



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Inovační kurz
**DIAGNOSTIKA ANAEROBNÍCH
PATOGENNÍCH BAKTERIÍ**

RNDr. Dittmar Chmelař, Ph.D.



**TERMÍN KURZU:
28. – 30. 1. 2013**

..

Akce bude jako součást celoživotního vzdělávání ohodnocena kreditními body pro nelékařské zdravotnické pracovníky.

Akce je pořádána ve spolupráci se společností pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP.



OBSAH

1	Anaerobní mikroorganismy	3
1.1	Toxicita kyslíku	3
1.2	Mikroaerofilní mikroorganismy	6
2	Anaerobní infekce	11
2.1	Smíšené infekce měkkých tkání a fascií	11
3	Identifikace anaerobních mikroorganismů	17
3.1	Novinky v taxonomii anaerobních mikroorganismů	17
4	Vliv kyslíku na růst patogenních anaerobních bakterií	20
5	Stanovení citlivosti na antibiotika u anaerobních patogenních bakterií	28

Úvod

Anaerobní bakterie stále zůstávají v rámci klinické mikrobiologie popelkou. Je to dáno jak náročností práce s těmito mikroorganismy, tak existencí kvalitního technologického zázemí nutného pro jak pro úspěšný průkaz původců anaerobních infekčních onemocnění, tak i pro jejich následnou identifikaci a stanovení citlivosti na ATB. Ne vždy však mikrobiologická pracoviště disponují dostatečnými finančními prostředky nutnými pro zajištění kvalitní kultivace v anaerobním prostředí, především pro nákup anaerobních boxů pro kontinuální kultivaci v anaerobním prostředí. Ale i alternativní metody kultivace v anaerobním prostředí umožňují kvalitně a standardní práci s bakteriálními původci anaerobních infekcí. Inovační kurz je zaměřen i na tuto oblast práce s anaeroby.

Nedílnou součástí práce mikrobiologa je i sledování novinek v taxonomii anaerobních bakterií. I této problematice se kurz v dostatečné míře věnuje.

Dittmar Chmelař

Odborný garant inovačního kurzu

1 Anaerobní mikroorganismy

Anaerobní mikroorganismy (anaeroby) jsou organismy, které nerostou, nedělí se a nerealizují žádné životní pochody v přítomnosti kyslíku.

Podle vztahu ke kyslíku se dělí na:

- **fakultativně anaerobní:** reprodukují se v přítomnosti i nepřítomnosti O₂,
- **mikroaerotolerantní (mikroaerofilní):** rostou v mikroaerofilním prostředí (do 5 % O₂), ale ne v prostředí, kde je více než 15 % volného objemu O₂,
- **anaeroby extrémně citlivé na O₂ – EOS** (EOS = extremely oxygen sensitive anaerobes): rostou pouze v prostředí bez O₂,
- **striktně anaerobní:** neschopné reprodukce v přítomnosti více než 0,5 % volného objemu O₂ v prostředí,
- **umírněně anaerobní:** neschopné reprodukce v přítomnosti více než 2–8 % volného objemu O₂.

1.1 Toxicita kyslíku

Toxicita kyslíku pro anaerobní bakterie není dána jejich přímou afinitou ke kyslíku. Anaerobní mikroorganismy s výjimkou hlízkových bakterií rostlin rodu *Rhizobium* a *Azotobacter* nemohou stejně jako aerobní mikroorganismy využít žádné prvky a látky v plynné podobě.

- Anaerobní bakterie proto nezabíjí plynný O₂.

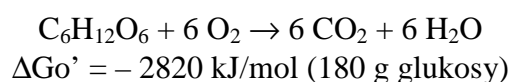
- Toxicita kyslíku je u anaerobních bakterií „druhotná“ – spočívá v tom, že v aerobním prostředí vznikají díky vysoké reaktivitě kyslíku látky se silným oxidačním účinkem – peroxidy, látky s OH⁻ skupinami.



- Anaerobní bakterie nemají na rozdíl od aerobních mikroorganismů katalytické systémy eliminující látky se silnými oxidačními účinky – absence kataláz, superoxiddismutáz.

Velice významným a důležitým faktorem majícím zásadní vliv na metabolismus bakteroidů je jejich afinita ke kyslíku. Toxicita kyslíku pro anaerobní bakterie nespočívá v přímém působení kyslíku na bakterie, a to jak *in vivo*, tak i *in vitro*, tedy na bakterie vyrostlé na povrchu kultivačního média, ale je realizována prostřednictvím látek se silným oxidačním účinkem, které vznikají v prostředích, kde je přítomen kyslík. Kyslík jako vysoce reaktivní a zároveň toxický prvek se podílí na vzniku velkého množství těchto látek, které právě díky svým oxidačním účinkům působí toxicky (Chmelař a Bazgerová, 2009). K těmto látkám patří např. peroxidy, látky s hydroxylovou skupinou, železo a měď (zejména v určitých sloučeninách a kombinacích působí jako volné radikály), dusitany, chlór, těžké kovy, polynenasycené tuky a tzv. kyslíkové radikály (kyslík, ozón, peroxidy, kysličníky a jejich reaktivní sloučeniny s volným vazebným elektronem na skupině obsahující kyslík). Tyto látky jsou obecně označovány jako reaktivní formy kyslíku (ROS – Reactive Oxygen Species). ROS představují jiné oxidační stavy dvouatomové molekuly kyslíku. Jejich působením, zejména tehdy, když jejich množství překročí únosnost obranných mechanismů buňky, vzniká v buňce tzv. oxidační stres. ROS vznikají v buňce neúplnou redukcí kyslíku během metabolismu mastných kyselin v peroxizómech. Chovají se jako oxidační činidla, které svou reaktivitou působí negativně na buňku. Jejich toxicita spočívá v tom, že vyvolávají celou škálu oxidačních poškození makromolekul, které mohou vést ke smrti buňky (Halliwell a Gutteridge, 1989; Gutteridge, 1994). Mohou vyvolávat peroxidaci lipidů, agregaci a fragmentaci proteinů, karbonylaci některých enzymů, hydroxylaci aminokyselin a různé změny nukleových kyselin, jako např. jednovláknité a dvouvláknité zlomy, modifikace a delece bazí a vznik příčných vazeb mezi řetězci. Následkem těchto poškození může dojít k zastavení růstu anebo až k odumření buňky. Proto pro buňky žijící v aerobním nebo v mikroaerofilním prostředí je životně důležité vnímat zvýšenou koncentraci oxidantů a odpovídat na ni aktivací obranných mechanismů. V hostitelském makroorganismu neustále vznikají částice, které pro něho představují trvalé potenciální nebezpečí. Tyto částice, odborně nazývané volné radikály, jsou vysoce reaktivní, „neúplné“ (nenasycené) molekuly, které jsou schopné přijmout vazebný elektron jiné sloučeniny, velmi ochotně se spojují s jinými sloučeninami a mění je. Mohou tak poškodit buňky, oslabit imunitní systém a napomáhat tak ke vzniku řady onemocnění. Proto je pro zdraví organismu nutné, aby tyto částice byly ihned po svém vzniku zachyceny a zničeny. Látky, které mají schopnost volné radikály zničit, resp. blokovat, se nazývají antioxidanty. Volné radikály jsou látky, které se v těle tvoří při látkové přeměně, při obraně před bakteriemi a při expozici ultrafialovým nebo ionizačním zářením. Některé volné radikály jsou běžnou součástí zdravého metabolismu, některé se objevují nebo se jejich množství zvyšuje v průběhu nemoci, psychické a fyzické zátěže. Také stárnutím hostitelského makroorganismu se zvyšuje tvorba volných radikálů (a zmenšuje schopnost jejich eliminace), což vede ke změně vazivové tkáně, k poruše pružnosti vaziva a vzniku vrásek. Ke změnám však dochází i ve vnitřních orgánech, ve šlachách, svazech a cévách. Volné radikály způsobují rychlé opotřebovávání tělových buněk, hlavně, když se jejich množství v těle zvyšuje špatnou výživou a pobytem ve znečištěném prostředí.

Normální (triplet) kyslíku O_2 je biradikál, s vysokou afinitou k elektronům. Ale příjem elektronu vyžaduje, aby jeden ze stávajících nepárových elektronů změnil svůj spin, což je relativně pomalý proces. Bez této restriktce by v kyslíkaté atmosféře planety okamžitě vše shořelo. Singletový O_2 je excitovaná, vysoce reaktivní forma kyslíku. Stejně toxické jsou také volné kyslíkové radikály – $O_2^{\cdot -}$ (označuje, že se jedná o radikál a – znamená, že se jedná o ion; také je označován jako tzv. superoxid), jedná se o molekuly, atomy nebo iony, které obsahují aspoň jeden nepárový elektron. Přenos elektronů (oxidace) z organických látek na kyslík uvolňuje obrovské množství energie:

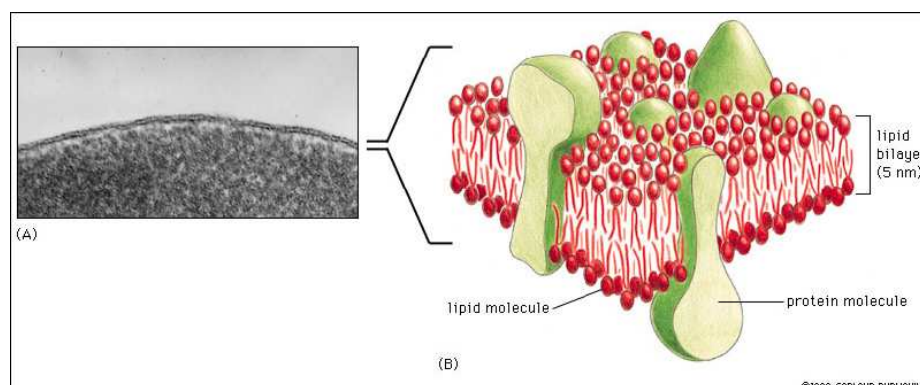


Elektrony proudí po spádu redoxního potenciálu a končí na kyslíku. Zároveň s proudem elektronů se pumpují protony a vzniklý protonový gradient pak pohání syntézu ATP. Reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS), čili látky s výrazným baktericidním účinkem, tvoří:

- Radikály:
 - Superoxid, $O_2^{\cdot -}$
 - Hydroperoxyl, HO_2^{\cdot}
 - Hydroxylový radikál, OH^{\cdot}
 - Peroxyl, ROO^{\cdot}
 - Alkoxylový, RO^{\cdot}
- Ne-radikály:
 - Peroxid vodíku, H_2O_2
 - Kyselina chlorná, $HClO$
 - Ozón, O_3
 - Singletový kyslík, 1O_2

Působením reaktivních forem kyslíku, především ale volných kyslíkových radikálů, dochází k oxidačnímu poškození biomolekul. Převážně jsou poškozeny:

- Lipidy: peroxidace polynenasycených mastných kyselin v membránách.



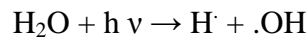
Lipidická dvouvrstevná biomembrána; zdroj: © Garland Publishing

- Proteiny: oxidace -SH, karbonylace -NH₂, hydroxylace/nitrosylace aromatických aminokyselin,

cross-linking, degradace.

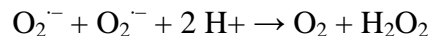
- Nukleové kyseliny: zlomy v řetězci DNA, hydroxylace basí – mutace, kancerogeneze.

Hydroxylový radikál vzniká ionizací vody:



Reaktivní formy kyslíku v organismu vznikají jednoelektronovou redukcí kyslíku (mitochondrie, NADPH oxidasa). Tím vznikají superoxydy $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Dismutace superoxidu produkuje peroxid vodíku:



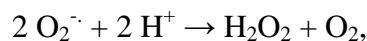
Fentonova reakce s Fe nebo Cu vytvoří z peroxidu hydroxylový radikál:



Hladina reaktivních forem kyslíku je udržována v určitých mezích mechanismy antioxidační ochrany. Při vychýlení této rovnováhy směrem k oxidaci nastává oxidační stres. Anaerobní mikroorganismy těmito mechanismy nedisponují, proto jsou velice citlivé na přítomnost jakéhokoliv množství reaktivních forem kyslíku.

Anaerobní mikroorganismy byly evolucí života na bázi kyslíku postaveny před základní dilema: co dělat v prostředí, které je kvůli velkému objemu kyslíku pro ně naprosto toxické. Měly na vybranou 3 možnosti: vyvinout účinnou antioxidační ochranu, uchýlit se do striktně anaerobních podmínek nebo vyhnout. Vzhledem k tomu, že se striktními anaerobními mikroorganismy se běžně setkáváme a nebyla u nich zaznamenána jakákoliv forma antioxidační ochrany, vybraly si ke svému přežití tu nejsnadnější variantu, tedy uchýlily se do anaerobních podmínek, kde stále úspěšně přežívají.

Většina organismů se brání účinkům těchto toxických látek se silným oxidačním účinkem tvorbou celé řady enzymů se silným katalytickým účinkem, jako jsou katalázy, peroxidázy nebo superoxiddismutázy (enzymy z třídy oxidoreduktáz, katalyzující disproportionaci superoxidu kyslíku):



jeden z prvků obranného systému organismů proti oxidačnímu stresu. Anaerobní bakterie tyto enzymy neprodukují, proto nerostou v prostředí, kde koncentrace kyslíku je větší než 0 % jeho volného objemu. Anaerobní bakterie vyrůstající v aerobním, respektive v mikroaerofilním prostředí, realizují svůj metabolismus jen v přítomnosti aerobních bakterií, které do svého okolí vylučují dostatečné množství katalytických enzymů, které chemicky inaktivují látky se silným oxidačním účinkem, a umožňují tak anaerobním bakteriím růst v prostředí, kde by samostatně nemohly přežít. Tento fenomén funguje nejenom *in vivo*, ale také *in vitro*, při kultivaci těchto bakterií v prostředí, které není přísně anaerobní.

1.2 Mikroaerofilní mikroorganismy

Mikroaerofilní mikroorganismy jsou obecně řazeny mezi anaerobní bakterie, ale díky tomu, že produkují enzym katalázu, perzistují v prostředí, kde koncentrace kyslíku se pohybuje

kolem 5 % volného objemu (Wilkins et al., 1978). Rostou v anaerobním prostředí, ale stejně kvalitně mohou růst i v prostředí mikroaerofilním (Rocha et al., 1998, 1999). S ohledem na tuto skutečnost je možné předpokládat, že produkce endotoxinu u této skupiny bakterií bude větší v prostředí se zvýšenou koncentrací kyslíku než v případě jejich růstu v přísně anaerobním prostředí, kde volný objem kyslíku se limitně blíží nule.

Kataláza je běžný enzym vyskytující se téměř ve všech živých organismech vystavených kyslíku. Funguje jako katalyzátor rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Tento enzym vlastní aerobní a fakultativně anaerobní bakterie, které jsou vybaveny cytochromovým systémem. Hlavní význam tohoto enzymu spočívá ve zneškodňování peroxidu vodíku, který je pro bakterie toxický. Kataláza má jedno z nejvyšších čísel přeměny ze všech enzymů. Jediná molekula katalázy může převést na vodu a kyslík miliony molekul peroxidu vodíku za sekundu. Kataláza je tetrametr čtyř polypeptidových řetězců, každý je složen z více než 500 aminokyselin. Obsahuje čtyři porfyrinové hemové (železnaté) skupiny, které umožňují enzymu reagovat s peroxidem vodíku. Optimální pH pro lidskou katalázu je okolo 7 a rozmezí maxima její funkce je skutečně široké; míra reakce se znatelně nemění v rozmezí pH = 6,8 až 7. Optimum pH pro jiné katalázy se pohybuje mezi 4 a 11 v závislosti na druhu. Také optimální teplota se liší podle druhu katalázy (Chelikani et al., 2004).

Nejdůležitějšími mikroorganismy podílejícími se na vzniku a progresi infekčních onemocnění u člověka jsou mikroaerofilní mikroorganismy. Osidlují niky, které co se saturace kyslíkem týče, jsou na hranici mezi dostatkem a nedostatkem kyslíku, které mohou mít patogenní mikroorganismy k dispozici ke svým životním pochodům. Mikroaerofilní mikroorganismy rostou v prostředí, kde hodnota redox potenciálu je minimálně -42 mV při pH = 7. Tato hodnota je nezbytně nutná pro jejich izolaci a kultivaci. Čisté kultury mikroaerofilů však mohou růst na půdách, jejichž redox potenciál je větší než $+100$ mV (Goldner et al., 1993). To svědčí o výrazné aerotoleranci bakteroidů. Relativní aerotolerance většiny kmenů mikroaerofilních bakterií vůči kyslíku je zajištěna prostřednictvím produkce superoxidismutáz a kataláz. Z klinického úhlu pohledu jsou nejdůležitějšími mikroaerofilními patogeny bakterie ze skupiny *Bacteroides fragilis* group. Bakteroidy ze skupiny *Bacteroides fragilis* (BAFR) group (*B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*) jsou nejčastěji izolovanými původci anaerobních infekcí u lidí i zvířat a jsou primárními vyvolateli intraabdominálních abscesů. Nebezpečnost těchto patogenních kmenů bakterií je jak v jejich tvorbě β -laktamáz, tak i ve tvorbě celé řady toxinů, které spouštějí mechanismus atypické imunitní odpovědi superantigenového typu, která většinou končí septickým šokem a smrtí pacienta. Bakterie ze skupiny *Bacteroides fragilis* mají proti ostatním bakteroidům a jiným bakteriím navíc důležitý faktor virulence – endotoxin (lipopolysacharid), který vyvolává tvorbu abscesů v hostitelském makroorganismu. Stejně působí i purifikovaný endotoxin podaný experimentálním zvířatům. Endotoxiny jiných gramnegativních bakterií tuto schopnost nemají. Endotoxiny bakterií BAFR group mají také silný mitogenní účinek (Joiner et al., 1981). Bakterie skupiny *Bacteroides fragilis* jsou nejčastěji izolovány z klinických materiálů pocházejících z abscesů dutiny břišní. Tyto mikroorganismy mají neobyčejnou schopnost vyvolávat abscesy zvláště v dutině břišní. Studie, při nichž čistý lipopolysacharid bakterií ze skupiny *Bacteroides fragilis* vyvolal absces při absenci životaschopného mikroorganismu, prokázal důležitost tohoto nežádoucího faktoru při tvorbě abscesů (Delahooke et al., 1995).

Kromě toho, bakterie ze skupiny *Bacteroides fragilis* se spolu s jinými druhy aerobních patogenních bakterií podílejí na vzniku a progresi infekcí dolních končetin především u dlouhodobě hospitalizovaných pacientů a infekcí jak horních, tak i dolních dýchacích cest a

také se mohou svými metabolickými produkty podílet na progresi nádorových onemocnění tenkého a tlustého střeva u lidí. Z tohoto důvodu byly u izolátů *Bacteroides fragilis* group izolovaných od pacientů s diagnózou nádorových onemocnění tenkého a tlustého střeva stanovovány endotoxiny, protože tyto bakterie se vyznačují tvorbou těchto toxinů – lipopolysacharidů – LPS.

Bakterie *Bacteroides fragilis* a *Bacteroides distasonis* produkují katalázu; u druhů *Bacteroides thetaiotaomicron* a *Bacteroides ovatus* produkují katalázu jen některé kmeny. *Bacteroides vulgatus* katalázu neprodukuje. S ohledem na tuto skutečnost se předpokládá, že relativní aerotolerance bakteroidů ke kyslíku může být jednou z hlavních příčin jejich virulence. Tuto domněnku potvrzuje skutečnost, že většina klinických izolátů bakteroidů jsou producenty kataláz, tedy jsou aerotolerantní, na rozdíl od bakteroidů izolovaných ze stolice. Kataláza *katB* produkovaná kmeny *Bacteroides fragilis*, je vytvářena v pozdní fázi exponenciálního růstu a v kulturách vystavených oxidačnímu stresu po jejich přenesení z anaerobních do aerobních podmínek. Kataláza bakteroidů je homeoprotein skládající se ze dvou identických bílkovinných podjednotek, každá o hmotnosti přibližně 650 kDa. Kataláza produkovaná kmeny *Bacteroides thetaiotaomicron* je mu podobná, ale má mnohem menší molekulovou hmotnost nepřekračující 250 kDa. Klonováním a sekvenováním *katB* genů typového kmene *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 (ATCC 25285) bylo zjištěno, že sekvence jednotlivých aminokyselin jejich bílkovinných podjednotek je velice podobná sekvenci aminokyselin v podjednotkách kataláz gram pozitivních bakterií a savců. Tato skutečnost se odráží v taxonomickém postavení fylogenetického kmene *Bacteroides* – *Flavobacterium*. Velice zajímavou skutečností je 71% podobnost v sekvenci aminokyselin a 66% podobnost v sekvenci nukleotidů katalázy *katB* produkované kmeny *Bacteroides fragilis* a *HktE* katalázy produkované *Haemophilus influenzae*, což vede k domněnce, že mezi oběma druhy došlo k přenosu katalázových genů během jejich evolučního vývoje (Rocha and Smith, 1995). Kmen s mutací v *katB* genu velice dobře a snadno přežíval v prostředí se zvýšenou koncentrací kyslíku než jeho původní varianta bez mutace v *katB* genu, která nebyla odolná vůči toxickému působení peroxidu vodíku (Rocha et al., 1996).

Kromě kataláz zajišťuje u bakteroidů zvládnutí oxidativního stresu a eliminuje toxické působení peroxidu vodíku dalších 28 bílkovinných látek o molekulové hmotnosti 12– 79 kDa. Jestliže je proteosyntéza těchto látek inhibována chloramfenikolem, přežití kmenů *Bacteroides fragilis* za zvýšené tenze kyslíku je limitováno (Rocha et al., 1996). Množství genů, které zajišťují produkci těchto látek je spřaženo s oxidativním stresem. Většina těchto mechanismů je příčinou schopnosti kmenů *Bacteroides fragilis* penetrovat do HeLa buněk (Goldner, et al., 1993) a modifikovat fermentační metabolické dráhy během růstu v prostředí se zvýšenou tenzí kyslíku (Goldner et al., 1997). Jiná mutace *Bacteroides fragilis* NCTC NCTC 9343 (ATCC 25285) vyvolaná mutací pomocí transpozonů vykazovala velice sporadický růst ve tkáňové kultuře z myších fibroblastů z ovarií čínských křečků (CHO) v porovnání s původním, nemutovaným kmenem (Tang et al., 1999). Tento mutant byl více citlivý na zvýšenou tenzi kyslíku než nemutovaný kmen. Fragment DNA tohoto mutantního kmene o velikosti 6,5 kbp vedl k objevu pěti různých aerotolerantních operonů *Bat A-E* *Bacteroides fragilis*. Detailní funkce těchto bílkovin ještě není prozkoumána, ale mohou být zárodkem vzniku membránově vázaných bílkovinných komplexů podílejících se na transportu komponent nutných pro zvládnutí oxidativního stresu.

Kultivace anaerobních mikroorganismů

Zařízení s kultivačními systémy používané ke kultivaci anaerobních mikroorganismů:

- **Anaerobní stanice (boxy)** – slouží jak ke kontinuální práci s anaerobními mechanismy, tak současně i k jejich kultivaci. Anaerobiózy je v nich docilováno pomocí řízené katalýzy, během které dochází ke tvorbě vody na povrchu zrn paladia reakcí vodíku a zbytkového kyslíku ve stanici. Uvnitř stanice je elektronicky kontrolována nastavená vlhkost a teplota.



Anaerobní pracovní stanice (box) Bactron ke kultivaci a vytváření kontinuální anaerobiózy (bezkyslíkatého prostředí)

- **Anaerobní hrnce (anaerobic jar, anaerostaty)** – kultivace je uvnitř těchto většinou jen několikolitrových nádob zajišťována podobným katalytickým systémem jako uvnitř anaerobních boxů nebo pomocí gaspaků – sáčků se směsí chemikálií spotřebovávajících kyslík.
- **Kultivace v jednorázových kultivačních systémech** – anaerobní kultivace je docilováno stejně jako v anaerobních hrncích. Místo samotných hrnců jsou používány sáčky z termoplastické fólie nepropustné pro plyny.
-

Citovaná a doporučená literatura

Delahooke, D. M., Barclay, G. R., Poxton, I. R. A re-appraisal of the biological activity of *Bacteroides* lipopolysaccharide. *J. Med. Microbiol.*, 1995, 542: 102–112.

Goldner, M., Conquis-Rondon, M. and Carlier, J. P. A role of *Bacteroides fragilis* at different redox levels of potential pathogenicity in a HeLa cell system: demonstration by confocal laser scanning microscopy. *Zb. Bakteriologie*. 1993, 278: 529–540.

Goldner, M., Mingot, M., Emond, J. P., Dublanquet, A. Influence of different levels of redox potential on fermentative products formed by *Bacteroides fragilis*. *Clin. Infect. Dis.* 1997, 25 (Supl)(2): S147–S150.

Gutteridge, J. M. Biological origin of free radicals and mechanisms of antioxidant protection. *Cem Biol Inter*, 1994, ct., 91: 133–140.

Halliwell B. and Gutteridge, J. M. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, New York, Oxford University Press. 1989.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2004, January, 61, 2, p. 192–208.

Chmelař, D., Bazgerová, E. Kultivační média pro anaerobní bakterie. *Klin Mikrobiol Inf Lek.*, 2009, 15 (6), 205–209.

Joiner, K. A., McAdam, K. P., Kasper D. L. Lipopolysaccharides from *Bacteroides fragilis* are mitogenic for spleen cells from endotoxin responder and nonresponder mice. *Infect. Immun.*, 1982, 36 (3), 1139–1145.

Wilkins, T. D., Wagner, D. L., Veltri, B. J. Jr., Gregory, E. M. Factor Affecting Production of catalase by *Bacteroides*. *J. Clin. Microbiol.*, 1978, Nov., p. 553–557.

Rocha, E. R., Selby, T., Coleman, J. P., Smith, C. J. Oxidative stress response in an anaerobe, *Bacteroides fragilis*: a role for catalase in protection against hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology*. 1996, 178(23), p. 6895–903.

Rocha, E. R., Smith, C. J. Characterization of a peroxide-resistant mutant of the anaerobic Bacterium *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (22), p. 5906–5912.

Rocha, E. R., Smith, C. J. Role of the alkyl hydroperoxide reductase (*ahpCF*) gene in oxidative stress defense of the obligate Anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(18), p. 5701–5710.

2 Anaerobní infekce

2.1 Smíšené infekce měkkých tkání a fascií se zaměřením na jejich léčbu pomocí hyperbaroxie.

Hyperbarická oxygenace nalézá jednu ze svých hlavních aplikačních možností v případě eradikací anaerobních infekcí. Hyperbarická oxygenace zvyšuje množství saturovaného kyslíku v ischemické, nekrotizující tkáni a jednoznačně zabraňuje dalšímu šíření anaerobních původců infektů. Všechny anaerobní infekce vyvolávané anaerobními druhy patogenních bakterií mají s ohledem na jejich anaerobní metabolismus původ v endogenní flóře člověka. Často se jedná o infekce smíšené vyvolávané anaerobními, mikroaerofilními, fakultativně anaerobními a aerobními bakteriemi. Můžeme je rozdělat do několika základních skupin:

- | | |
|---|----------------|
| ■ Celulitida | |
| ■ Kožní a podkožní abscesy | PODKOŽÍ |
| ■ Diabetická noha | |
| ■ Nekrotizující fasciitida | |
| ■ Fournierova gangrena | FASCIE |
| ■ Klostridiální fasciitida | |
| ■ Klostridiální myonekróza (plynatá sněť) | |
| ■ Anaerobní streptokokální myonekróza | SVALY |
| ■ Anaerobní abscesy svalů | |

Výjimečně je infekce vyvolána samotnými anaerobními patogeny bez kooperace s jinými druhy. Vzájemné kooperace jsou oxido-redukční a metabolické povahy a jsou spojeny s využíváním enzymů aerobních druhů bakterií, které umožní průnik anaerobním patogenům do tkáně. Na začátku metabolických a oxido-redukčních reakcí v ložisku vystupují aerobní, fakultativně anaerobní, popř. mikroaerofilní bakterie, které produkty svého metabolismu a redukcí kyslíku přímo v místě infekce umožní množení striktně anaerobním patogenům (Chmelař, 2001).

Za anaerobní infekci je pokládán infekční proces u daného jedince, neboť pouhá přítomnost virulentního anaeroba ještě nemusí infekci vyvolat. Anaerobní infekce neprobíhají epidemicky. Může se však stát, že dojde k nahromadění podobných případů v určitém prostoru a čase, když jsou přítomny společné faktory a markry nutné pro jejich vznik. Infekce postihují obě pohlaví, muži však bývají postiženi častěji a také infekce, které u nich probíhají, jsou mnohem těžší. Anaerobní infekce se vyskytují v každém věku, některé infekce jsou typické pro raný věk, jiné pro starší populaci, ve které predisponují jiné nemoci (Brook, 1989; Otto et al., 1990; Sawyer et al., 1995)

Infekce vyvolané anaerobními bakteriemi mají charakter putridně hnisavý, putridně nekrotizující, hnisavě nekrotizující nebo nekrotizující. Těžké formy anaerobních infekcí vyvolávají septické toxikémie, ve kterých se uplatňuje toxický lipopolysacharid především bakterií ze skupiny *Bacteroides fragilis* group (Willis, 1991; Kato, 1996; Patrick, 1988). Anaerobní bakterie ze skupiny BAFR group jsou nejčastěji izolovanými anaerobními bakteriemi, které vyvolávají celou řadu závažných anaerobních infekcí. Bakterie BAFR group tvoří podstatnou část bakteriální flóry střeva u lidí a zvláště v tlustém střevě dosahuje jejich počet až 10^{12} KTJ/1g stolice a tvoří více než 50% všech druhů mikroorganismů

přítomných v tlustém střevě lidí (Chmelař, 2001; Schindler, 2009). Jsou to bakterie hnilobného rozkladu. Způsobují rozklad bílkovin za vzniku četných meziproductů, převážně histaminového typu (aminy, putresciny, kadaveriny). Kromě toho také produkují endotoxiny, které jsou primárními vyvolateli intraabdominálních abscesů a spouštějí mechanismus atypické imunitní odpovědi superantigenového typu, která většinou končí septickým šokem a smrtí pacienta. Endotoxiny bakterií ze skupiny *Bacteroides fragilis* group mají proti ostatním bakteroidům a jiným bakteriím navíc důležitý faktor virulence – vyvolávají tvorbu abscesů v hostitelském makroorganismu. Stejně působí i samotný purifikovaný endotoxin – lipopolysacharid podaný experimentálním zvířatům. Lipopolysacharidy jiných bakterií tuto schopnost nemají – viz obr. č. 1).

Již dříve byla vyslovena domněnka o korelaci mezi výskytem těchto bakterií u pacientů preferujících masitou stravu a rakovinným onemocněním tenkého a především tlustého střeva a konečníku. Endotoxiny těchto bakterií se podílejí svým výrazným antigenním účinkem na další výrazné oslabení rakovinou již zdecimovaného imunitního systému pacienta a sehrávají tak významnou roli v progresi již probíhajícího rakovinného onemocnění tlustého a tenkého střeva u lidí (Fukata a Abreu, 2008; Chmelař a Vrtný, 2010).

Obr. č. 1: Kolonie *Bacteroides fragilis* (BAFR) po 48 hod. kultivaci na Wilkins-Chalgrenově agaru při 37°C izolovaný od pacienta s anaerobní lézí dolní končetiny



Základním společným faktorem, jehož přítomnost vede k anaerobní infekci, je nedostatečné prokrvení tkání, k němuž dochází z příčin celkových (anémie z krvácení apod.), i lokálních (nedostatek prokrvení tkáně kolem podvázané cévy nebo sutury, vazokonstrikce, aplikace vazokonstrikčních látek nebo z tlaku na cévy v daném místě při strangulaci nebo invaginaci střeva či při všitých protézách). Ke zhoršení prokrvení ve střevě může dojít i po dilataci střeva z náhlého nadměrného nasycení, zejména když potrava byla nevhodná nebo infikovaná. Sepsa a orgánové infekce navazují na nezhojené infekce v dutině ústní,

v čelistních dutinách a ve středouší. U anaerobních infekcí plic se uplatňuje ucpaní konečných bronchů aspirátem u osob v bezvědomí, s poruchou dýchání nebo polykání.

Anaerobní infekce se rozvíjejí v místech, kde je přítomna zhmožděná nekrotická tkáň, kde jsou extravazáty, které snižují oxido-redukční potenciál místa a nabízejí dostatek živin pro růst a pomnožování anaerobních bakterií. Často vznikají v souvislosti s operačním zákrokem nebo s invazivní vyšetřovací metodou v místech výskytu endogenní flóry (Moncrief et al., 1998). Anaerobní infekce mohou zhoršovat některé stavy nebo nemoci postiženého jako poškození cév aterosklerózou nebo diabetem, obliterující artritidu, zhoubné nádory i tkáňové destrukce, sníženou humorální i celulární imunitu u imunodeficientních osob i po imunosupresivní léčbě. Progresi anaerobní infekce může vyvolat také nevhodná antibakteriální terapie, která poruší slizniční biocenózy a umožní přemnožení rezistentních patogenů. Používání antibakteriálních preparátů, imunosupresiv a velké chirurgické výkony u rizikových skupin pacientů vede ke vzniku nozokomiálních anaerobních infekcí (Brook, 1989).

Anaerobní infekce mají obvykle tři fáze: lokální, rozšíření do krevního oběhu a metastatický proces (Kato et al., 1996). Lokální proces se může manifestovat jako infiltrát, absces, flegmóna nebo nekrotický rozpad tkáně v místě vzniku infekce. Začíná asymptomatickými změnami v dosavadní biocenóze ve smyslu přemnožení patogenního druhu, který vyvolá zánět. Zánětlivý exsudát, zpravidla rozsáhlý a tvrdý edém, zvyšuje hypoxii tkání. Dále se snižuje pH i oxido-redukční potenciál prostředí. Nekrózy nabízejí dostatek živin pro další množení bakterií a infekce se pak rychle šíří do okolí, kde se tento proces opakuje. V cévách ložiska i v jeho okolí se tvoří tromboflebitidy, které rychle nekrotizují. Na septických embolech jsou bakterie nesené do krevního oběhu, vzniká septikémie. Ta se může přihlásit jako první projev nemoci u osoby do té doby relativně zdravé v případě, že primární ložisko zůstalo klinicky němé. Z primárního ložiska může dojít také k rozvoji sepse nebo jen k asymptomatické bakteriurii a klinicky se projeví až metastatický proces. Metastatické procesy se mohou z ústní dutiny šířit na tvář, krk, na meningy a na pleuru. Z plic a pleury se anaerobní bakterie dostávají do mozku, kde dochází k metastázám. Metastázy vznikají také v játrech, mezi svaly pánve a v podkoží na stehnech. Klinické projevy anaerobních infekcí vyvolaných bakteroidy nemají většinou specifický charakter, ale přesto se dají vysledovat některé společné znaky. Většinou jde o akutní průběh, jen některé infekce probíhají subakutně až chronicky. Nežádka začínají vysokou horečkou, často spojenou s třesavkou. Puls odpovídá teplotě, tedy většinou je ve shodě s ní urychlen. Je zde výrazná tendence k nekrotickým a rozpadu tkání. Rychle dochází k tromboflebitidám, k embolizaci a septikémii. Zánětlivý exsudát většinou hnilobně páchne, protože obsahuje některé z pestrých produktů anaerobního metabolismu (kyselina máselná, amoniak, sekundární aminy, indol, sirovodík, apod). Infekt je uložený v místech výskytu endogenní flóry nebo v blízkosti kolonizovaných sliznic (Conway, 1997).

Anaerobní ústní mikroflóra se podílí na chronických sinusitidách a otitidách, které při nedostatečné léčbě mohou vést k mozkovému abscesu a meningitidě. Z chronické sinusitidy při účasti bakteroidů může dojít k nebezpečné orbitocelulitidě s ohrožením oka i mozkových plen (Finegold, 1989). Po aspiraci obsahu z dutiny ústní, zejména je-li v ní lokalizován chronický zánět, může dojít k anaerobní infekci na plicích a pleure. Anaerobní infekce se sem může dostat také metastaticky z hnisavých anaerobních procesů lokalizovaných v oblasti hlavy a krku, z procesů lokalizovaných v břišní dutině nebo z oblasti ženského genitálu, hlavně při pánevní tromboflebitidě mající svůj původ v endometritidě. Zdrojem zánětů v plicích mohou být i operativní zákroky na plicích a hrudníku nebo při jejich poranění (Finegold, 1986).

Anaerobní patogenní bakterie mohou také vyvolávat infekce střev a jejich šíření do břišní dutiny, které vede k rozvoji peritonitidy. K anaerobním infekcím svalů, podkoží a kůže

dochází spontánně ze střeva a dominuje u nich nekróza a nekrotizující fasciitida. Klíčovou anaerobní infekcí ženského genitálu je endometritida, která vzniká v souvislosti s porodem, potratem, po porodnických i gynekologických operacích nebo manipulacích v děložní dutině. Během ní dochází k rychlému průniku bakteroidů do krve a následně k septikémii (Kato et al., 1996) a případně i k metastatickým procesům. Proces z dělohy se také může šířit na adnexa a do parametrií. Původci těchto infekcí jsou bakteroidy ve smíšené flóře, lokalizované na děložním hrdle. Mikroorganismy, které z děložního hrdla proniknou do plodového vaku při porodu, mohou vyvolat amniotidu a u plodu pak pneumonii z aspirace infikované plodové vody a popřípadě i sepsi. Toto onemocnění není časté, ale je typickým příkladem anaerobní infekce nejranějšího věku (Brook, 1989).

Nejčastějšími anaerobními infekcemi přímo volajícími po indikaci léčby pomocí hyperbarické oxygenoterapie jsou smíšené infekce měkkých tkání (viz schéma č. 1) spolu s nekrotizujícími fasciitidami a syndromem tzv. diabetické nohy.

Schéma č. 1: Počet nejčastěji izolovaných druhů anaerobních bakterií izolovaných ze smíšených anaerobních infekcí měkkých tkání (uvedené počty jsou vztaženy ke 100 klinickým vzorkům, ve kterých byly prokázány anaerobní bakterie).

Anaerobní koky	98
<i>Bacteroides fragilis</i> group	64
Černě pigment.druhy <i>Prevotella</i> sp.	25
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	21
<i>Eubacterium</i> sp.	16
<i>Veillonella</i> sp.	7
<i>Clostridium perfringens</i>	5



Obr. č. 2: Černě pigmentující kolonie *Porphyromonas gingivalis* po 72hod. kultivaci na Wilkins-Chalgrenově agaru při 37° C; kmen izolovaný od pacienta s anaerobní lézí dolní končetiny.

Úspěšná eradikace anaerobních infekcí je podmíněna kombinací 3 základních léčebných postupů. V první řadě to je nekompromisní chirurgický debridement anaerobní infekcí nekrotizované tkáně, který je doprovázen adekvátní antibakteriální terapií dle výsledků provedeného mikrobiologického vyšetření. Účinnost obou těchto postupů jednoznačně zesiluje vhodným způsobem prováděná hyperbarická oxygenoterapie.

Naproti tomu bakteriální intoxikace vyvolávané tetanickými a botulinickými neurotoxiny (TeNT a BoNT) nejsou klasickými anaerobními infekcemi. Spočívají ve specifické vazbě těchto toxinů na gangliosidové membrány v nervových synapsích, což brání sekreci acetylcholinu. Tato vazba je ireverzibilní a ani případná hyperbarická oxygenace nevede k požadované změně tohoto stavu. S anaerobními infekcemi je „spojují“ pouze jejich anaerobní bakteriální producenti. **Z tohoto důvodu tyto intoxikace nezakládají důvod k aplikaci hyperbarické oxygenoterapie.**

Citovaná a doporučená literatura

Brook, I. (1989). Pathogenicity of *Bacteroides fragilis* group. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 19, 360 - 376.

Conway, P. L. (1997). Development of intestinal microbiota. *Gastrointestinal Microbiology*, Vol. 2, London, Chapman & Hall, 3-38.

Finegold, S. M. et al. (1986). Anaerobic Infections, Chicago – London, Year Book Medical Publishers, 158-223.

Fukata, M. and Abreu, M. T. (2008). Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene*, 7, 27(2), 234-43.

Gibbon, G. R. and MacFarlane, G. T. (1994). Intestine bacteria and disease. *Human Health: the Contribution of Microorganisms.*, Berlin, Springer, 53-62.

Chmelař, D. (2001). Gastrointestinální trakt – zdroj endogenních anaerobních infekcí. *Správy klinickéj mikrobiologie*, ISSN 1335-8219, SA/2001, Supl. A-2001, str. 87-88.

Chmelař, D., Vrtný, J. (2010). Produkce endotoxinu u bakterií *Bacteroides fragilis* group ve vztahu k onemocněním karcinomem tlustého střeva a rektu u lidí. *Klin Mikrobiol Inf Lek.*, 16 (3), 97-102.

Kato, N., Kato, H., Watanebe, K., Ueno, K. (1996). Association enteropathogenic *Bacteroides fragilis* with bacteremia. *Clin. Infect. Dis.*, 23. (Suppl.1), 83-86.

Otto, B. R., Verweij-Van Vught, A. M. J. J., van Doorn, J, MacLaren, D. M. (1990). Outer membrane protein of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides vulgatus* in relation to iron uptake and virulence. *Microb. Pathogen.*, 4, 279-287.

Patrick, S. (1988). The virulence of *Bacteroides fragilis*. *Rev. Med. Microbiol.*, 4, 40-49.

Poxton, I. R., Brown, R., Sawyerr, A. and Ferguson, A. (1997). Mucosa-associated bacterial flora of the human colon. *J. Med. Microbiol.*, 46, 85-91.

Sawyer, R. G., Adams, R. B ., May, A. K., Rosenlof, I. K., Pruett, T. L. (1995). T cells mediate preexposure-induced increases in murine intraabdominal abscess formation. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 77, 82-88.

Schindler, J. (2009). Ze života bakterií. Praha, *Academia*, str. 83-84.

3 Identifikace anaerobních mikroorganismů

3.1 Novinky v taxonomii anaerobních mikroorganismů

GRAMPOZITIVNÍ ANAEROBNÍ KOKY

<i>Peptococcus niger</i>	<i>Peptococcus niger</i>
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Parvimonas micra</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Micromonas micros</i>
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	New species
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	<i>Peptostreptococcus indolicus</i>
<i>Peptoniphilus harei</i>	<i>Peptostreptococcus harei</i>
<i>Peptoniphilus ivorii</i>	<i>Peptostreptococcus ivorii</i>
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	<i>Peptostreptococcus lacrimalis</i>
<i>Peptoniphilus olsenii</i>	New species
<i>Anaerococcus murdochii</i>	New species
<i>Anaerococcus prevotii</i>	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>
<i>Anaerococcus tetradius</i>	<i>Peptostreptococcus tetradius</i>
<i>Anaerococcus octavius</i>	<i>Peptostreptococcus octavius</i>
<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	<i>Peptostreptococcus hydrogenalis</i>
<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus lactolyticus</i>
<i>Anaerococcus vaginalis</i>	<i>Peptostreptococcus vaginalis</i>
<i>Finegoldia magna</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
<i>Gallicola barnesae</i>	<i>Peptostreptococcus barnesae</i>
<i>Slackia heliotrinireducens corrig</i>	<i>Peptostreptococcus heliotrinireducens</i>
<i>Atopobium parvulum</i>	<i>Streptococcus parvulus</i>
<i>Blautia producta</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i> , <i>Ruminococcus productus</i>
<i>Blautia coccoides</i>	<i>Clostridium coccoides</i>
<i>Blautia wexlerae</i>	New species
<i>Ruminococcus gauvreauii</i>	New species
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus saccharolyticus</i>

GRAMPOZITIVNÍ NESPORULUJÍCÍ TYČKY

Phylum and genus	G1C mol%	Cell characteristics	Major end product(s)	Other features
Actinobacteria				
<i>Actinobaculum</i>	50–57	Straight or slightly curved, branching; singly or in clusters	1/2 (1) A	Saccharolytic
<i>Actinomyces</i>	55–68	Variable, often branching; singly or in pairs	1/2 1 S, L	Saccharolytic
<i>Adlercreutzia</i>	64–67	Cocci	2 1	None Asaccharolytic
<i>Alloscardovia</i>	48	Short, irregularly shaped	1 1 ND	Saccharolytic
<i>Atopobium</i>	35–46	Short, elliptical; singly or in pairs or short chains	2/1 1 L	Saccharolytic
<i>Bifidobacterium</i>	57–64	Variable	2/1 1 A, L	Aciduric

Collinsella	60–61	Short; in chains 2 1 A, F, L Saccharolytic, H ₂ production	
Cryptobacterium	50–51	Short	2 (1) None Asaccharolytic
Eggerthella	62	Cocccobacilli or short rods; in pairs or short chains	2 1 (A, L, S) Asaccharolytic
Gordonibacter	66	Cocccobacilli, motile	2 1 ND Asaccharolytic
Mobiluncus	49–52	Curved with tapered ends; singly or in pairs; motile	2 v S, L, A Saccharolytic
Olsenella	63–64	Short, elliptical; singly/in pairs or short chains	2 1 L, A Saccharolytic
Paraeggerthella	61	Cocccobacilli, in chains	2 1 ND Asaccharolytic
Parascardovia	54–56	Small, slender, variable	2 1 A, L Saccharolytic
Propionibacterium	59–67	Variable	2/1 1 P Saccharolytic
Propioniferax	59–63	Variable, in clusters	1 1 P Saccharolytic
Propionimicrobium	53–54	Variable; often diphtheroid or club-shaped	2 1 P, A, S Saccharolytic
Scardovia	44–46	Small, coccoid, variable	2 1 A, L Saccharolytic
Slackia	60–64	Cocci, cocccobacilli, or short rods; singly or in clumps	
2 (1) (A) Asaccharolytic			
Varibaculum	52	Short, straight or curved, diphtheroid	2/1 1 L, S Saccharolytic
Firmicutes			
Anaerofustis	70	Thin rods	2 1 A, B Saccharolytic
Anaerostipes	46	Thin rods; in short chains	2 (1) A, B, L Saccharolytic
Anaerotruncus	54	Thin rods	2 1 A, B Saccharolytic
Bulleidia	38	Short, straight or slightly curved; singly	2 1 A, L Saccharolytic
“Catabacter”	40	Cocccobacilli or short rods, motile	2 1 ND Saccharolytic
Catenibacterium	36–38	Short; in long tangled chains	2 1 A, B, L Saccharolytic
Dorea	40–46	Short or long; in pairs or chains	2 1 A, F Saccharolytic,
H ₂ production			
Eubacterium	30–57	Variable	2 v B, A, L (F) Saccharolytic
Faecalibacterium	47–57	Pleomorphic rods	2 2 B, F, L Saccharolytic
Filifactor	34	Short, regular	2 2 B Asaccharolytic
Flavonifractor	58–62	Straight or slightly curved rods	2 (1) A, B Asaccharolytic
Holdemania	38	Short; in pairs or short chains	2 (1) A, L Saccharolytic
Lactobacillus	35–53	Short or long, slender; in chains	2/1 1 L Aciduric
Marvinbryantia	50	Short; in pairs or short chains	2 1 A (S, L) Formate required
Mogibacterium	41–50	Short; singly or in clumps	2 (1) PAA Asaccharolytic
Oribacterium	42	Elongated, ovoid; singly or in pairs; highly motile	2 2 A, L Saccharolytic
Pseudoramibacter	61	Pleomorphic; in pairs	2 1 A, B, C, F Saccharolytic
Roseburia	29–42	Thin, pleomorphic rods	2 v B, L Saccharolytic,
H ₂ production			
Shuttleworthia	50–51	Short or slightly curved; singly or in pairs or short chains	2 1 B, A (L) Saccharolytic
Solobacterium	37–39	Short, straight or slightly curved; singly or in pairs	2 1 A, L Saccharolytic
Turicibacter	37	Irregular, long; in long chains	2 1 L Saccharolytic

GRAMNEGATIVNÍ TYČKY

Phylum and genus	Species	Previous nomenclature	Reference(s)
Bacteroidetes			
Alistipes	<i>A. indistinctus</i>	New species	136
	<i>A. onderdonkii</i>	New species	191

	A. shahii	New species	191
Bacteroides	B. cellulosityticus	New species	161
	B. clarus	New species	210
	B. coprophilus	New specie	76
	B. dorei	New species	10
	B. faecis	New species	96
	B. finegoldii	New species	9
	B. fluxus	New species	210
	B. intestinalis	New species	8
	B. oleiciplenus	New species	210
	B. xylanisolvens	New species	28
Barnesiella (new genus)	B. intestinhominis	New species	129, 169
Odoribacter (new genus)	O. laneus	New species	136
	O. splanchnicus	Bacteroides splanchnicus	74
Parabacteroides (new genus)	P. distasonis	Bacteroides distasonis	167
	P. goldsteinii	Bacteroides goldsteinii	167
	P. gordonii	New species	171
	P. johnsonii	New species	168
	P. merdae	Bacteroides merdae	167
Paraprevotella (new genus)	P. clara	New species	130
	P. xylaniphila	New species	130
Phocaeicola (new genus)	P. abscessus	New species	4
Porphyromonas	P. bennonis	New species	196
Prevotella	P. amnii	New species	109
	P. aurantiaca	New species	172
	P. bergensis	New species	42
	P. copri	New species	75
	P. histicola	New species	44
	P. maculosa	New species	43
	P. micans	New species	45
	P. nanceiensis	New species	2
	P. pleuritidis	New species	170
	P. saccharolytica	New species	47
	P. stercorea	New species	75
	P. timonensis	New species	60
Synergistetes (new phylum)			92
Jonquetella (new genus)	J. anthropi	New species	91
Pyramidobacter (new genus)	P. piscolens	New species	46
Firmicutes			
Dialister	D. succinatiphilus	New species	129
Megamonas	M. funiformis	New species	173
Proteobacteria			
Sutterella	S. parvirubra	New species	173
Parasutterella (new genus)	P. excrementihominis	New species	135

4 Vliv kyslíku na růst patogenních anaerobních bakterií

Holý, O., Chmelař, D. Oxygen tolerance in anaerobic pathogenic bacteria. FOL MICROBIOL, (2012)- 57-443-446

Souhrn:

Nezbytným předpokladem pro úspěšný průkaz anaerobních patogenních bakterií ze vzorků klinického materiálu je způsob jejich kultivace. V současné době se k těmto účelům používá několik metod kultivace v anaerobním prostředí. Jedná se o kultivaci v anaerobním boxu (stanicích), v anaerobních hrncích (anaerostatech) a v jednorázových kultivačních soupravách. Cílem této práce bylo porovnat tyto běžně používané způsoby kultivace prostřednictvím růstu běžně izolovaných anaerobních patogenů. Jako testovací mikroorganismy byly použity kmeny bakterií *Bacteroides fragilis*, *Clostridium difficile* a *Clostridium perfringens*. Kvalita růstu jednotlivých testovaných bakterií byla hodnocena pomocí velikosti kolonií. Tyto testované bakteriální kmeny byly exponovány po různě dlouhou dobu vzdušnému kyslíku a následně byly kultivovány ve třech různých kultivačních systémech pro anaerobní bakteriální kultivaci. Jednalo se o systém anaerobního boxu, anaerostatu (anaerobního hrnce) a jednorázový kultivační systém ANAER-kult. Výsledky této práce svědčí o tom, že z testovaných metod kultivace v anaerobním prostředí, je nejlepšími výsledků dosaženo v anaerobním boxu Bactron II (Shel Lab – Sheldon Manufacturing Inc., USA). Jako alternativní způsob kultivace lze stejně dobře použít kultivaci v jednorázových kultivačních soupravách ANAER-kult, (Mirako, ČR). Vhodné jsou zvláště pro svou finanční a materiální nenáročnost a jeví se tak jako ideální pro laboratoře s malými počty vzorků. Další metodou byla kultivace v anaerobním hrnci (Oxoid Ltd., GB). V systému anaerobního boxu, bylo celkově dosaženo nejlepších výsledků. Nebylo tomu tak, ale ve všech případech. V několika případech se jako kvalitnější jevil jednorázový kultivační systém ANAER-kult. Jednalo se o kultivaci *Clostridium perfringens* po 15, 30 a 60 minutách expozice vzdušnému kyslíku a zároveň při kultivaci *Bacteroides fragilis* po 30 a 60 minutách expozice vzdušnému kyslíku. Pro kultivaci náročného *Clostridium difficile* se jako jednoznačně nejlepší kultivační systém jevil anaerobní box. V systému ANAER-kult bylo dosaženo lepších výsledků, než v systému anaerobního hrnce (anaerostatu) a to v téměř všech případech. Při statistickém zpracování zjištěných výsledků, však nebyl zjištěn signifikantní statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými systémy sloužícími k anaerobní kultivaci mikroorganismů.

Klíčová slova:

Anaerobní kultivační systémy, bakteriální růst, toxicita kyslíku.

Úvod

Anaerobní bakterie jsou co do počtu druhů jednou z nejpočetnějších a zároveň nejstarších skupin mikroorganismů. Infekce vyvolávané anaerobními patogenními bakteriemi jsou bez ohledu na jejich četnost a závažnost stále. Je tedy nezbytně nutné, aby se této problematice věnovala patřičná pozornost a s tím i spojená a nutná náročnost a specifická kultivace anaerobních bakterií. Velkým problémem současné klinické mikrobiologie je kultivace klinických materiálů a anaerobních bakterií v anaerobním, bezkyslíkatém prostředí. K zajištění tohoto nezbytného předpokladu slouží celá řada kultivačních postupů. Jedním z nejdůležitějších faktorů je kontinuita kultivace v anaerobním prostředí. S ohledem na tuto skutečnost byly v předkládané práci porovnávány základní typy anaerobních kultivací, které jsou v současné době nejčastěji používány v mikrobiologických laboratořích. Vlastní porovnávání jednotlivých způsobů kultivace bylo prováděno na základě měření velikosti

kolonií testovaných anaerobních patogenních bakterií rostoucích v jednotlivých kultivačních systémech.

Materiál a metodika práce

K testování byly použity jako pokusné (referenční) kultury divoké kmene bakterií *Clostridium perfringens* a *Clostridium difficile* (z Referenční laboratoře ČR pro anaerobní bakterie) a kmen *Bacteroides fragilis* NCTC 25285 vyrostlé po 48 hod. kultivaci při 36,5 °C v anaerobním boxu Bactron II (Shel Lab – Sheldon Manufacturing Inc., USA). Divoké kmene *Clostridium difficile* a *Clostridium perfringens* byly biochemicky identifikovány pomocí identifikačních souprav ANAEROTest 23 (Pliva-Lachema, ČR). Kultury byly vystaveny působení vzdušnému kyslíku po dobu, 15, 30 a 60 minut. Následně byly pomocí křížového rozřezu očkovány na Wilkins-Chalgrenův agar bez beraní krve (Trios, ČR). Petriho misky s takto rozočkovanými kmeny testovaných bakterií pak byly kultivovány v jednotlivých anaerobních systémech. V jeden okamžik byly tedy vyočkovávány 3 kmene (*Bacteroides fragilis* - BAFR, *Clostridium difficile* - CLDI, *Clostridium perfringens* - CLPE) na 3 agarové plotny, z nichž jedna byla uložena v anaerobním boxu, jedna v anaerobním hrnci a jedna v jednorázové kultivační soupravě ANAER-kult. Měření velikosti kolonií bylo prováděno po 48 hod. kultivaci při 36,5 °C v jednotlivých anaerobních systémech. K vlastnímu měření velikosti kolonií byly vybrány vždy 3 kolonie testovaných bakterií z 1. sektoru křížového rozřezu (1. série očkovacích čar od základní čáry). Vlastní měření bylo prováděno pomocí digitální a stereomikroskopu (Arsenal SZP 1102) při přímém zvětšení 12x. Většina technik používaných pro kontrolu kvality (pro pevná média) a způsobu anaerobní kultivace je založena na počítání kolonií. Při hodnocení výsledků plotnové metody se vycházelo z předpokladu, že každá kolonie, narostlá na povrchu nebo v agaru, vyrostla z jedné buňky. Dále bylo nutné dbát na to, aby počet vyočkovaných buněk nebyl příliš vysoký, aby nemohlo docházet ke vzájemnému antagonistickému působení.

Výsledky

Naměřené výsledky průměrů kolonií u jednotlivých testovaných bakteriálních kmenů, kultivačních metod a časových úseků kultivace po expozici vzdušným kyslíkem, byly zpracovány formou tabulky (viz. Tab č. 1) a formou grafů (viz. Graf č. 1,2,3). Ze zjištěných výsledků vyplývá, že u všech testovaných bakteriálních kultur došlo k největšímu nárůstu u kmenů, které byly ihned vyočkovány, a zároveň bylo zjištěno, že s postupujícím časem je jejich nárůst (průměr kolonií) menší. Pro statistické zpracování výsledků byl použit volně dostupný statistický program „R“. Celý model byl zpracován F-testem. Po zpracování naměřených hodnot bylo zjištěno, že hodnota p-value < 6.10⁻⁹, celý model je tedy statisticky významný. Není signifikantní rozdíl v metodě kultivace (viz graf č. 4). Signifikantní rozdíl je v použitém bakteriálním kmene (viz graf č. 5). Signifikantní rozdíl je v použitém čase (viz graf č. 6). Po zprůměrování naměřených hodnot v jednotlivých kultivačních systémech bylo dosaženo těchto průměrných velikostí kolonií. Pro anaerobní box to bylo 2,5 mm, v Anaerobic Jar, byla průměrná hodnota 2,1 mm a v ANAR-kultu to bylo 2,5 mm. Z dosažených výsledků je tedy zřejmé, že rozdíly v těchto jednotlivých kultivačních systémech jsou minimální. Což potvrdilo i statistické zpracování získaných výsledků, kdy bylo zjištěno, že zde není statisticky signifikantní rozdíl. Z průměrných dosažených výsledků je také patrné, že kmen *Clostridium difficile* je nejcitlivější na expozici vzdušným kyslíkem. Rozdíl v nárůstu kolonií u tohoto bakteriálního kmene, v závislosti na délce expozice vzdušným kyslíkem (při porovnání nárůstu kolonie ihned vložené do systému pro anaerobní kultivaci s 60 minutovou délkou expozice vzdušným kyslíkem), byl rozdíl v nárůstu těchto kolonií 2,2 mm. U kmene *Clostridium perfringens* byl tento rozdíl v nárůstu roven 0,9 mm.

V případě bakteriálního kmene *Bacteroides fragilis* se jednalo o 1,1 mm. Tyto závěry byly potvrzeny i statisticky, když bylo zjištěno, že je statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými bakteriálními kmeny a zároveň je statisticky významný rozdíl v délce jednotlivých expozic vzdušným kyslíkem.

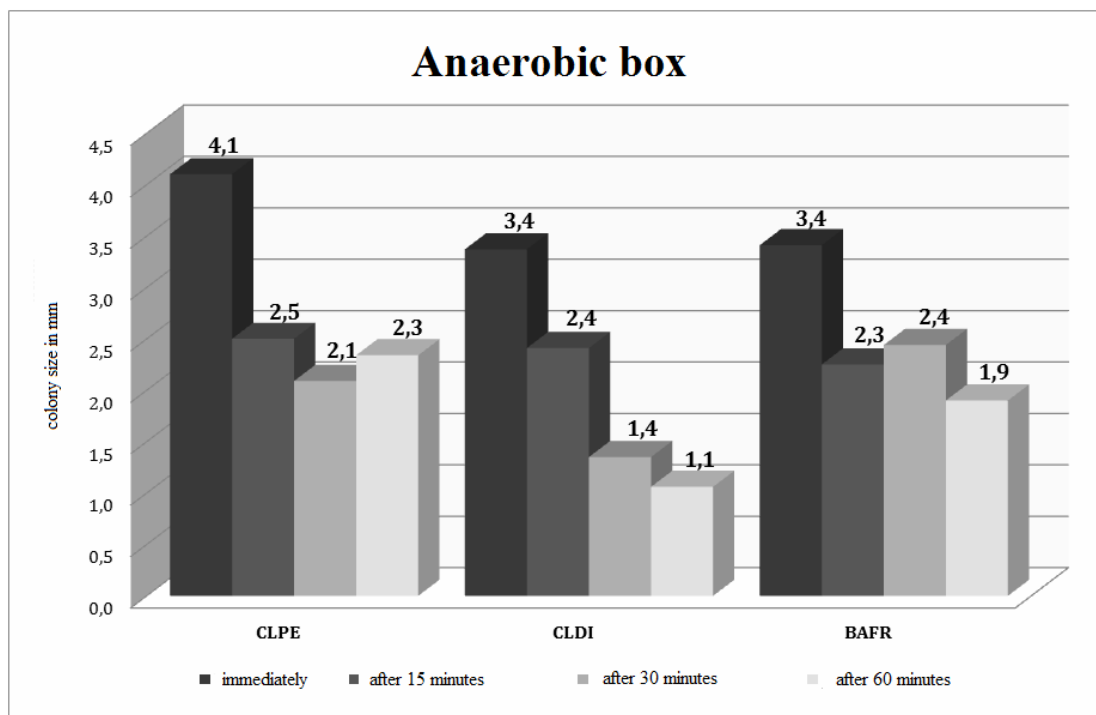
Discussion

Původním předpokladem, co se kvalit kultivačních systémů týče, byla skutečnost, že nejlepších výsledků bude dosaženo v anaerobním boxu, jakožto v systému nejdokonalejším. Následovat měl anaerostat a nejhorších výsledků mělo být dosaženo v ANAER-kultu, neboť se jedná o systém nejméně dokonalý a nejjednodušší. Výsledky, ale byly poněkud odlišné. V systému anaerobního boxu, bylo sice dosahováno nejlepších výsledků, ale ne vždy. V několika případech se jako kvalitnější systém jevil ANAER-kult. Z těchto třech testovaných kultivačních systémů, bylo dosaženo nejhorších výsledků v kultivačním systému anaerostat. Důvodů proč tomu tak je, a proč jsou získané výsledky odlišné od očekávaných, je více. V anaerobním boxu, ve kterém se kontinuálně kultivuje a pracuje, každý vstup do boxu znamená, byť nepatrné, ale přece jen narušení anaerobiózy uvnitř tohoto boxu. Zároveň větší objem pracovního a kultivačního prostředí je náročnější na důkladnou eliminaci kyslíku, což přímo souvisí s velikostí daného boxu, množstvím vzorků a kultivačních ploten uložených v anaerobním boxu. Kultivační systém anaerostat, je systém mnohem méně objemový, než v případě anaerobních boxů. Anaerostaty jsou nejčastěji o objemech 2,5 resp. 3,5 l. V tomto případě se jednalo o 3,5 l anaerostat. Problémem tohoto systému je relativně pomalý nástup anaerobiózy. Ta nastává po asi 20 minutách od vložení GasPaku a uzavření anaerostatu. Dalším problémem je okamžité narušení anaerobiózy, při jakémkoliv otevření anaerostatu. Ta se tedy po každém otevření anaerostatu musí vytvářet znova. U jednorázových kultivačních systémů typu ANAER-kult je výhoda právě v jejich jednoduchosti a hlavně v malých objemech, díky čemuž anaerobióza nastává ihned po aktivaci absorbentu a zatavení (uzavření) plastového kultivačního sáčku. Z výsledků měření velikostí kolonií testovaných anaerobních bakterií bylo zjištěno, že rozdíly ve velikostech průměrů bakteriálních kolonií v závislosti na metodě jejich kultivace nejsou statisticky významné. Rozdíly v jednotlivých metodách kultivace nejsou tedy statisticky významné (viz Graf č. 4). Naopak statisticky významné rozdíly byly zjištěny v případě použití různých bakteriálních kmenů (viz Graf č. 5). Taktéž byl zjištěn statisticky významný rozdíl v časových intervalech, po který byly jednotlivé testované bakteriální kmeny exponovány vzdušným kyslíkem. Z výsledků tedy vyplývá statisticky významný rozdíl ve velikosti nárůstu bakteriálních kolonií, pokud tyto byly vyočkovávány ihned, příp. po 60 minutách expozice vzdušným kyslíkem (viz Graf č. 6). Velmi podobných výsledků, jako v této předkládané práci bylo dosaženo i v jiných studiích. Summanen et al. (1999) porovnávali kvalitu růstu bakteriálních kolonií, různých anaerobních bakterií v různých anaerobních kultivačních systémech. I v této studii bylo potvrzeno, že nárůst anaerobních bakteriálních kultur byl lepší v systému anaerobním boxu než v kultivačním systému anaerostat. Ve studii, kterou provedl Rolfe se svými spolupracovníky (1977), bylo potvrzeno, že kmen *Clostridium perfringens* je aerotolerantnější, než kmen *Bacteroides fragilis*. Všechny tyto výsledky dobře korelují s výsledky získanými v této práci. Kmen *Clostridium difficile*, jakožto striktní anaerobní bakterie, byl ze všech námi testovaných bakteriálních kultur nejméně aerotolerantní.

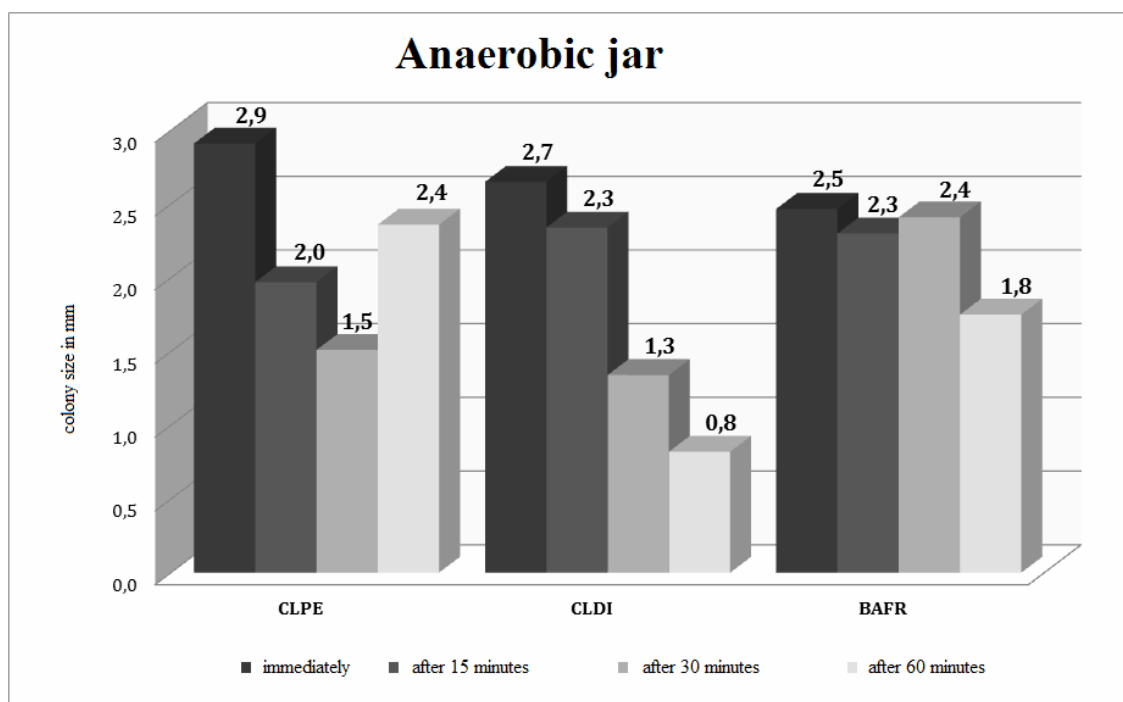
Literatura

Allen SD, Siders JA, Marler LM (1995) Current issues and problems in dealing with anaerobes in the clinical laboratory. Clin Lab Med 15:333–364

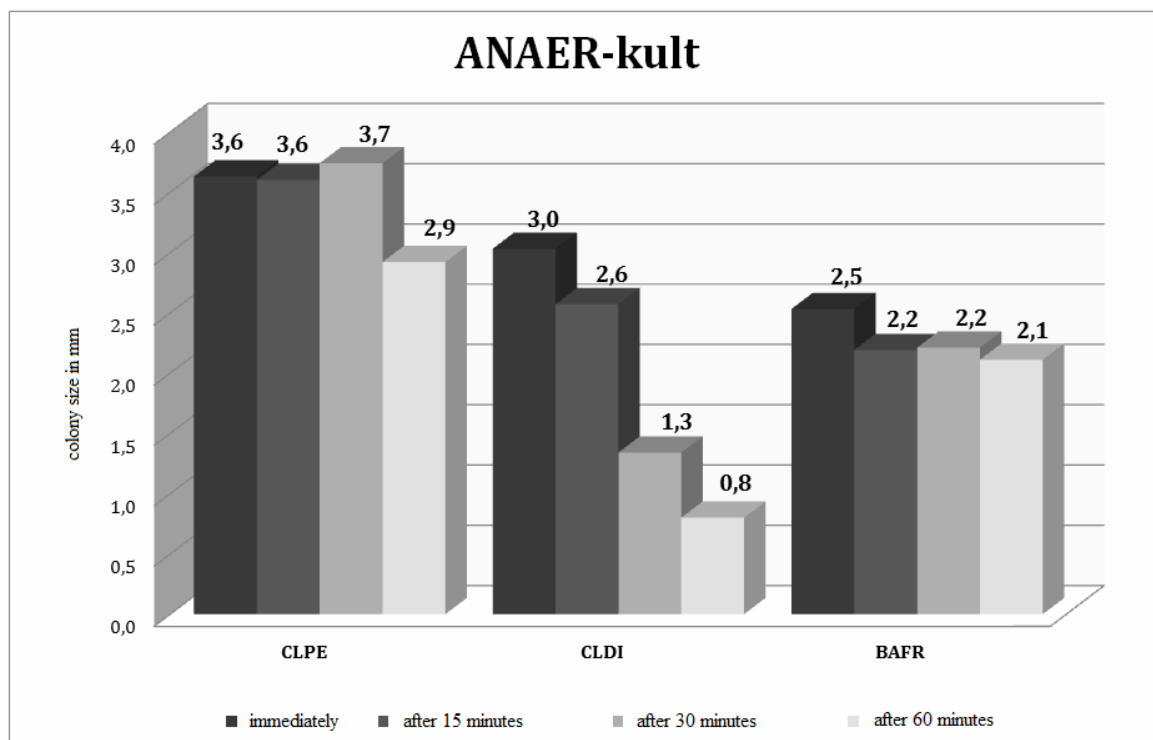
- Baron EJ (2011) Approaches to identification of anaerobic bacteria. In: Versalovic J (ed) Manual of Clinical Microbiology, 10th edn. ASM, Washington D.C., pp 539–558
- Chmelař D (2009) In vitro susceptibility to selected antibiotics in bacteria of the *Bacteroides fragilis* group. *Folia Microbiol (Praha)* 54:353–358
- Cox ME, Kohr RJ, Samia CK (1997) Comparison of quality control results with use of anaerobic chambers versus anaerobic jars. *Clin Infect Dis* 25:S137–S138
- Imhof A, Heinzer I (1996) Continuous monitoring of oxygen concentrations in several systems for cultivation of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 34:1646–1648
- Jean D, Briolat V, Reysset G (2004) Oxidative stress response in *Clostridium perfringens*. *Microbiology* 150:1649–1659
- Mangels JI (1998) Anaerobic bacteriology. In: Isenberg HD (ed) Essentials procedures for clinical microbiology. ASM, Washington D.C., pp 127–167
- Miller PH, Wiggs LS, Miller JM (1995) Evaluation of Anaerobem system for growth of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 33:2388–2391
- Murray PR, Niles AC (1982) Effect of incubation conditions on anaerobi susceptibility testing results. *J Clin Microbiol* 16:1152–1154
- Park Y, Choi JY, Yong D, Lee K, Kim JM (2009) Clinical features and prognostic factors of anaerobic infections: a 7-year retrospective study. *Korean J Intern Med* 24:13–18
- Rolfe RD, Hentges DJ, Barrett JT, Campbell BJ (1977) Oxygen tolerance of human intestinal anaerobes. *Am J Clin Nutr* 30:1762–1769
- Shahin M, Jamal W, Verghese T, Rotimi VO (2003) Komparative evaluation of anoxomat and conventional anaerobic GasPak jar systems for the isolation of anaerobic bacteria. *Med Princ Pract* 12:81–86
- Summanen PH, McTeague MM, Väisänen ML, Strong CA, Finegold SM (1999) Comparison of recovery of anaerobic bacteria usány the Anoxomat, anaerobic chamber, and GasPak jar systems. *Anaerobe* 5:5–9
- Van Horn KG, Warren K, Baccaglioni E (1997) Evaluation of the AnaeroPack system for growth of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 35:2170–2173
- Wilson JR, Limaye AP (2004) Risk factors for mortality in patiens with anaerobic bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23:310–316



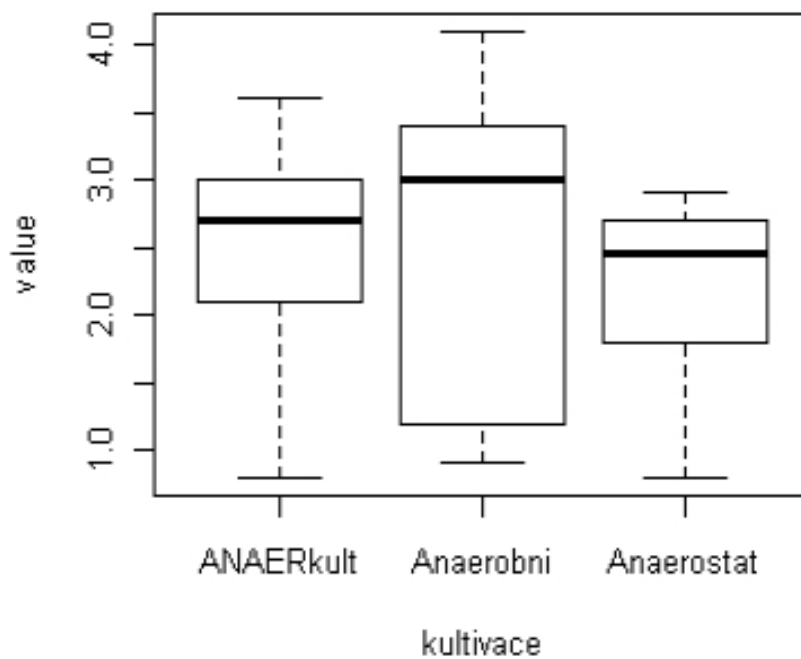
Graf č.1: Průměr kolonií testovaných bakterií v mm po jejich kultivaci v anaerobním boxu v závislosti na typu mikroorganismu a době trvání expozice vzdušným kyslíkem



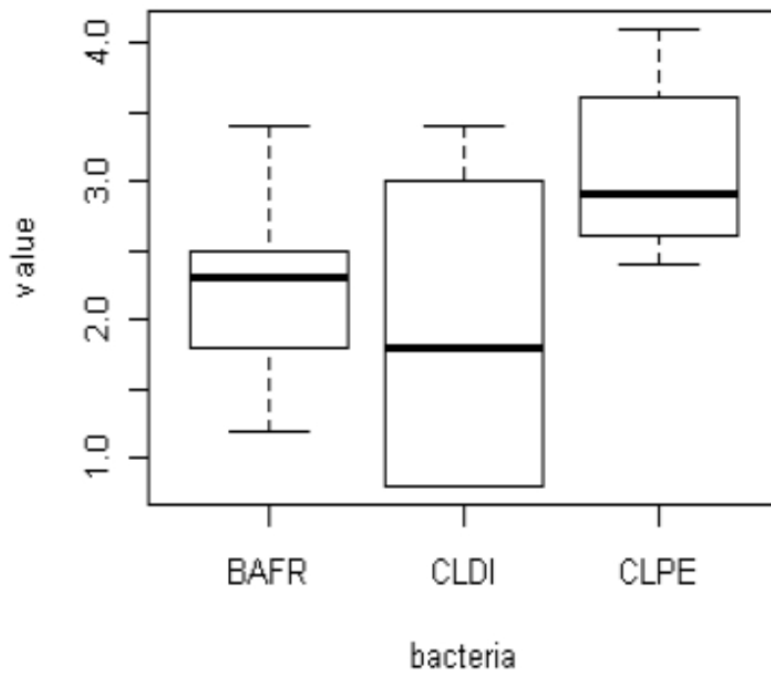
Graf č.2: Průměr kolonií testovaných bakterií v mm po jejich kultivaci v anaerostatu v závislosti na typu mikroorganismu a době trvání expozice vzdušným kyslíkem



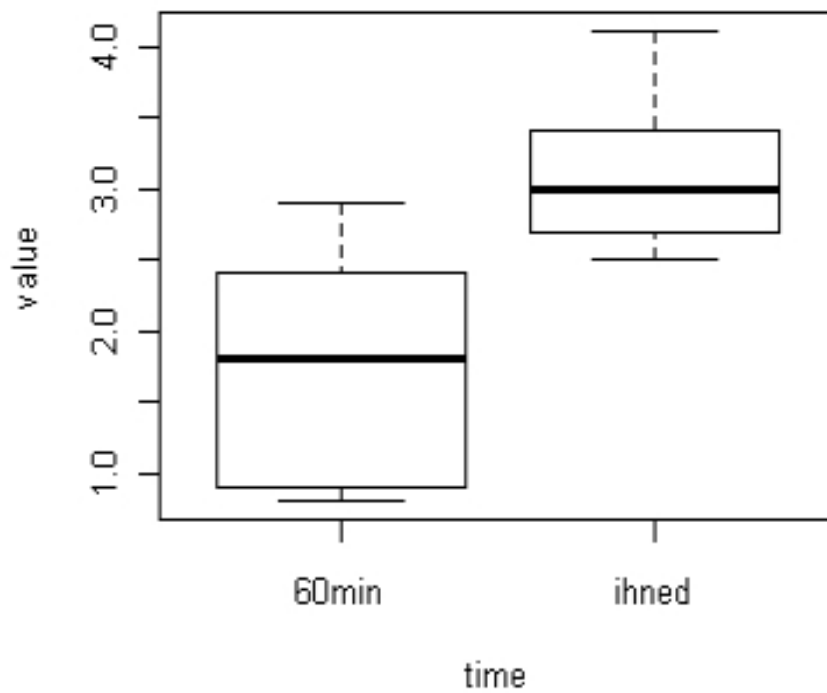
Graf č.3: Průměr kolonií testovaných bakterií v mm po jejich kultivaci v ANAER-kultu v závislosti na typu mikroorganismu a době trvání expozice vzdušným kyslíkem



Graf č.4: Charakteristika statistické významnosti jednotlivých metod kultivace v anaerobním prostředí



Graf č.5: Charakteristika statistické významnosti jednotlivých testovaných bakterií kultivovaných v anaerobním prostředí



Graf č.6: Charakteristika statistické významnosti časové expozice vzdušným kyslíkem

Immediately	Anaerobic Box	Anaerobic Jar	ANAER-kult
CLPE	4,10	2,91	3,63
CLDI	3,37	2,65	3,03
BAFR	3,41	2,47	2,53
After 15 minutes			
CLPE	2,49	1,97	3,60
CLDI	2,66	2,34	2,57
BAFR	2,77	2,30	2,19
After 30 minutes			
CLPE	2,72	1,51	3,74
CLDI	1,84	1,34	1,34
BAFR	1,47	2,41	2,21
After 60 minutes			
CLPE	2,63	2,36	2,92
CLDI	0,94	0,82	0,80
BAFR	1,18	1,75	2,11

Tab. č.1: Zprůměrované velikost kolonií (v mm) pro testované bakteriální kmeny, kultivační metody a časové úseky

5 Stanovení citlivosti na antibiotika u anaerobních patogenních bakterií

ATB

Antimikrobiální látka	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	Citlivý	Střední hodnota	Rezistentní
Amoxicillin/clavulanic acid	<4/2	8/4	>16/8
Ampicillin	<0.5	1	>2
Ampicillin/sulbactam	<8/4	16/8	>32/16
Cefotetan	<16	32	>64
Cefoxitin	<16	32	>64
Chloramphenicol	<8	16	>32
Clindamycin	<2	4	>8
Ertapenem	<4	8	>16
Imipenem	<4	8	>16
Meropenem	<4	8	>16
Metronidazole	<8	16	>32
Moxifloxacin	<2	4	>8
Penicillin	<0.5	1	>2
Piperacillin	<32	64	>128
Piperacillin/tazobactam	<32/4	64/4	>128/4
Tetracycline	<4	8	>16
Ticarcillin/clavulanic acid	<32/2	64/2	>128/2

© Ústav mikrobiologie a imunologie
Katedra biomedicínských oborů
Lékařská fakulta
Ostravská univerzita, 2013



UNIVERSITAS
OSTRAVIENSIS
Facultas Medicinae