędna w szybkim rozpoznaniu zgorzeli gazowej lub zakażenia płynu stawowego [3]. Barwienie rozmazu metodą Schaeffera-Fultona lub Trujillo może być częścią diagnostyki zakażeń wywołanych przez

laseczki z rodzaju *Clostridium*; umożliwia obserwację charakterystycznie umiejscowionych, odkształcających komórki endospor [16]. Preparat mikroskopu barwiony metodą Grama wykonywany jest również z hodowli bakteryjnych na podłożach bakteriologicznych. W przeszłości obligatoryjnie stanowił on uzupełnienie testów fenotypowych. Niektóre beztlenowce mają charakterystyczny dla gatunku/rodzaju morfotyp, np. pałeczki *Bacteroides* barwią się Gram-ujemnie, ale nieregularnie (wygląd agrafki); ponadto przyjmują polimorficzne kształty: formy wydłużone, z rozszerzonym środkiem lub nitkowate czy niemal kuliste. Wrzecionowce *Fusobacterium* to Gram-ujemne, wydłużone komórki o zaostrzonych końcach; bakterie te mogą również przyjmować kształt pałeczkowaty, kokoidalny lub nitkowaty. Krótkie pałeczki wybarwione Gram-ujemnie mogą reprezentować gatunki należące do rodzajów *Prevotella* lub *Porphyromonas*. Wykorzystywane jest również barwienie negatywne ukazujące otoczkę (np. *C. perfringens*) wg metody Burri-Ginsa [2].

W przeszłości beztlenowce identyfikowano metodą chromatografii gazowo-cieczowej (GLC), która została po raz pierwszy zastosowana pod koniec lat 60. XX wieku do celów taksonomicznych. Metoda ta umożliwiała detekcję kwasów tłuszczowych, np.: kwasu octowego, propionowego, masłowego, izomasłowego, walerianowego, izowalerianowego, izokapronowego, oraz alkoholu wytwarzanych przez bakterie beztlenowe w procesie oddychania. Chromatografia gazowo-cieczowa sprawdziła się głównie w określaniu przynależności gatunkowej Gram-ujemnych pałeczek beztlenowych. Głównym produktem metabolicznym fermentacji cukrów gatunków należących do grupy *B. fragilis* jest kwas octowy, a także propionowy i masłowy. Gatunki *Veillonella* wytwarzają kwas octowy i propionowy, pałeczki *Prevotella* mają zdolność fermentowania węglowodanów, produkują z glukozy kwas octowy i bursztynowy. Gram-dodatnie ziarenkowce oraz *Clostridia* wytwarzają kwas octowy i masłowy [1, 17, 18]. GLC okazała się jednak badaniem czasochłonnym i kosztownym, wobec tego poszukiwano innych rozwiązań. Odpowiedzią na zapotrzebowanie w laboratoriach było wprowadzenie do rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej komercyjnych testów fenotypowych analizujących właściwości biochemiczne (proteolityczne i sacharolityczne) bakterii beztlenowych. Przykładem takich testów były testy API 20A (bioMérieux) oraz RapID-ANA II (Innovative Diagnostic Systems) [1, 19, 20]. W kolejnych latach zautomatyzowano proces diagnostyczny. Nadal porównywano właściwości biochemiczne bakterii z bazą wzorcową, tym razem wykorzystując system VITEK[®]2 (bioMérieux), który oprócz beztlenowców identyfikuje także maczugowce. Badanie wymaga wykonania barwienia izolatu metodą Grama oraz testu aerotolerancji. Niedoskonałością systemu jest rozpoznawanie tylko najistotniejszych klinicznie gatunków [20, 21]. Własne spostrzeżenia oraz badania przeprowadzone przez innych autorów wykazały, że system ten część gatunków identyfikuje nieprecyzyjnie (np. *B. stercoris* zamiast *B. thetaiotaomicron*, oznacza izolaty np. jako *B. thetaiotaomicron*/*B. caccae*, zalecając zastosowanie dodatkowych testów różnicujących) lub identyfikuje bakterie jedynie do poziomu rodzaju (*Bifidobacterium* spp. i *Veillonella* spp.) [22, 23]. Czas wykonania identyfikacji wynosi ok. 6–8 godzin. Testy określające właściwości biochemiczne wymagają zawiesiny o dużej gęstości (2,7–3,3 McFarlanda) izolatu z jednorodnej, świeżej hodowli [21, 22].

Współcześnie w laboratoryjnej diagnostyce zakażeń beztlenowcami coraz chętniej korzysta się z metod innych niż

analizy fenotypowe. Innowacją ostatnich kilkunastu lat jest spektrometria masowa, która umożliwia identyfikację drobnoustrojów na podstawie analizy białek rybosomalnych. Obecnie technika analityczna MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry*) dostępna jest w systemie MALDI Biolyser (Bruker Daltonics) oraz VITEK MS (bioMérieux) [3, 22, 24, 25]. Identyfikacja opiera się na jonizacji laserowej białek rybosomalnych, które pod wpływem promieni lasera ulegają desorpcji i jonizacji. Zjonizowane peptydy przyspieszane są w polu elektrycznym, ulegają rozdziałowi wg masy cząsteczkowej, ładunku oraz odmiennego czasu przelotu. Oprogramowanie porównuje uzyskane podczas analizy widmo z wagami wierzchołków zdefiniowanymi dla każdego z gatunków. Obliczane jest prawdopodobieństwo, które odzwierciedla podobieństwo pomiędzy badanym drobnoustrojem a mikroorganizmem znajdującym się w bazie danych. Spektrometria masowa oferuje skrócenie czasu badania mikrobiologicznego w porównaniu z klasycznymi metodami fenotypowymi. Badanie pojedynczego izolatu trwa kilka minut. Procedura zakłada wykorzystanie jednej kolonii (10^5 CFU) badanego drobnoustroju [3, 24, 26, 27]. W przypadku bardzo drobnych kolonii (np. ziarenkowce Gram-dodatnie i Gram-ujemne) nie jest to możliwe; do badania należy pobrać kilka kolonii. Bazy widm obu systemów MALDI umożliwiają rozpoznanie gatunków, które mają obecnie nową pozycję systematyczną i nie są uwzględnione w automatycznych i półautomatycznych systemach biochemicznych [24, 25, 28]. Obecnie złotym standardem identyfikacji jest metoda oparta na analizie sekwencji gatunkowo swoistego genu kodującego podjednostkę 16S rRNA. Gen ten występuje u wszystkich bakterii, jest wysoce konserwatywny, jednak zawiera gatunkowo zmienne regiony, umożliwiające różnicowanie pomiędzy rodzajami i gatunkami drobnoustrojów. Metoda 16S rRNA pozwala na dokonanie właściwej identyfikacji, a także na szybkie rozpoznanie i klasyfikację wcześniej nieopisanych drobnoustrojów. Na ogół metoda ta nie jest używana w klinicznych laboratoriach mikrobiologicznych, analizy z jej zastosowaniem zwykle wykonywane są w celach naukowych [3].

Interpretacja uzyskanych w toku badania mikrobiologicznego wyników wymaga doświadczenia i powinna uwzględniać możliwą kontaminację próbki mikrobiotą występującą w miejscu zakażenia lub w jego pobliżu oraz udział kilku patogenów w etiologii zakażenia [10]. Zakażenia mieszane, czyli powodowane przez dwa lub więcej gatunki wyłącznie bakterii beztlenowych lub bakterie beztlenowa razem z gatunkami tlenowymi, to najczęściej zakażenia wewnątrz jamy brzusznej, położniczo-ginekologiczne, zakażenia stopy cukrzycowej, przewlekłe zapalenie zatok, ucha środkowego, angina Ludwiga, ropnie przyzębia. W zakażeniach mieszanych bakteriom beztlenowym najczęściej towarzyszą tlenowe pałeczki Gram-ujemne (*E. coli*, *K. pneumoniae*) oraz ziarenkowce Gram-dodatnie (*S. aureus*, ziarenkowce koagulaz-ujemne, *Enterococcus faecalis*), rzadziej występują paciorkowce oraz inne pałeczki Gram-ujemne (*Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Proteus vulgaris* i *Serratia marcescens*) [29]. Precyzyjna ocena takich zakażeń jest istotna ze względu na szczególne następstwa wynikające z możliwości wymiany informacji genetycznej pomiędzy gatunkami tlenowymi i beztlenowymi, a tym samym ich większą zjadliwość i oporność na antybiotyki. Oznaczenie lekowrażliwości jest niezbędne w przypadku wyhodowania

szczepu bakterii beztlenowej z miejsc fizjologicznie jałowych lub/i od pacjenta z zakażeniem inwazyjnym (bakteriemia, zapalenie wsierdzia, zapalenie kości, szpiku i stawów, ropień mózgu). W oznaczaniu wrażliwości bakterii beztlenowych na antybiotyki stosowane są metody fenotypowe wymagające wyhodowania szczepu. Należy zastosować metody ilościowe określające MIC antybiotyku, tj. minimalne stężenie hamujące wzrost szczepu wyrażone w mg/L. Oznaczenie to można wykonać za pomocą metody seryjnych rozcieńczeń antybiotyku w podłożu płynnym lub stałym albo metody gradientowo-dyfuzyjnej z zastosowaniem pasków e-test nasączonych antybiotykiem w gradiencie stężeń.

Obie metody pozwalają na zakwalifikowanie szczepu do kategorii wrażliwy lub oporny na podstawie wartości granicznych. Badanie gradientowo-dyfuzyjne ze względu na mniejszą czasochłonność jest częściej stosowane w rutynowej pracy. Rekomendacje doboru antybiotyków dla bakterii beztlenowych oraz wartości graniczne MIC zawarte są w rekomendacjach EUCAST [29].

Z uwagi na narastającą oporność beztlenowców na antybiotyki wskazane jest rutynowe monitorowanie lekowrażliwości i stosowanie terapii celowanej na podstawie wyniku antybiogramu. Obecnie największym problemem jest oporność *Bacteroides* spp. na klindamycynę. Monitorując od ponad dekady lekowrażliwość u tych bakterii, potwierdziliśmy obserwację ośrodków na świecie; ok. 40% klinicznych izolatów *Bacteroides* spp. jest oporna na ten antybiotyk [3, 30]. Problemem jest wzrost oporności również na inne antybiotyki. np. amoksycylinę z kwasem klawulanowym (średnio 2,83% w okresie 2007–2012 vs 8,15% w okresie 2013–2017 w jednym z klinicznych szpitali w Warszawie) oraz na imipenem (1,41% vs 3,7% w tym samym okresie) [30]. Odnotowano również stosunkowo niski (poniżej 2%), ale w niektórych ośrodkach stały i zróżnicowany geograficznie wzrost oporności u *Bacteroides* spp. na metronidazol [3, 30].

PODSUMOWANIE

Bakterie beztlenowe są składnikiem mikrobioty, ale wiele gatunków pełni istotną rolę w patogenezie zakażeń u ludzi. Z tego względu, mając na uwadze problem narastającej bakteryjnej oporności na antybiotyki, należy stworzyć w laboratorium mikrobiologicznym warunki do właściwej identyfikacji tych bakterii oraz monitorowania ich wrażliwości na antybiotyki. Należy mieć na uwadze, że uzyskanie wiarygodnego wyniku oraz redukcja kosztów badania istotnie zależą od procedur zapewniających właściwe postępowanie na etapie przedlaboratoryjnym badania, gdzie najistotniejsze jest pobranie odpowiedniej próbki materiału klinicznego w sposób ograniczający jej kontaminację bakteriami rezydującymi na skórze i błonach śluzowych, a następnie przekazanie jej do laboratorium w ściśle określonych warunkach (czas, temperatura).

PIŚMIENNICTWO

- Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A, Młynarczyk G. Beztlenowe ziarenkowce Gram-dodatnie (GPAC) – diagnostyka i znaczenie kliniczne. *Post Microbiol.* 2014; 53: 35–42.
- Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A, Młynarczyk G. Pałeczki Gram-ujemne beztlenowo rosnące – diagnostyka i znaczenie kliniczne. *Post Microbiol.* 2016; 55: 91–98.
- Nagy E, Boyanova L, Justesen U. ESCMID Study Group of Anaerobic Infections. How to isolate, identify and determine antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in routine laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 11: 1139–1148.
- Shenoy PA, Vishwanath S, Gawda A, Shetty S, Anegundi R, Varma M, et al. Anaerobic bacteria in clinical specimens – frequent, but a neglected lot: A five year experience at a Tertiary Care Hospital. *Clin Diagn Res.* 2017; 11: 44–48.
- Scholz CFP, Kilian M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016; 66: 4422–4432.
- Kierzkowska M, Majewska A, Szymanek-Majchrzak K, Sawicka-Grzelak A, Młynarczyk A, Młynarczyk G. In vitro effect of clindamycin against *Bacteroides* and *Parabacteroides* isolates in Poland. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018; 13: 49–52.
- Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A, Młynarczyk A, Chmura A, Kwiatkowski A, et al. Antibiotic resistance profiles of strictly anaerobic Gram-negative *Bacteroides* spp. and *Parabacteroides* spp. bacilli isolated from infected inpatients on surgical wards. *J Glob Antimicrob Resist.* 2016; 7: 128–129.
- Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A, Młynarczyk A, Chmura A, Durlik M, et al. Specific character of anaerobic bacterial infections in patients treated in transplantation wards at one of the clinical hospitals in Warsaw. *Transplant Proc.* 2014; 46: 2586–2588.
- Gajdacs M, Spengler G, Urbán E. Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology? *Antibiotics* (Basel). 2017; 6(4): 25.
- Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases. Chapter 1–2. Anaerobic infections (general): testing anaerobic infections. *J Infect Chemother.* 2011; 17 (Suppl 1): 13–25.
- Miller DL, Brazer S, Murdoch D, Reller LB, Corey GR. Significance of *Clostridium tertium* bacteremia in neutropenic and nonneutropenic patients: Review of 32 Cases. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 975–978.
- Abusnina W, Shehata M, Kareem E, Koc Z, Khalil E. *Clostridium sporogenes* bacteremia in an immunocompetent patient. *IDCases.* 2019; 15: e00481.
- Horton LE, Mehta SR, Aganovic L, Fierer J. *Actinotignum schaalii* infection: A clandestine cause of sterile pyuria? *Open Forum Infect Dis.* 2018; 5: ofy015.
- Tavassoli P, Paterson R, Grant J. *Actinobaculum schaalii*: An emerging uropathogen? *Case Rep Urol.* 2012; 64: 260–267.
- Hall IC. A review of the development and application of physical and chemical principles in the cultivation of obligately anaerobic bacteria. *J Bacteriol.* 1929; 17: 255–301.
- Oktari A, Supriatni Y, Kamal M, Syafrullah H. The bacterial endospore stain on Schaeffer-Fulton using variation of methylene blue solution. *J Phys.* 2017; 812: 012066.
- Patrick S, Duerden BI. Gram-negative non-spore forming obligate anaerobes. In: SH Gillespie, P Hawkey (eds). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. Second Edition. London: John Wiley & Sons; 2008.
- Sondag JE, Ali M, Murray PR. Rapid presumptive identification of anaerobes in blood cultures by gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol.* 1980; 11: 274–277.
- Appelbaum PC, Kaufmann CS, Keifer JC, Venbrux HJ. Comparison of three methods for anaerobe identification. *J Clin Microbiol.* 1983; 18: 614–621.
- Lee EH, Degener JE, Welling GW, Veloo AC. Evaluation of the Vitek 2 ANC card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 1745–1749.
- Rennie RP, Brosnikoff C, Turnbull L, Reller LB, Mirrett S, Janda W, et al. Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2646–2651.
- Li Y, Gu B, Liu G, Xia W, Fan K, Mei Y, et al. MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria. *J Thorac Dis.* 2014; 6: 517–523.
- Tsukimoto ER, Rossi F. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry (VITEK-MS) compared to the ANC card (VITEK 2) for the identification of clinically significant anaerobes. *J Bras Patol Med Lab.* 2018; 54: 206–212.
- Kierzkowska A, Majewska A, Sawicka-Grzelak A, et al. Zastosowanie spektrometrii masowej – MALDI-TOF MS w identyfikacji klinicznych izolatów bakterii beztlenowych – Application of the mass spectrometry – MALDI-TOF MS for the identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. *Zakażenia.* 2015; 3: 75–78.

25. Kierzkowska M, Majewska A, Kuthan RT, Sawicka-Grzelak A, Młynarczyk G. A comparison of Api 20A vs MALDI-TOF MS for routine identification of clinically significant anaerobic bacterial strains to the species level. *J Microbiol Methods*. 2013; 15: 209–212.
26. Kuthan RT, Chabros Ł, Sawicka-Grzelak A. Zastosowanie spektrometrii masowej MALDI-TOF w rutynowej medycznej diagnostyce bakteriologicznej. *Zakażenia*. 2013; 1: 87–90.
27. Czerwicka M, Kumirska J, Stepnowski P. Spektrometria mas – uniwersalna technika analityczna. *Laboratorium*. 2012; 5–6: 20–22.
28. Lee W, Kim M, Yong D. Evaluation of VITEK mass spectrometry (MS), a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS system for identification of anaerobic bacteria. *Ann Lab Med*. 2015; 35(1): 69–75.
29. Park Y, Choi JY, Yong D, Lee K, Kim JM. Clinical Features and Prognostic Factors of Anaerobic Infections: A 7-Year Retrospective Study. *Korean J Intern Med*. 2009; 24: 13–18.
30. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), v. 10, 2020. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (do-step: 31.06.2020).
31. Kierzkowska M, Majewska A, Młynarczyk G. Microbial Drug Resistance. Ahead of print. <http://doi.org/10.1089/mdr.2019.0462>