

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tamara KOKALJ

**OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE PRI
ANAEROBNIH BAKTERIJAH IZOLIRANIH IZ
KUŽNIN V LABORATORIJU ZA HEMOKULTURE
NA INŠTITUTU ZA MIKROBIOLOGIJO IN
IMUNOLOGIJO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tamara KOKALJ

**OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE PRI ANAEROBNIH
BAKTERIJAH IZOLIRANIH IZ KUŽNIN V LABORATORIJU ZA
HEMOKULTURE NA INŠITITUTU ZA MIKROBIOLOGIJO IN
IMUNOLOGIJO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS IN ANAEROBIC BACTERIA
ISOLATED FROM SPECIMENTS IN LABORATORY OF BLOOD
CULTURES AT THE INSTITUTE OF MICROBIOLOGY AND
IMMUNOLOGY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za hemokulture in druge urgentne mikrobiološke preiskave na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Manica Müller-Premru, za recenzentko prof. dr. Eva Ružić-Sabljić ter za predsednico komisije prof. dr. Darja Žgur-Bertok.

Mentorica: prof. dr. Manica Müller-Premru

Recenzentka: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur-Bertok
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Manica Müller-Premru
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tamara Kokalj

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.24+579.61:615.33 (043)=163.6
KG anaerobne bakterije/okužbe z anaerobnimi bakterijami/ protimikrobne snovi/
antibiotiki/ mehanizmi delovanja antibiotikov/ odpornost anaerobnih bakterij/
občutljivost za antibiotike/ *Bacteroides/ Prevotella/ Clostridium/ Actinobacteria/*
po Gramu pozitivni anaerobni koki
AV KOKALJ, Tamara
SA MÜLLER-PREM RU, Manica (mentorica)/ RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2012
IN OBČUTLJIVOST ZA ANTIBIOTIKE PRI ANAEROBNIH BAKTERIJAH
IZOLIRANIH IZ KUŽNIN V LABORATORIJU ZA HEMOKULTURE NA
INŠITITUTU ZA MIKROBIOLOGIJO IN IMUNOLOGIJO
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XV, 75 str., 21 pregl., 19 sl., 1 pril., 101 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Za zdravljenje okužb povzročenih z anaerobnimi bakterijami se uporablajo antibiotiki penicilin, imipenem, amoksicilin/klavulanska kislina, klindamicin in metronidazol, mehanizmi odpornosti bakterij proti omenjenim antibiotikom pa v današnjem času predstavljajo pereč problem. Za lažje spremjanje odpornosti proti antibiotikom pri različnih vrstah anaerobnih bakterij, smo identificirali izolate anaerobnih bakterij in jim določili občutljivost. Skušali smo ugotoviti, kateri anaerobi se v določenih kužninah najpogosteje pojavljajo in kolikšen delež izolatov je odporen proti omenjenim antibiotikom. Kužnine smo nacepili na Schaedler agar in druga gojišča in po inkubaciji v anaerobni atmosferi izolirali do čiste kulture. Istočasno smo z aerobno kontrolo ugotovili ali je bakterija res anaerob. Izolate smo morfološko in metabolno karakterizirali z barvanjem po Gramu, katalaznim testom in testom indola. S pomočjo različnih komercialnih identifikacijskih sistemov smo izolat dokončno identificirali vsaj do rodu. Za določanje občutljivosti identificiranih bakterij pa smo uporabili test antibiotičnega gradiента: Etest. Dodatno smo z evolucijsko analizo izolatov prikazali še filogenetske odnose med izoliranimi bakterijami glede na izvor izolacije. V trebušnem delu smo izolirali največ predstavnikov rodu *Bacteroides*, v glavi in prsnem delu so prevladovali po Gramu pozitivni koki, iz hemokultur pa smo zopet izolirali največ predstavnikov rodu *Bacteroides*. *Bacteroides fragilis* je naravno odporen proti penicilinu, in tudi sevi ostalih vrst *Bacteroides* so se izkazali kot odporni proti penicilinu. Prav tako je bilo proti penicilinu odpornih 56 % izolatov rodu *Prevotella* in *Porphyromonas*, 17 % izolatov rodu *Clostridium* in le en predstavnik rodu *Fusobacterium*. Kar 18 % izolatov rodu *Bacteroides*, 26 % izolatov skupine rodov *Prevotella* in *Porphyromonas* in 26 % izolatov rodu *Clostridium* je bilo odpornih proti klindamicinu. Prav tako smo odpornost proti klindamicinu ugotovili pri dveh izolatih po Gramu pozitivnih kokov in enemu izolatu po Gramu pozitivnih nesporulirajočih bacilov. Odpornost proti amoksicilin/klavulanski kislini smo zasledili le pri rodovih *Bacteroides* in *Prevotella*. Seva, ki bi bil odporen proti imipenemu nismo izolirali, odporni proti metronidazolu pa so bili le predstavniki *Actinomyces* in *Propionibacterium*, ki so naravno odporni.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.24+579.61:615.33 (043)=163.6
CX anaerobic bacteria/ infections with anaerobic bacteria / antimicrobials/ antibiotics/ action mechanisms of antibiotics/ resistance of anaerobic bacteria/ susceptibility to antibiotics/ *Bacteroides*/ *Prevotella*/ *Clostridium*/ *Actinobacteria*/ Gram-positive anaerobic cocci
AU KOKALJ, Tamara
AA MÜLLER-PREM RU, Manica (supervisor)/ RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2012
TY SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS IN ANAEROBIC BACTERIA ISOLATED FROM SPECIMENTS IN LABORATORY OF BLOOD CULTURES AT THE INSTITUTE OF MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY
DT Graduation thesis (University studies)
NO XV, 75 p., 21 tab., 19 fig., 1 ann., 101 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Penicillin, imipenem, amoxicillin/clavulanic acid, clindamycin and metronidazole are used for treatment of infections caused by anaerobic bacteria, but bacterial resistance mechanisms against these antibiotics represent a major problem. Therefore we identified isolates of anaerobic bacteria and determined their sensitivity, to monitor antibiotic resistance in different types of anaerobic bacteria. We tried to determine which anaerobes are most frequent in specimens and what is proportion of isolates resistant to antibiotics we mentioned. We inoculated specimens to Schaedler agar and other agars and after incubation in anaerobic atmosphere, we isolated them to pure cultures. At the same time we made aerobic control of bacteria to determine whether they really are anaerobes. We morphologically and metabolically characterized isolates with Gram staining, catalase test and indole test. At last we identified isolates at least to genus level using a variety of commercial identification systems. To determine the sensitivity of the bacteria, we used the test of antibiotic gradient: Etest. Additionally we showed phylogenetic relationships between isolated bacteria according to their origin of isolation, using the evolutionary analysis. We had mostly isolated representatives of the genus *Bacteroides* in abdominal part and in blood cultures, but Gram-positive anaerobic cocci were the most dominant in the specimens from head and chest. *Bacteroides fragilis* is naturally resistant to penicillin, and strains of other species of *Bacteroides* were proven to be resistant to penicillin too. In our results 56% of the isolates of the genus *Prevotella* together with *Porphyromonas*, 17% isolates of the genus *Clostridium* and only one representative of the genus *Fusobacterium* were resistant to penicillin. Up to 18% of the isolates of the genus *Bacteroides*, 26% of the isolates of the group of genera *Prevotella* and *Porphyromonas* and 26% of the isolates of the genus *Clostridium* were resistant to clindamycin. Two isolates of Gram-positive anaerobic cocci and one isolate of Gram-positive non-sporulating bacilli were also proven to be resistant to clindamycin. Resistance to amoxicillin/clavulanic acid was detected in the genera *Bacteroides* and *Prevotella*. Strains resistant to imipenem were not isolated and resistance to metronidazole was only present among representatives of genera *Actinomyces* and *Propionibacterium*, which are innately resistant.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ANAEROBNE OKUŽBE	3
2.1.1 Anaerobne bakterije kot normalna flora	4
2.1.2 Rod <i>Clostridium</i>	6
2.1.2.1 <i>Clostridium butyricum</i>	7
2.1.2.2 <i>Clostridium bifermentas</i>	7
2.1.2.3 <i>Clostridium perfringens</i>	8
2.1.3 Po Gramu pozitivni anaerobni koki	9
2.1.3.1 <i>Peptostreptococcus</i>	10
2.1.3.2 <i>Anaerococcus</i>	11
2.1.3.3 <i>Finegoldia</i>	11
2.1.3.4 <i>Parvimonas</i>	11
2.1.3.5 <i>Peptoniphilus</i>	11
2.1.3.6 <i>Peptococcus</i>	12
2.1.4 Po Gramu pozitivni nesporulirajoči anaerobni bacili	12
2.1.4.1 <i>Actinomyces</i>	12
2.1.4.2 <i>Propionibacterium</i>	12
2.1.4.3 <i>Eggerthella</i>	13

2.1.4.4	<i>Bifidobacterium</i>	13
2.1.5	Rod <i>Fusobacterium</i>	13
2.1.6	Rod <i>Porphyromonas</i>	13
2.1.7	Rod <i>Prevotella</i>	14
2.1.8	Rod <i>Bacteroides</i>	14
2.1.9	Rod <i>Parabacteroides</i>	15
2.2	ANTIBIOTIKI IN MEHANIZMI ODPORNOSTI NA ANTIBIOTIKE	15
2.2.1	Mehanizmi delovanja antibiotikov	17
2.2.1.1	Inhibicija sinteze celične stene	17
2.2.1.2	Inhibicija sinteze proteinov	20
2.2.1.3	Inhibicija sinteze jedrnih kislin	22
2.2.1.4	Poškodbe DNA	22
2.2.1.5	Inhibicija delovanja celične membrane	23
2.3	OBČUTLJIVOST ANAEROBNIH BAKTERIJ ZA ANTIBIOTIKE	23
2.3.1	Občutljivost <i>Bacteroides</i> spp. za antibiotike	24
2.3.2	Občutljivost <i>Prevotella</i> spp. in <i>Porphyromonas</i> spp. za antibiotike	25
2.3.3	Občutljivost <i>Fusobacterium</i> spp. za antibiotike	26
2.3.4	Občutljivost <i>Clostridium</i> spp. za antibiotike	26
2.3.5	Občutljivost po Gramu pozitivnih anaerobnih kokov za antibiotike	27
2.3.6	Občutljivost po Gramu pozitivnih nesporulirajočih anaerobnih bacilov za antibiotike	28
3	MATERIALI IN METODE	29
3.1	MATERIAL	29
3.1.1	Kemikalije	29
3.1.2	Laboratorijska oprema	30
3.1.3	Vzorci	31
3.1.4	Gojišča in reagenti	32
3.1.5	Identifikacijski sistemi	33
3.2	METODE	34
3.2.1	Mikrobiološka preiskava tekočin iz normalno sterilnih mest	34
3.2.2	Hemokulture	34
3.2.3	Inkubacija gojišč za izolacijo anaerobnih bakterij	35

3.2.4	Identifikacija anaerobnih bakterij	35
3.2.4.1	Klasične metode identifikacije anaerobnih bakterij	36
3.2.4.1.1	Rast na Schaedler agarju in agarju s kanamicinom, vankomicinom ter z lakirano krvjo	36
3.2.4.1.2	Barvanje po Gramu	36
3.2.4.1.3	Barvanje z akridin oranžem	36
3.2.4.1.4	Katalazni test	37
3.2.4.1.5	Indol test	37
3.2.4.2	Identifikacijski sistem API® rapid ID 32 A	37
3.2.4.3	Identifikacijski sistem VITEK 2 ANC	37
3.2.5	Testi za določanje občutljivosti bakterij za antibiotike	38
3.2.5.1	Kontrola Etestov	39
3.2.6	Filogenetska analiza sorodnosti izoliranih vrst na podlagi primerjave 16S rRNA zaporedij pridobljenih iz podatkovne baze RDP	40
4	REZULTATI	41
4.1	IZOLATI ANAEROBNIH BAKTERIJ	41
4.2	KONTROLE Etestov	45
4.3	DELEŽI ANAEROBNIH BAKTERIJ ODPORNIH PROTI ANTIBIOTIKOM	46
4.3.1	Občutljivost za penicilin, klindamicin in amoksicilin/klavulansko kislino pri izolatih rodu <i>Bacteroides</i>	47
4.3.2	Občutljivost za penicilin, klindamicin in amoksicilin/klavulansko kislino pri izolatih rodu <i>Prevotella</i> in <i>Porphyromonas</i>	48
4.3.3	Občutljivost za penicilin, klindamicin in amoksicilin/klavulansko kislino pri izolatih rodu <i>Clostridium</i>	49
4.3.4	Polimikrobne okužbe	50
4.4	EVOLUCIJSKA ANALIZA IZOLATOV IZ HEMOKULTUR, GLAVE IN PRSNEGA DELA IN TREBUHA	51
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	55
5.1	RAZPRAVA	55
5.2	SKLEPI	60
6	POVZETEK	62

7 VIRI

64

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Najpogosteje anaerobne bakterije prisotne v normalni flori človeka (Finegold in sod., 1992; Finegold in Jousimies-Somer, 1997).	4
Preglednica 2: Aktivnost penicilina, amoksicilin/klavulanske kisline, meropenema, klindamicina in metronidazola proti različnim skupinam anaerobnih bakterij iz dveh belgijskih bolnišnic. (Glupczynski in sod., 2008: 264).	24
Preglednica 3: Deleži odpornosti proti določenim antibiotikom pri izolatih bakterij <i>Bacteroides fragilis</i> skupine od leta 1981 do leta 2007 v ZDA (Snydman in sod., 2010: S27).	25
Preglednica 4: Deleži posameznih vrst med najpogosteje izoliranimi po Gramu pozitivnimi anaerobnimi koki (Brazier in sod., 2008).	27
Preglednica 5: Število proti klindamicinu in penicilinu odpornih izolatov posameznih vrst po Gramu pozitivnih kokov (Brazier in sod., 2008).	27
Preglednica 6: Kemikalije in dodatki uporabljeni pri pripravi gojišč za kultivacijo in identifikacijo izolatov.	29
Preglednica 6: Kemikalije in dodatki uporabljeni pri pripravi gojišč za kultivacijo in identifikacijo izolatov.	30
Preglednica 7: Laboratorijska oprema uporabljena pri kultivaciji in identifikaciji izolatov.	30
Preglednica 8: Preiskovani punktati telesnih tekočin.	31
Preglednica 9: Gojišča in reagenti, ki smo jih uporabljali za kultivacijo, izolacijo in identifikacijo bakterij.	32
Preglednica 10: Identifikacijski sistemi uporabljeni pri identifikaciji izolatov.	33
Preglednica 11: Sistemi, gojišča in namen pri preiskovanju hemokutur.	34
Preglednica 12: Etesti za določanje občutljivosti anaerobnih bakterij na antibiotike in mejne vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije.	39
Preglednica 13: Vrednosti MIK pri sevu <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC [®] 25285 (CLSI, 2007).	39
Preglednica 14: Število in deleži izolatov anaerobnih bakterij glede na kužnine iz katere so bili izolirani.	41

Preglednica 15: Število (%) anaerobnih bakterij po skupinah iz različnih kužnin.	43
Preglednica 16: Rezultati kontrole veljavnosti uporabljenih Etestov s sevom <i>Bacteroides fragilis</i> ATCC® 25285.	45
Preglednica 17: Število (%) anaerobov odpornih proti penicilinu, klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini.	47
Preglednica 18: Število izolatov znotraj <i>Bacteroides</i> spp., <i>Parabacteroides distasonis</i> in <i>Pseudoflavonifractor capillosus</i> odpornih proti klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini.	48
Preglednica 19: Število izolatov znotraj vrst rodu <i>Prevotella</i> in <i>Porphyromonas</i> odpornih proti penicilinu, klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini.	49
Preglednica 20: Število izolatov znotraj vrst rodu <i>Clostridium</i> odpornih proti penicilinu, klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini.	50
Preglednica 21: Število izolatov iz mešanih okužb anaerobnih, fakultativno anaerobnih in aerobnih bakterij.	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Za posamezna mesta specifični deleži bakterij v normalni flori pri zdravem človeku, glede na debla v katera jih taksonomsko uvrščamo (Dethlefsen in sod., 2007: 813).	5
Slika 2: Filogenetsko drevo 16S rRNA genskih zaporedij, ki predstavljajo skupine bakterij najpogostejših v človeškem črevesju oz. fecesu (Zoetendal in sod. 2006: 1641).	6
Slika 3: Graf za ločevanje nekaterih po Gramu pozitivnih anaerobnih kokov na podlagi raziskav izolatov (Song in sod., 2007: 515).	10
Slika 4: Beta-laktamski obroč (Franklin in Snow, 2005: 34).	18
Slika 5: Jedro kemijske formule penicilina (Franklin in Snow, 2005: 34).	18
Slika 6: Formula benzilpenicilina (penicilin G) (Franklin in Snow, 2005: 34).	18
Slika 7: Kemijska formula imipenema (Imipenem-compound ... , 2005).	19
Slika 8: Kemijska formula klavulanske kisline (Franklin in Snow, 2005: 35).	20
Slika 9: Formula kanamicina A (Franklin in Snow, 2005: 95).	21
Slika 10: Kemijska formula klindamicina (Franklin in Snow, 2005: 100).	21
Slika 11: Kemijska formula metronidazola (Franklin in Snow, 2005: 108).	22
Slika 12: Deleži izolatov anaerobnih bakterij glede na vrsto kužnine, iz katere so bile izolirane.	41
Slika 13: Deleži posameznih bakterijskih skupin glede na lokacijo izolacije. Oznake: 1- glava in prsni del, 2- hemokulture, 3- trebuh.	43
Slika 14: Mikroskopske slike izolatov vrste <i>Bacteroides fragilis</i> , izolirane iz abdominalnega abscesa (A), bakterij <i>Clostridium</i> spp. izoliranih iz hemokultur (B) in <i>Fusobacterium nucleatum</i> izolirane iz plevralnega puntata (C).	44
Slika 15: Za metronidazol občutljiv izolat (A). Proti klindamicinu in penicilinu odporen izolat (B).	46
Slika 16: Fotografija mešane kulture brisa abdominalnega abscesa na Schaedler agarju.	51
Slika 17: Filogram koreninjen z <i>Escherichia coli</i> , ki prikazuje filogenetske odnose med posameznimi bakterijskimi izolati iz trebuha.	52

Slika 18: Filogram koreninjen z *Escherichia coli*, ki prikazuje filogenetske odnose
med posameznimi bakterijskimi izolati glave in prsnega dela. 53

Slika 19: Filogram koreninjen z *Escherichia coli*, ki prikazuje filogenetske odnose
med posameznimi bakterijskimi izolati iz hemokultur. 54

KAZALO PRILOG

Priloga A: Število vseh izolatov anaerobnih bakterij razporejenih po vrstah in izvoru kužnine.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

α -GLU	α -glukozidaza
β -GAL	β -galaktozidaza
β -GUR	β -glukuronidaza
AlkP	alkalne fosfataza
AMD	arilamidaza
ArgA	arginin arilamidaza
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>B. caccae</i>	<i>Bacteroides caccae</i>
<i>B. ovatus</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
<i>B. vulgatus</i>	<i>B. vulgatus</i>
<i>C. bifermentas</i>	<i>Clostridium bifermentas</i>
<i>C. butyricum</i>	<i>C. butyricum</i>
<i>C. clostridioforme</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
<i>C. paraputrificum</i>	<i>Clostridium paraputrificum</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>C. ramosum</i>	<i>Clostridium ramosum</i>
<i>C. septicum</i>	<i>Clostridium septicum</i>
<i>C. sporogenes</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>
<i>C. tertium</i>	<i>Clostridium tertium</i>
ČA	čokoladni agar
DNAza	deoksiribonukleaza
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. »deoxyribonucleic acid«)
ESBL	bakterije z razširjenim spektrom beta-laktamaz (ang. »extended spectrum beta lactamase«)
FB reagent	Fast Blue reagent
<i>F. magna</i>	<i>Finegoldia magna</i>
<i>F. necrophorum</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
GGA	glutamil glutamat (ang. »glutamyl-glutamic acid«)
GPAC	po Gramu pozitivni anaerobni koki (ang. »Gram-positive anaerobic cocci«)
GPNAB	po Gramu pozitivni nesporulirajoči anaerobni bacili (ang. Gram-positive non-sporulating anaerobic bacilli)
h	ura
I	delno odporen
KA	krvni agar
KVLB	kanamicin, vankomicin agar z lakirano krvjo (ang. »kanamycin-vancomycin laked blood agar«)

MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
min	minuta
mRNA	sporočilna ribonukleinska kislina (ang. »messenger ribonucleic acid«)
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i> (ang. »methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> «)
NJ	sosedsko pridružitvena metoda (ang. »neighbor-joining«)
NPS	natrijev poliatenolsulfonat
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>P. anaerobius</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>P. buccae</i>	<i>Prevotella buccae</i>
<i>P. buccalis</i>	<i>Prevotella buccalis</i>
<i>P. capillosus</i>	<i>Pseudoflavonifractor capillosus</i>
<i>P. denticola</i>	<i>Prevotella denticola</i>
<i>P. disiens</i>	<i>Prevotella disiens</i>
<i>P. distasonis</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>Prevotella gingivalis</i>
<i>P. indolicus</i>	<i>Peptoniphilus indolicus</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. loeschi</i>	<i>Prevotella loeschi</i>
<i>P. melaninogenica</i>	<i>Prevotella melanonogenica</i>
<i>P. micra</i>	<i>Parvimonas micra</i>
PBP	bakterijski proteini, ki vežejo penicilin (ang. »penicillin binding proteins«)
ProA	prolin arilamidaza
PRSP	proti penicilinu G odporen <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ang. »penicillin resistant <i>Streptococcus pneumoniae</i> «)
PyrA	piroglutamil arilamidaza
R	odporen
RDP	Ribosomska podatkovna zbirka (ang. »ribosomal database project«)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (ang. »ribosomal ribonucleic acid«)
S	občutljiv
s	sekunda
Sch	Schaedler agar
SerA	serin arilamidaza
SOP	standardni operativni postopki
spp.	latinska okrajšava za več vrst nekega rodu
št.	število
tRNA	prenašalna ribonukleinska kislina (ang. »transfer ribonucleic acid«)
URE test	test za prisotnosti ureaze
VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki (ang. »vancomycin-resistant enterococci«)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Anaerobne bakterije so razširjene kot del normalne flore človeka na vseh sluzničnih površinah. Sluznična pregrada se lahko prekine z operacijo, rano ali različnimi boleznimi, kar pa daje priložnost, da anaerobne bakterije vdrejo globlje v tkivo, kjer povzročijo infekcije. Te povzročajo običajno skupaj z aerobnimi in fakultativno anaerobnimi bakterijami.

Po kultivaciji vzorcev na gojiščih in izolaciji se občutljivost anaerobnih bakterij za antibiotike določa z dilucijsko metodo ali z metodo antibiotičnega gradienta. S takšnim načinom analize je bilo ugotovljeno, da *Bacteroides fragilis* vedno nosi zapise za kromosomske beta-laktamaze iz razreda C, torej je ta vrsta odporna proti penicilinu in nekaterim cefalosporinom. Tudi drugi, *Bacteroides* spp. in *Prevotella* spp., imajo pogosto ta encim. Pri *Clostridium* spp. redko opisujejo prisotnost beta-laktamaz, so pa opisali proti penicilinu odporne izolate, ki imajo spremenjene tarčne beljakovine, kamor se veže penicilin. Zadnje čase pri teh vrstah bakterij opažajo pogostejšo pojavnost odpornosti proti klindamicinu zaradi modifikacije nekaterih ribosomskih tarč.

Do pred nekaj let so bili vzorci odpornosti precej predvidljivi in stabilni, vendar je velika poraba antibiotikov povzročila pogostejše pojavljanje odpornosti proti tem učinkovinam. Občutljivost anaerobnih bakterij za antibiotike moramo obvezno spremljati, saj se bodo na podlagi teh raziskav zdravniki v bolnišnicah, kjer je stanje bolnikov ponavadi kritično, lažje odločili za empirično zdravljenje.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

V naši nalogi želimo določiti katere anaerobne bakterije se v določenih kužninah najpogosteje pojavljajo in kakšna je njihova občutljivost za antibiotike.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Na podlagi predhodnih raziskav menimo, da bomo iz kužnin iz predela abdomna izolirali več anaerobnih bakterij kot iz kužnin iz ostalih predelov telesa. Prav tako menimo, da bomo v kužninah iz abdomna pogosteje osamili bakterije *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. in *Prevotella* spp. V kužninah iz prsne votline, vratu in glave pa pričakujemo v večjem številu anaerobne po Gramu pozitivne koke, saj v teh predelih že v normalni flori človeka ti mikroorganizmi prevladujejo. Med izolati iz hemokultur bodo po našem mnenju prevladovali *Bacteroides* spp., še posebej *B. fragilis*.

Pričakujemo, da bodo bakterije rodov *Bacteroides* in *Prevotella* pogosteje odporne proti penicilinu in proti klindamicinu kot druge anaerobne bakterije, saj so v obstoječih raziskavah že opisali naravno prisotne in pridobljene gene za odpornost pri teh dveh rodovih. Pogostejši pojav odpornosti proti klindamicinu pričakujemo tudi pri vrstah rodu *Clostridium*.

Predvidevamo, da bo med izolati odpornost proti klindamicinu in penicilinu bolj pogosta kot odpornost proti amoksicilin/klavulanski kislini, imipenemu in metronidazolu.

Pričakujemo, da bo odpornost proti metronidazolu prisotna pri več kot polovici izolatov bakterij debla *Actinobacteria*. Med ostalimi skupinami verjetno ne bomo našli proti metronidazolu odpornih izolatov, čeprav bi lahko na podlagi predhodnih raziskav pričakovali izolacijo proti metronidazolu odpornega *B. fragilis*.

Prav tako predvidevamo, da bomo s filogenetskim drevesom, konstruiranim na podlagi 16S rRNA zaporedij, ki jih bomo pridobili iz podatkovne baze RDP prikazali sorodnost med anaerobnimi bakterijami, ki povzročajo okužbe, istočasno pa bomo s pomočjo filogenetskih dreves prikazali tudi razliko v pojavnosti anaerobnih bakterijskih vrst v kužninah trebušnega predela, kužninah predela glave in prsnega dela ter v hemokulturah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANAEROBNE OKUŽBE

Anaerobne bakterije so prisotne na sluzničnih površinah in koži kot del normalne flore. Predele pod sluznicami lahko okužijo ob prekinitvi sluznične bariere, do katere pride npr. z operacijo, travmo ali različnimi bolezenskimi stanji. Odmiranje tkiva in slaba prekravljeno zmanjšata oksidacijsko-reduksijski potencial in s tem tudi olajšata rast anaerobnim bakterijam. Vaskularne bolezni, mraz, šok, travma, operacije, malignost, edem in produkcija plinov drugih bakterij podobno lahko vodijo do anaerobne okužbe (Finegold in sod., 1992). Le redko pa pride do anaerobne okužbe zaradi zunanjega vira, v primeru, da se to zgodi so najpogosteji povzročitelji nekateri predstavniki *Clostridium* spp. (Nagy, 2010). Anaerobne okužbe so dostikrat tudi polimikrobne okužbe, kjer je udeleženih več anaerobnih bakterij ali pa celo anaerobnih in aerobnih bakterij (Finegold in sod., 1992).

Anaerobi, še posebej *B. fragilis*, povzročijo abscese na mestu vstopa, v slabšem primeru pa lahko dosežejo krvni obtok in povzročijo sepsko (Jousimies-Somer in Finegold, 1984; Nguyen in sod., 2000). Omenjena anaerobna bakteriemija je ponavadi posledica primarne okužbe v črevesju, ženskem genitalnem traktu, respiratornem traktu, v ustni votlini ali pa v mehkem tkivu.

V predhodnih raziskavah se je izkazalo, da največji delež anaerobnih okužb predstavlja znotraj trebušne okužbe (Wybo in sod., 2007). Okužbe v trebušnem predelu pogosteje povzročijo po Gramu negativni anaerobni bacili npr. *Bacteroides* spp. in *Prevotella* spp., po Gramu pozitivni anaerobni koki (GPAC, ang. »Gram-positive anaerobic cocci«), *Fusobacterium* spp. in predstavniki *Clostridium* spp., ki pa lahko povzročijo resne zaplete (Nagy, 2010). Anaerobne vaginalne okužbe ponavadi povzročajo *Prevotella* spp. in *Peptostreptococcus* spp. (Nagy, 2010).

Resne okužbe v glavi in vratu so lahko posledica okužbe z komenzali iz ustne votline kot sta *Porphyromonas gingivalis* in *Prevotella melaninogenica* (Nagy, 2010), medtem ko kronični otitis in sinusitis lahko povzročijo predstavniki rodu *Bacteroides* (Brook, 2008). V možganskih abscesih prevladujejo *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp. in GPAC (Nagy,

2010). *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp. in *Peptostreptococcus* spp., pa lahko povzročijo respiratorne bolezni kot so aspiracijska pljučnica, nekrotizirajoča pljučnica, pljučni absces ali gnojenje (Marik, 2001).

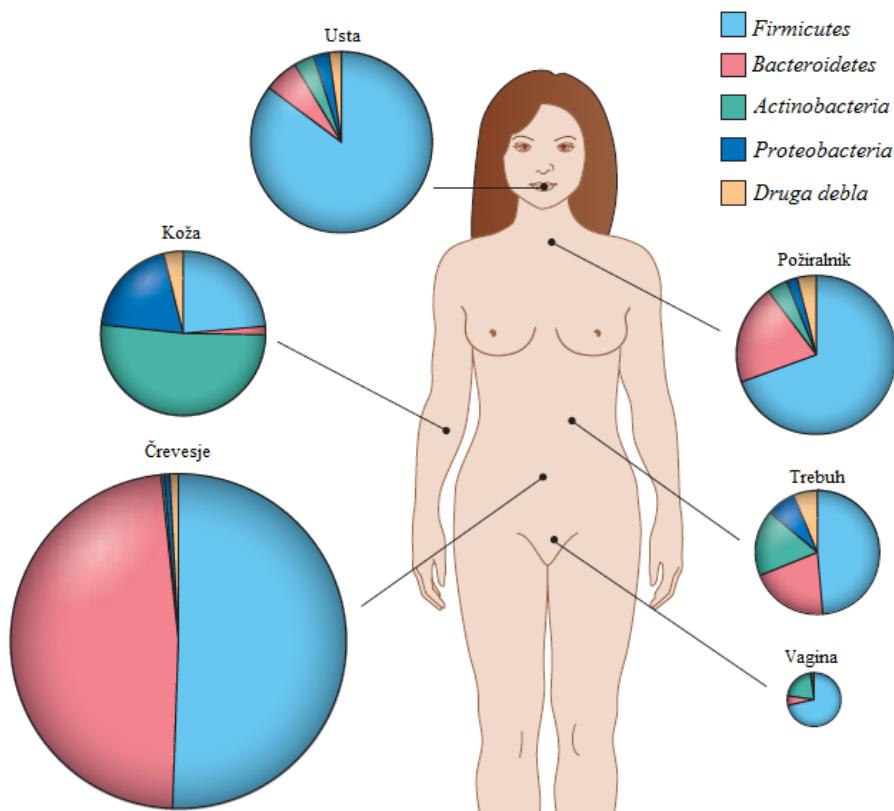
2.1.1 Anaerobne bakterije kot normalna flora

Metode, ki temeljijo na analizi genskih zaporedij so v zadnjih časih pripomogle k poznovanju celotne normalne flore človeka in ne samo mikroorganizmov, ki smo jih sposobni kultivirati (Dethlefsen in sod., 2007; Bik in sod., 2006; Aas in sod., 2005; Eckburg in sod., 2005; Pei in sod., 2004). Večina anaerobnih bakterij v okuženih tkivih izvira iz normalne flore človeka (preglednica 1, slika 1), zato je pri razumevanju patogeneze teh mikroorganizmov ključno tudi poznavanje teh, bodisi komenzalov, bodisi simbiontov ali pa tudi patogenih mikroorganizmov človeškega tkiva. Mikroorganizmi se pri človeku pretežno pojavljajo na koži, sluzničnih površinah in v črevesju, kjer se pri vseh ljudeh v istih habitatih pojavljajo tudi bakterije, ki taksonomsko spadajo v ista debla, družine in tudi robove, razlika pri posameznikih je le v vrstah rodov teh bakterij (Dethlefsen in sod., 2007; Eckburg in sod., 2005; Vanhoutte in sod., 2004; Ley in sod., 2006).

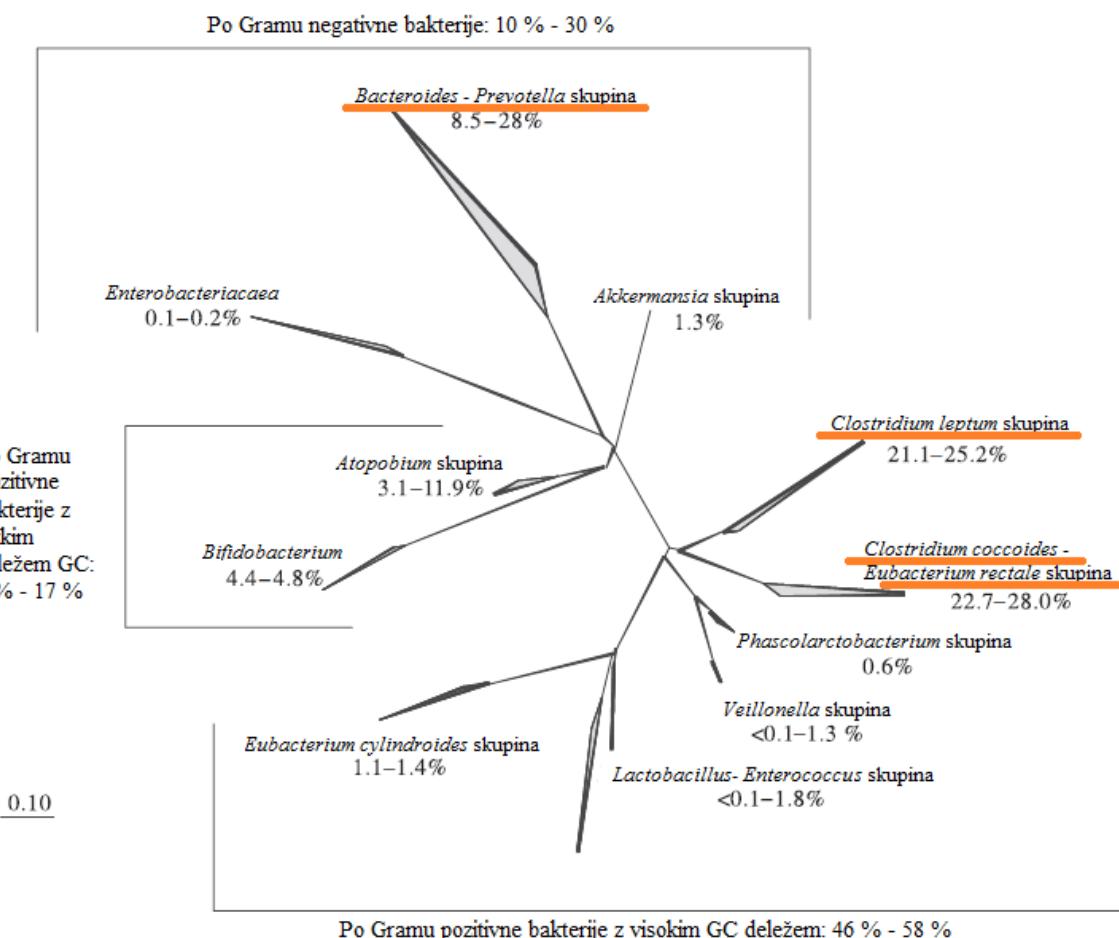
Preglednica 1: Najpogostejše anaerobne bakterije prisotne v normalni flori človeka (Finegold in sod., 1992; Finegold in Jousimies-Somer, 1997).

Predel človeka	Najpogosteje prisotne anaerobne bakterije
Ustna votlina in zgornji respiratorični del	Pigmentirani predstavniki rodov <i>Bacteroides</i> in <i>Porphyromonas</i> , predstavniki skupine <i>Bacteroides oralis</i> , <i>Actinomyces</i> spp., <i>Fusobacterium nucleatum</i> , vsi predstavniki po Gramu pozitivnih kokov.
Koža	<i>Peptostreptococcus</i> spp., <i>Propionibacterium acnes</i> .
Debelo črevo	Predstavniki skupine <i>B. fragilis</i> , <i>Bilophila wadsworthia</i> , vsi tipi anaerobnih kokov, predstavniki rodu <i>Clostridium</i> , <i>Eubacterium</i> in <i>Bifidobacterium</i> , tudi predstavniki rodov <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> in <i>Fusobacterium</i>
Ženski genitalni trakt	Pigmentirani predstavniki rodu <i>Bacteroides</i> in <i>Porphyromonas</i> , drugi predstavniki rodu <i>Bacteroides</i> , še posebej <i>Bacteroides bivius</i> in <i>Bacteroides disiens</i> , predstavniki rodu <i>Peptostreptococcus</i> in <i>Clostridium</i> .

V črevesju nad vsemi drugimi debli prevladujeta debli *Bacteroidetes* in *Firmicutes* skoraj v enakem deležu. Deblo *Firmicutes* prevladuje z več kot polovičnim deležem tudi v ustih, požiralniku in vagini, na koži pa največji delež pripada deblu *Actinobacteria*. V trebuhu deblo *Firmicutes* obsega skoraj polovico, vendar jim sledijo *Bacteroidetes* in *Actinobacteria* (slika 1, slika 2) (Zoetendal in sod. 2006, Dethlefsen in sod. 2007).



Slika 1: Za posamezna mesta specifični deleži bakterij v normalni flori pri zdravem človeku, glede na debla v katera jih taksonomsko uvrščamo. Izolati so bili identificirani na podlagi analize 16S rRNA (Dethlefsen in sod., 2007: 813).



Slika 2: Filogenetsko drevo 16S rRNA genskih zaporedij, ki predstavljajo skupine bakterij najpogostejših v človeškem črevesju oz. fecesu. Podčrtani predstavniki predstavljajo največje deleže izolatov (Zoetendal in sod. 2006: 1641).

2.1.2 Rod *Clostridium*

Taksonomsko rod *Clostridium* uvrščamo v deblo *Firmicutes*, razred *Clostridia*, red *Clostridiales* in družino *Clostridiaceae*. So ubikvitarne anaerobne bakterije prisotne v zemlji, vodi in kot normalna flora pri ljudeh in živalih. Najprej je bil ta rod definiran na podlagi štirih lastnosti: prisotnosti endospor, striktno anaerobnemu metabolizmu, nesposobnosti redukcije sulfata do sulfita in po Gramu pozitivni celični steni (primer na sliki 14). Seveda obstajajo izjeme, ki jih vseeno uvrščamo v ta rod – npr. pri *Clostridium perfringens* in *Clostridium ramosum* so spore le redko prisotne, *Clostridium histolyticum* je tudi aerotoleranten, nekateri predstavniki pa se lahko obarvajo po Gramu negativno

(*Clostridium clostridioforme*, *C. ramosum*) (Rainey in sod., 2009). Bakterije tega rodu so odgovorne tudi za bolezni kot so tetanus, botulizem, plinska gangrena in diareja, ki so ogrožale življenja predvsem v preteklosti. V današnjem času največkrat povzročajo okužbe kože in mehkega tkiva, zastrupitve s hrano, z antibiotiki povezano diarejo in kolitis (Murray in sod., 2009).

2.1.2.1 *Clostridium butyricum*

Ta vrsta je tipski sev rodu *Clostridium*. Velikost celic je $0,5\text{--}0,7 \times 2,4\text{--}7,6 \mu\text{m}$. So na koncih zaobljene palčke, peritriho flagelirane, obarvajo pa se po Gramu pozitivno. Pojavljajo se posamezno, v parih, občasno v verižicah in redkeje tudi kot dolgi filamenti. Spore, ki jih tvorijo, so ovalne oblike, locirane so centralno ali subterminalno, ponavadi ne povzročijo nabrekanja celic prisotne pa so tako v tekočem kot v trdnem gojišču. Optimalno rastejo pri temperaturah od 30 do 37°C , rastejo pa tudi pri 10°C . Fermentabilni ogljikovi hidrati spodbudijo rast, prisotnost 6,5 % NaCl pa rast inhibira. Fermentirajo pektin, fiksirajo N_2 , reducirajo resazurin in nevtralno rdeče. Opazili so tudi, da imajo deoksiribonukleaze (DNAze). Ne razgradijo laktata in treonina. V pepton kvas glukoza tekočem gojišču producirajo butirat, acetat, format, laktat, sukcinat, včasih tudi butanol in etanol (Rainey in sod., 2009). Redko ta bakterija lahko povzroči botulizem (Murray in sod., 2009).

2.1.2.2 *Clostridium bifermentas*

Morfološko so celice ravne palčke, gibljive s peritriho flagelacijo, ki se barvajo po Gramu pozitivno. Pojavljajo se posamezno, v parih ali v kratkih verigah. Njihova velikost je $0,6\text{--}1,9 \times 1,6\text{--}11,0 \mu\text{m}$. Spore so ovalne oblike, locirane so centralno ali subterminalno in ponavadi ne nabrekajo celice. Sporulirajo tako v tekočem kot v trdnem mediju, vendar lahko vsebina medija v katerem sporulirajo vpliva na kemično sestavo spore, stopnjo germinacije in na odpornost spore proti visoki temperaturi in kemičnim agensom. Posledično so zasledili 6 različnih tipov spor. Optimalno rastejo pri temperaturi od 30 do 37°C , rastejo pa skoraj enako tudi pri 25°C ali 45°C . Prisotnost 6,5 % NaCl in 20 % žolča inhibira njihovo rast. Reducirajo nevtralno rdeče in variabilno tudi resazurin.

Producirajo amoniak in v pepton kvas glukoza tekočem gojišču producirajo: v velikih količinah acetat in format, v manjših količinah pa isobutirat, izovalerat, izokaproat, etilalkohol in drugo. Sposobni so izrabe prolina, serina, treonina in aspartata, vendar niso sposobni pretvorbe laktata v propionat Večina sevov je betahemolitičnih in nekateri sev nosijo zapis za DNAzo (Rainey in sod., 2009).

2.1.2.3 *Clostridium perfringens*

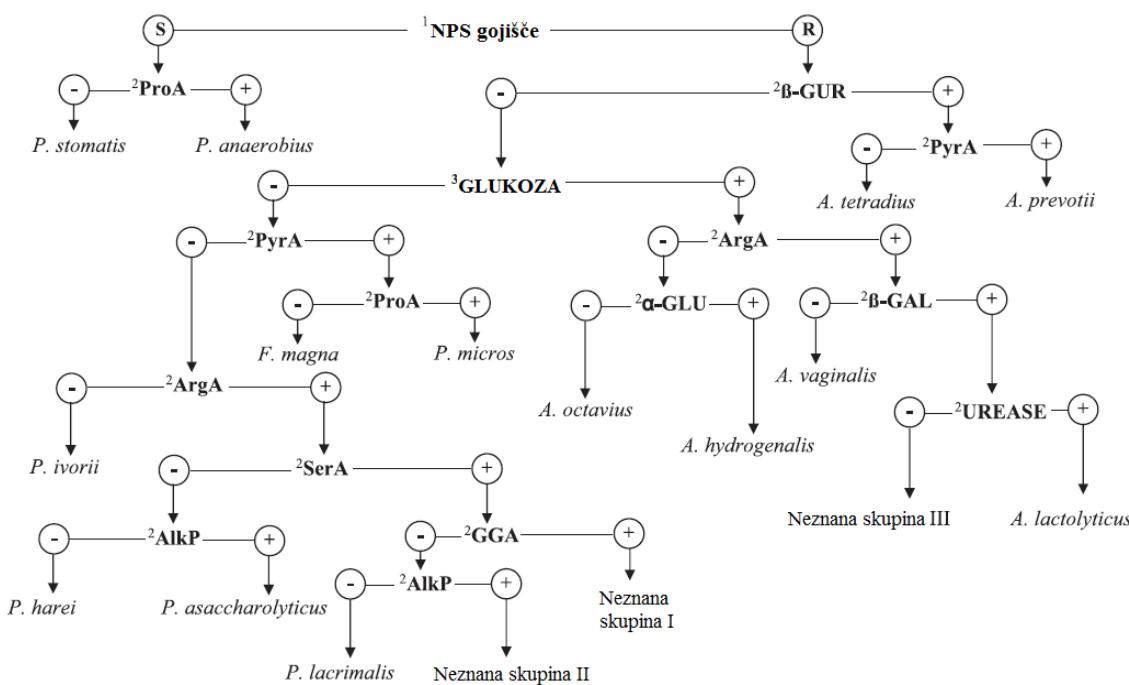
Ta vrsta tvori toksične topne produkte, ki lahko povzročijo gastroenteritise ali okužbe mehkih tkiv (Murray in sod., 2009). Na podlagi glavnih letalnih toksinov, ločimo *C. perfringens* v pet podtipov: A, B, C, D, in E. Tip A producira alfa toksin, tip B alfa, beta in epsilon toksin, tip C producira alfa in beta toksin, tip D producira alfa in epsilon toksin in tip E producira alfa in jota toksin. Teh pet podtipov ne moremo ločiti na podlagi morfologije, biokemijsih lastnosti in tudi rezultatov analize organskih in maščobnih kislin s plinsko-tekočinsko kromatografijo, loči se jih lahko le glede na omenjene toksine. So negibljive, ravne palčke s topimi konci, ki se pojavljajo samostojno ali v paru in so velikosti 0,6–2,4 x 1,3–19,0 µm. Spore so ovalne, locirane centralno ali subterminalno, nabreknejo celico, vendar pa so redko prisotne. V primeru, da *C. perfringens* izpostavimo visoki temperaturi izgubi sposobnost fermentacije nekaterih sladkorjev in sporulacije. Optimalna temperatura rasti se razlikuje pri različnih tipih, pri tipih A, D in E bolje rastejo pri 45 °C, medtem ko tipa B in C rasteta enako dobro pri 37 °C ali 45 °C, ti mikroorganizmi pa so sicer sposobni preživetja v temperaturnem območju od 20 do 50 °C. Za razliko od *C. bif fermentas* pri *C. perfringens* 20 % žolč rasti ne inhibira. Lastnost, ki jih pomaga identificirati je tudi redukcija nevtralno rdečega in pri nekaterih sevih resazurina. Producirajo amoniak, acetyl metil karbol in H₂S, skoraj vsi sevi fermentirajo sukrozo in producirajo lecitinazo, poleg tega pa imajo *C. perfringens* veliko encimov za razgradnjo kot so: DNaza, kislá fosfataza, ribonukleaza, elastaza, hialuronidaza, amilaza, neuraminidaza in drugi. Tako kot *C. bif fermentas* in nasprotno od *C. butyricum*, so *C. perfringens* sposobni pretvorbe treonina v propionat, poleg tega pa producirajo tudi acetat, butirat in laktat (Rainey in sod., 2009).

Te bakterije so etiološki povzročitelji naštetih bolezni:

- celulitis, kjer nastane neboleč edem ali rdeči kožni madeži s plinom v mehkem tkivu,
- gnojni miozitis, kjer pride do akumulacije gnoja na mišični obli, brez nekroze mišic ali sistemskih simptomov,
- mionekroza, ki je boleče, hitro uničenje mišičnega tkiva, ki se razširi sistemsko in z visoko smrtnostjo,
- zastrupitve s hrano, pri čemer hitro pride do trebušnih krčev in vodne diareje, brez vročine, slabosti in bruhanja, vendar tudi hitro mine,
- nekrotizirajoči enteritis, ki je akutno, nekrotizirajoče odmiranje zgornjega tankega črevesa s trebušno bolečino, bruhanjem, krvavo diarejo in vnetjem potrebušnice (Murray in sod., 2009).

2.1.3 Po Gramu pozitivni anaerobni koki

Ti mikroorganizmi ponavadi kolonizirajo ustno votlino, gastrointestinalni trakt, genitourinarni trakt in kožo, vendar do okužbe pride šele, ko se s teh mest preselijo na primarno sterilna mesta. Ker so pogosti na vseh predelih telesa jih zelo težko potrdimo kot izvor okužbe, saj so pogosto lahko le posledica kontaminacije in ne glavni povzročitelji (Murray in sod., 2009). Največkrat se pojavljajo v okužbah, kjer je udeleženo večje število patogenih mikroorganizmov, torej v polimikrobnih okužbah (Murdoch, 1998), medtem ko pa se predstavnica *Finegoldia magna* večinoma pojavlja kot samostojni povzročitelj okužbe (Brazier in sod., 2008). GPAC so oportunistični povzročitelji okužb oralnega in respiratornega trakta, znotrajtrebušnih okužb, okužb genitourinarnega trakta, vrhnjega in mehkega tkiva, bolj redko vendar vseeno se lahko tudi pojavljajo v kardiovaskularnih okužbah in sepsah, okužbah centralnega živčnega sistema in mišičnoskeletnih okužbah (Murdoch, 1998). Vsi GPAC prav tako kot *Clostridium* spp. taksonomsko spadajo v deblo *Firmicutes*, glede na prisotnost nekaterih encimov, občutljivost za natrijev poliatenol sulfonat in sposobnost razgradnje glukoze, pa jih lahko ločimo do posameznih rodov in vrst (slika 3).



Slika 3: Graf za ločevanje nekaterih po Gramu pozitivnih anaerobnih kokov na podlagi raziskav izolatov (Song in sod., 2007: 515). Označevanje: ¹ – na prvi stopnji je ločitev narejena glede na občutljivost bakterij za natrijev polianetolsulfonat (NPS) (R – odporne, S – občutljive). ² – na drugi stopnji se bakterije ločijo glede na rezultate komercialnih encimskih testov, kjer so analizirali arilamidazno (AMD) aktivnost sevov glede na hidrolizo prolina (ProA), arginina (ArgA), serina (SerA), piroglutamila (PyrA), glede na prisotnost β -glukuronidaze (β -GUR), β -galaktozidaze (β -GAL), α -glukozidaze (α -GLU), ureaze, alkalne fosfataze (AlkP) in produkcijo glutamil glutamata (GGA).³ – na tretji stopnji pa so bakterije razdelili v skupine glede na sposobnost fermentacije glukoze.

2.1.3.1 *Peptostreptococcus*

V ta rod spadajo obligatni anaerobi, ki ne sporulirajo, lahko se pojavljajo v parih, nepravilnih masah ali v verigah. Celice obsegajo velikosti od 0,3 do 2,0 μm njihova optimalna temperatura rasti pa je 37 °C (Ezaki, 2009a). Razgradijo peptone in aminokisline do acetata, butirata, izobutirata, kaproata in izokaproata (Holdeman in sod., 1986). Tipski sev je *Peptostreptococcus anaerobius*, ki ima kokobacilarno, pogosto pleomorfno morfologijo celic urejenih v verige (Murdoch, 1998; Holdeman in sod., 1986). Od drugih GPAC se *P. anaerobius* in ostali peptostreptokoki ločijo tudi po občutljivosti za natrijev polianetol sulfonat (Graves in sod., 1974), kot je razvidno na puščičnem grafu (slika 3).

2.1.3.2 *Anaerococcus*

Ta rod obsega obligatno anaerobne, negibljive, nesporulirajoče koke, ki se pojavljajo v parih, tetradih, masah nepravilnih oblik in verižicah. Razgradijo peptone in aminokisline do acetata, butirata in laktata, v manjših količinah lahko tudi do sukcinata ali propionata. Nekatere vrste so sposobne razgradnje ogljikovih hidratov, sladkorji, ki jih v glavnem fermentirajo, pa so glukoza, fruktoza, laktoza in sukroza. Poleg tega večina vrst ni sposobna produkcije indola (Ezaki in Ohkusu, 2009). Ločevanje po vrstah in od drugih GPAC je razvidno v puščičnem grafu (slika 3) (Song in sod., 2007).

2.1.3.3 *Finegoldia*

V ta rod uvrščamo obligatno anaerobne koke, ki merijo 0.7–1.5 µm. Pojavljajo se v parih, tetradih in lahko tudi v masah nepravilnih oblik. Niso sposobni fermetacije ogljikovih hidratov, poleg tega pa ne producirajo indola. Najboljše rastejo pri 37 °C, peptone in aminokisline pa razgradijo do acetata (Ezaki, 2009b).

2.1.3.4 *Parvimonas*

So obligatno anaerobni koki, ki so najmanjši med GPAC saj v premeru merijo le 0.3–0.7 µm. Pojavljajo se v parih, verižicah in masah nepravilnih oblik, njihova optimalna temperatura rasti je 37 °C. Niso sposobni fermetacije ogljikovih hidratov, ne producirajo indola, imajo alkalno fosfatazo, peptone in aminokisline pa razgradijo do acetata (De Vos in sod., 2009).

2.1.3.5 *Peptoniphilus*

Tipski sev tega rodu je *Peptoniphilus asaccharolyticus*. Predstavniki so negibljivi, nesporulirajoči, obligatni anaerobni koki, ki se pojavljajo v parih, kratkih verižicah, tetradih ali majhnih masah in optimalno rastejo pri 37 °C. Glavni vir energije jim predstavljajo peptoni in oligopeptoni, pri razgradnji katerih producirajo butirat, ogljikovih hidratov pa niso sposobni razgraditi (Ezaki in Kawamura, 2009).

2.1.3.6 *Peptococcus*

Sem spadajo nesporulirajoči, obligatno anaerobni koki, ki se pojavljajo posamezno, v parih in nepravilnih masah. Peptone in aminokisline razgradijo do acetata, butirata in izokaproata, poleg tega pa niso saharolitični, tako kot tipski sev *Peptococcus niger* (Ezaki, 2009c).

2.1.4 Po Gramu pozitivni nesporulirajoči anaerobni bacili

Po Gramu pozitivni nesporulirajoči anaerobni bacili (GPNAB) spadajo v deblo *Actinobacteria* in normalno kolonizirajo kožo in sluznične predele človeka. Predstavniki rodov *Propionibacterium* in *Actinomyces* so pogosti oportunistični patogeni, medtem ko predstavniki rodu *Bifidobacterium* le redko povzročijo okužbe (Murray in sod., 2009).

2.1.4.1 *Actinomyces*

So po Gramu pozitivni bacili, ki so fakultativno ali obligatno anaerobni in tvorijo filamentozne mikrokolonije, vendar filamenti se lahko fragmentirajo v korineformne celice in so lahko patogeni tako za ljudi kot za živali (Madigan in Martinko, 2006). Sposobne so razgradnje ogljikovih hidratov (Slack, 1974), ob prisotnosti CO₂ producirajo acetat, format in sukcinat, laktat pa tudi v odsotnosti CO₂ (Buchanan in Pine, 1967). Te bakterije povzročajo lokalne oralne okužbe, in aktinomikoze različnih predelov: medenične, trebušne, vratne in obrazne ter centralnega živčnega sistema (Murray in sod., 2009).

2.1.4.2 *Propionibacterium*

To so po Gramu pozitivne in negibljive palčke, ki so sposobne preživeti pri nizkih koncentracijah kisika. Proste maščobne kisline in glicerol izrabljajo kot vir ogljikovih hidratov in kot vir energije, glavna produkta metabolizma glukoze pa sta acetat in propionat (Eady in Ingham, 1994). Producirajo tudi lipaze za razgradnjo maščob iz žlez lojnic in proteaze za sprostitev arginina iz kožnih proteinov (Oprica, 2006). Večinoma povzročajo oportunistične okužbe, vnetja solznih kanalčkov ali akne (Murray in sod., 2009).

2.1.4.3 *Eggerthella*

Sem sodijo anaerobni, negiblji, po Gramu pozitivni bacili, ki niso saharolitični, sposobni pa so redukcije nitrata in njihova rast je spodbujena z argininom (Mosca in sod., 1997). Proizvodi rasti so acetat, format, sukcinat in laktat, ne razgrajujejo glukoze in ne proizvirajo indola (Kageyama in sod., 1999). Gre za oportunistične patogene, ki se ponavadi pojavljajo v polimikrobnih okužbah skupaj z drugimi anaerobi, vendar so pred kratkim ugotovili, da je velikokrat prav *Eggerthella* odgovorna za bakteriemijo (Lau in sod., 2004a; Lau in sod., 2004b).

2.1.4.4 *Bifidobacterium*

Predstavniki tega rodu so anaerobni, po Gramu pozitivni bacili, ki nimajo katalaze, niso sposobni redukcije nitrata in poleg tega tudi ne proizvirajo indola (Gavini in sod., 1991). Tvorijo acetat in v manjši meri laktat, lahko tudi format. Za ta rod velja, da se pojavljajo v orofarinksu, debelem črevesu in vagini, vendar pa imajo predstavniki nizki virulentni potencial in so največkrat izolirani iz polimikrobnih okužb (Murray in sod., 2009).

2.1.5 Rod *Fusobacterium*

Vrste, ki jih uvrščamo v ta rod so nesporulirajoči, obligatno anaerobni, po Gramu negativni bacili (primer na sliki 14), ki metabolizirajo peptone ali ogljikove hidrate v pepton kvas glukoza tekočem gojišču do butirata, pogosto tudi acetata in v manjših količinah lahko tudi do laktata, propionata, sukcinata in formata (Gharbia in sod., 2010). Predstavniki tega rodu ponavadi povzročajo okužbe respiratornega trakta skupaj z drugimi predstavniki po Gramu negativnih anaerobov, pojavljajo pa se tudi v polimikrobnih okužbah možganskih abscesov (Murray in sod., 2009).

2.1.6 Rod *Porphyromonas*

Predstavniki tega rodu so po Gramu negativni, negiblji, nesporulirajoči, obligatni anaerobni kokobacili ali bacili, velikosti $0.3 - 1 \times 0.8 - 3.5 \mu\text{m}$. Na krvnem agarju tvorijo značilne črne ali rjave kolonije. Večina vrst ni saharolitičnih, glavna produkta fermentacije

pa sta n-butirat in acetat. Ogljikovi hidrati na rast ne vplivajo, medtem ko rast povečajo proteinski hidrolitzati. Dve pomembni lastnosti pri identifikaciji sta tudi nesposobnost redukcije nitrata do nitrita in hidrolize eskulina (Summanen in Finegold, 2010). Skupaj z drugimi predstavniki po Gramu negativnih anaerobov pozročajo okužbe respiratornega trakta in možganskih abscesov (Murray in sod., 2009) ter abdominalne okužbe (Finegold in Jousimies-Somer, 1997).

2.1.7 Rod *Prevotella*

V ta rod spadajo vrste obligatno anaerobnih, kratkih bacilov, ki ne sporulirajo, so negiblji, po Gramu negativni, poleg tega so lahko tudi saharolitični. Prisotnost 20 % žolča inhibira njihovo rast, v pepton kvas glukoza tekočem gojišču producirajo acetat in sukcinat, v manjših količinah pa lahko producirajo tudi kratkoverižne kisline. Pri njih sta prisotni malatna dehidrogenaza in glutamatna dehidrogenaza, medtem ko sta odsotna encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaza in 6-fosfoglukonat dehidrogenaza. Njihove zanimive in tipične lastnosti so produkcija sfingolipidov, produkcija porfirinov pri pigmentiranih vrstah in menakinoni kot edini respiratorični kinoni v pri vseh vrstah (Shah in sod., 2010). Lahko jih prepoznamo kot povzročitelje okužb respiratornega trakta in možganskih abscesov, seveda skupaj skupaj z drugimi predstavniki po Gramu negativnih anaerobov. *P. melaninogenica* se posamezno pojavlja kot pozročiteljica znotraj trebušnih okužb, *Prevotella bivia* in *Prevotella disiens* pa lahko povzročita vnetje medenične votline, abscese, endometritise ali okužbe kirurških ran v predelu ginekološkega trakta (Murray in sod., 2009).

2.1.8 Rod *Bacteroides*

Sem uvrščamo anaerobne, negibljive bacile z zaobljenimi konci, ki se po Gramu obarvajo negativno (primer na sliki 14), celice v preparatu pa so popolnoma enolične, če jih vzamemo iz mlade kulture na krvnem agarju. Morfološki izgled kolonij je precej prepoznaven: kolonije merijo 1–3 mm v premeru, so gladke, bele do sive in nehemolitične na krvnem agarju. Predstavniki so kemoorganotrofi, saharolitični, lahko tudi proteolitični. Za razliko od rodu *Prevotella* predstavniki tega rodu lahko rastejo ob prisotnosti 20 %

žolča. Ponavadi tudi hidrolizirajo eskulin, medtem ko nitrata ne reducirajo do nitrita. Prav tako kot pri vrstah rodu *Prevotella*, sta tudi tu glavna produkta fermentacije acetat in sukcinat. Za rast potrebujejo hemin in vitamin K₁ (Song in sod., 2010). Skupaj z drugimi predstavniki po Gramu negativnih anaerobov pozročajo okužbe respiratornega trakta. Kot samostojna povzročitelja se v znotraj trebušnih okužbah pojavljata *Bacteroides thetaiotaomicron* in *B. fragilis*. Ta bakterija pa je tudi pogost povzročitelj ginekoloških okužb, kože in mehkega tkiva, redkeje pa lahko povzroča tudi gastroenteritise (najpogosteje pri otrocih do 5 let starosti) in sepso (Murray in sod., 2009).

Bacteroides capillosus je sedaj preimenovan v *Pseudoflavonifractor capillosus*, ki spada v družino *Ruminococcaceae*, red *Clostridiales*, razred *Clostridia* in deblo *Firmicutes* (Carlier in sod., 2010).

2.1.9 Rod *Parabacteroides*

Prav tako kot vrste rodu *Bacteroides* so ti anaerobni, negiblivi, nesporulirajoči bacili, ki se po Gramu obarvajo negativno, veliki pa so 0,8–1,6 x 1,2–12 µm. Kolonije merijo 1–2 mm v premeru, so gladke, sive oz. bele do sive. Sevi so saharolitični, glavna produkta pa sta acetat in sukcinat. Nimajo ureaze, imajo pa katalazo, hidrolizirajo eskulin in ne producirajo indola. Sposobni so rasti na gojišču z 20 % žolča (Sakamoto in Benno, 2006).

2.2 ANTIBIOTIKI IN MEHANIZMI ODPORNOSTI NA ANTIBIOTIKE

Antibiotiki so molekule, ki z različnimi mehanizmi delovanja povzročijo smrt mikrobov – baktericidni antibiotiki (npr. penicilin) ali pa preprečujejo njihovo rast – bakteriostatski antibiotiki (npr. kloramfenikol). Izvor antibiotikov je lahko naraven ali pa so delno ali v celoti industrijsko sintetizirani (semisintetični in sintetični antibiotiki). Naravne antibiotike producirajo glive in bakterije z namenom naselitve habitata in kompeticije pred drugimi mikrobi, za nadzor rasti sosednjih mikrobov ali pa za njihovo odstranitev (Walsh, 2003). Zato so tarčni mikroorganizmi razvili tudi mehanizme odpornosti proti antibiotikom.

Razumevanje mehanizmov odpornosti proti antibiotikom je ključno pri vzdrževanju uspeha zdravljenja z antibiotiki in drugimi protimikrobnimi sredstvi, ki so trenutno na trgu

in za razvoj novih protimikrobnih sredstev (Byarugaba, 2010). V primeru, da je cela vrsta odporna proti neki skupini antibiotikov, gre za naravno odpornost. Bakterije so tako lahko naravno odporne proti nekaterim antibiotikom zaradi odsotnosti tarčnih mest na katera antibiotiki delujejo kot npr. odsotnost peptidoglikana pri mikoplazmah. Kmalu po tem, ko so začeli uporabljati protimikrobna sredstva za zdravljenje okužb se je razvila tudi odpornost proti tem sredstvom kot rezultat izpostavljenosti antibiotikom in horizontalnih genskih prenosov – pridobljena odpornost (Guillemot, 1999). Bakterije lahko pridobijo gene za odpornost proti antibiotikom, ki nosijo zapis za:

- spremembo tarčnega mesta na katerega se veže protimikrobno sredstvo, tako da pride do spremembe ali odstranitve tega mesta,
- encime, ki inaktivirajo protimikrobna sredstva,
- spremembo vstopnega mesta protimikrobnega sredstva oz. zmanjšana prepustnost za protimikrobno sredstvo,
- aktivacijo črpalk, ki izčrpavajo protimikrobno sredstvo iz celice
- spremembo presnovne poti, na katero deluje antibiotik.

Običajno na antibiotik občutljive populacije bakterij lahko pridobijo odpornost proti protimikrobnim sredstvom z mutacijo in selekcijo ali pa od drugih bakterij. Zdravljenje z antibiotikom, proti kateremu so bakterije z mutacijo pridobile odpornost jih le seleкционira od bakterij, ki so za ta antibiotik občutljive. Medtem ko antibiotik občutljive bakterije pobije, se število odpornih bakterij poveča, saj imajo sedaj na razpolago več prostora za rast in hranila. Tako npr. med zdravljenjem aerobne okužbe z aminoglikozidi lahko pride do razrasta anaerobne populacije mikroorganizmov, ki je proti tem antibiotikom naravno odporna. Ponavadi pri pridobljeni odpornosti ena sama mutacija ni dovolj za razvoj odpornosti pri posameznem sevu, vendar zadostuje za osnovno preživetje, dokler bakterija evolucijsko ne pridobi še ostalih dodatnih genov za odpornost (Tenover, 2006; McManus, 1997).

Bolj pomemben način pridobitve zapisa za odpornost proti antibiotikom so horizontalni prenosи. Poteka lahko tudi med dvema različnima vrstama ali pa med dvema različnima rodovoma bakterij. Najbolj pomemben mehanizem prenosa informacije za odpornost proti antibiotikom je konjugacija. Med tem procesom po Gramu negativna bakterija prenese

plazmid z rezistenčnimi geni v sosednjo bakterijo, ponavadi preko pilusa – proteinske strukture, ki predstavlja nekakšen most za horizontalno izmenjavo genskih informacij. Konjugacija pri po Gramu pozitivnih bakterijah pa vključuje tudi paritvene feromone, ki spodbudijo združevanje donorja in recipienta preko pilarnih struktur. Redko se rezistenčni geni prenesejo z bakterije na bakterijo tudi preko bakteriofagov (transdukcija) ali pa s transformacijo, ko bakterija v svojo DNA vključi z lizo sproščene segmente DNA druge bakterije, ki nosijo zapise za odpornost (Tenover, 2006; McManus, 1997).

K razvoju odpornosti proti antimikrobnim sredstvom je pripomoglo več dejavnikov kot so: slaba kvaliteta zdravil na tržišču v državah v razvoju, neustrezna uporaba antibiotikov s strani zdravnika in bolnika ter pritisk s strani bolnika za pridobitev recepta, kar vodi v prekomerno uporabo teh spojin. Največkrat so antibiotiki neustrezno predpisani bolnikom z virusnimi boleznimi respiratornega trakta, medtem ko se v državah v razvoju nepotrebno predpisujejo tudi pri otroški diareji (Guillemot, 1999).

Klinično pomembne in najpogosteje odporne bakterije, ki so se iz okolja bolnišničnih poslopij razširile tudi v širšo javnost so MRSA (proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus*, ang. »methicillin-resistant *S. aureus*«), ESBL (bakterije z razširjenim spektrom beta-laktamaz, ang. »extended spectrum beta-lactamase«), VRE (proti vankomicinu odporni enterokoki, ang. »vancomycin-resistant enterococci«) in PRSP (proti penicilinu G odporen *Streptococcus pneumoniae*, ang. »penicillin-resistant *S. pneumoniae*«) (Wright, 2003).

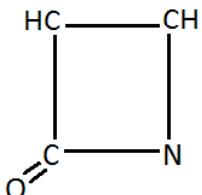
2.2.1 Mehanizmi delovanja antibiotikov

Antibiotike delimo na skupine glede na tarče na katere delujejo. Antibiotiki najpogosteje inhibirajo sintezo celične stene, zaviranjo bakterijske ribosomske podenote, sintezo jedrnih kislin ali pa slabijo integriteto celične membrane.

2.2.1.1 Inhibicija sinteze celične stene

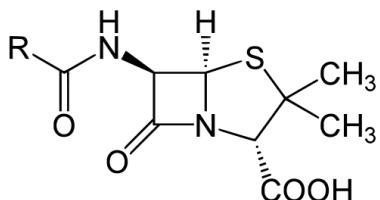
Antibiotiki, ki zavirajo sintezo celične stene so beta-laktami, glikopeptidi in bacitracin. Med beta-laktame sodijo penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami in zaviralci

beta-laktamaz, med glikopeptide pa sodita vankomicin in teikoplanin. Glavna značilnost beta-laktamskih antibiotikov je beta-laktamski obroč (slika 4) (Kotnik, 2002).

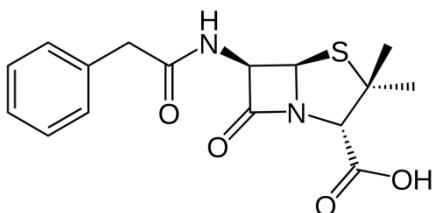


Slika 4: Beta-laktamski obroč (Franklin in Snow, 2005: 34).

Najbolj razširjena skupina beta-laktamov in antibiotikov na splošno so penicilini (slika 5): prvotni, ki so uporabni le za parenteralno uporabo, in polsintetični in sintetični derivati. Ločimo standardne peniciline, kamor spada benzilpenicilin (slika 6), antistafilokokne peniciline in širokospikalne peniciline. Ti antibiotiki vstopajo skozi bakterijsko steno in se vežejo na penicilin vezoge proteine citoplazemske membrane (PBP, ang. »penicillin binding proteins«) kot je transpeptidaza. Ta zamenja beta-laktamski antibiotik za svoj substrat (prekursor peptidoglikanske verige) in postane neaktivna. S tem je preprečena rast bakterijske stene, čemur sledi liza celice (Kotnik, 2002).



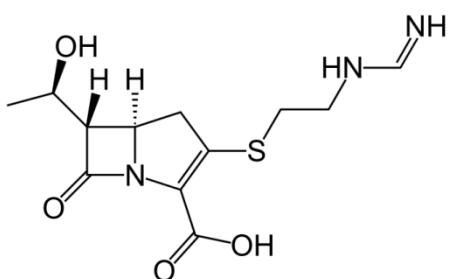
Slika 5: Jedro kemijske formule penicilina (Franklin in Snow, 2005: 34).



Slika 6: Formula benzilpenicilina (penicilin G) (Franklin in Snow, 2005: 34).

Obstajajo trije mehanizmi odpornosti proti betalaktamskim antibiotikom, in sicer encimi beta-laktamaze, zmanjšanje afinitete za proteine, ki vežejo penicilin in zmanjšanje

permeabilnosti za antibiotik (Seme, 2002). Kar 95 % vrst bakterij skupine *B. fragilis* (*B. fragilis*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus*) je naravno odpornih proti penicilinu G zaradi sinteze beta-laktamaz razreda C. Med vrstami anaerobov, ki ne spadajo v rod *Bacteroides*, je pojavnost beta-laktamaz nižja. Tako je pri zelo pogostih izolatih abdominalnih okužb kot je *Prevotella* spp. delež proti penicilinu odpornih izolatov v povprečju večji od 50 % (Goldstein in sod., 2008; Jousimies-Somer, 1997). Podobno so tudi Aldridge in sod. (2001) ugotovili, da je pri *Porphyromonas* spp. delež odpornih izolatov v povprečju 21 %, pri *Fusobacterium* spp. 9 % in pri *Peptostreptococcus* spp. 6 %.



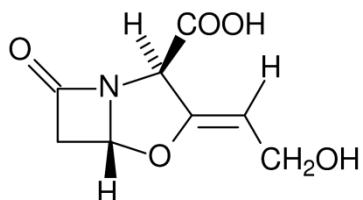
Slika 7: Kemijska formula imipenema (NCBI, 2005).

Karbapenemi (imipenem, meropenem, ertapenem) imajo zelo širok spekter delovanja. Imipenem (slika 7) je polsintetičen, vodotopen, injicira se v žilo, saj se ne resorbira iz prebavil, in se ponavadi tako kot meropenem uporablja v bolnišnici za zdravljenje okužb z proti večini antibiotikov odpornimi bakterijami (Kotnik, 2002). Karbapenemski antibiotiki so narejeni po modelu naravnega antibiotika tienamicina, ki ga producira *Streptomyces cattleya*, ki se nahaja v prsti (Kahan in sod., 1979). Posledično so se pri mikroorganizmih, pogostih v prsti razvile metalo beta-laktamaze zapisane na kromosomu (Kuwabara in Abraham, 1967). Kasneje so ugotovili, da so ti encimi lahko zapisani na genski kaseti integrona in ko se ti povežejo s plazmidom ali transpozonom pride do možnosti prenosa genov odpornosti. Prvič so prenosljivo odpornost proti imipenemu odkrili pri *Pseudomonas aeruginosa* (Watanabe in sod., 1991) in kasneje pri *B. fragilis* (Bandoh in sod., 1992).

Mehanizem odpornosti proti imipenemu in ostalim karbapenemom so metalo beta-laktamaze razreda B, ki hidrolizirajo to skupino antibiotikov. Zaradi širokega spektra

delovanja lahko inhibirajo tudi cefalosporine in peniciline, vendar ne aztreonama (Queenan in Bush, 2007). Ti encimi so občutljivi za kelatorje železovih ionov (Queenan in Bush, 2007). Glavni mehanizem njihovega delovanja je odvisen od interakcije med cinkovimi ioni teh encimov in betalaktamskimi antibiotiki (Toney in sod., 1998; Wang in sod., 1999).

Sami zaviralci beta-laktamaz ne delujejo protibakterijsko, vendar v kombinaciji z aminopenicilini ojačajo njihovo delovanje, saj se vežejo z beta-laktamazami in s tem preprečijo njihovo vezavo na aminopenicilin. Med zaviralce omenjenih encimov uvrščamo klavulansko kislino, sulbaktam in tazobaktam (Kotnik, 2002).



Slika 8: Kemijska formula klavulanske kisline (Franklin in Snow, 2005: 35).

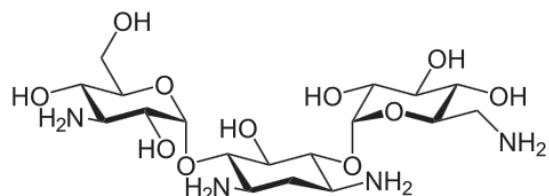
Odpornost proti klavulanski kislini ali drugim zavircalcem beta-laktamaz je posledica hiperprodukije teh encimov zaradi visokega števila kopij plazmida ki nosijo zapise za njihovo sintezo ali pa zaradi spremenjenega njihovega aktivnega mesta (Steingrube in sod., 1991).

2.2.1.2 Inhibicija sinteze proteinov

Med zaviralce proteinske sinteze spadajo aminoglikozidi (npr. streptomicin, gentamicin, neomicin), tetraciklini, kloramfenikol, makrolidi (npr. eritomicin, azitromicin, klaritromicin), linkozamidi (npr. klindamicin) in fucidinska kislina (Kotnik, 2002).

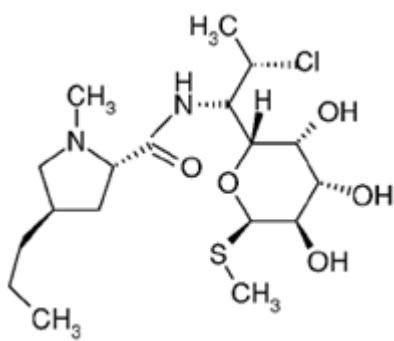
Aminoglikozidi, kot npr. kanamicin (slika 9), preprečijo začetek proteinske sinteze z inhibicijo vezave t-RNA na 70S ribosomsko podenoto. Inhibicija poteka tako, da se antibiotik veže na specifičen proteinski receptor na 30S ribosomalni podenoti. S tem prepreči vezavo med mRNA formilmethionina in t-RNA (Carter in sod., 2000). Anaerobne bakterije so opazno odporne proti aminoglikozidom (Finegold in sod., 1992), saj brez kisika kot terminalnega akceptorja elektronov ne pride do prenosa oz. prevzema teh spojin

(Brian in sod., 1979). To pa le pripomore k njihovi prisotnosti v okužbah z aerobnimi bakterijami, ki so zdravljene z aminoglikozidi (Finegold in sod., 1992).



Slika 9: Formula kanamicina A (Franklin in Snow, 2005: 95).

Makrolidi imajo makrociklični laktonski obroč z 14 do 16 členi. Eritromicin je makrolid, ki se veže z ribosomskima podenotama 23S in 50S in preprečuje translacijo (Ban in sod., 2000; Schlunzen in sod., 2001). Linkozamidi, kot sta linkomicin in njegova uspešnejša različica klindamicin (slika 10), delujejo na ista tarčna mesta kot makrolidi in ko se razvije odpornost proti makrolidom tudi linkozamidi niso uspešni (Schlunzen in sod., 2001; Vester in Douthwaite, 2001). Medtem ko se makrolidi vežejo na začetku ribosomskega izhodnega tunela in s tem zaprejo pot novonastajajoči verigi mRNA skozi ribosom, se linkozamidi vežejo na P-mesto in A-mesto ribosomske 50S podenote in s tem ovirajo povezavo obeh t-RNA molekul in neposredno inhibirajo nastanek peptidnih vezi (Harms in sod., 2003). Klindamicin se v telo vnaša peroralno ali pa z vbrizgavanjem. V jetrih se metabolizira, vendar antibiotično delujejo tudi njegovi razpadni produkti. Uporabljamo ga pri zdravljenju okužb s po Gramu pozitivnimi bakterijami in anaerobi.



Slika 10: Kemijska formula klindamicina (Franklin in Snow, 2005: 100).

Mehanizem odpornosti proti klindamicinu je posredno povezan z makrolid-linkozamid-streptogramin tipom 23S RNA metilaze, ki z metilacijo enega od dveh adeninskih ostankov prepreči vezavo klindamicina na ribosome. To metilazo kodirajo *erm* geni (Roberts in sod., 1999). Zaradi povečanja števila proti klindamicinu odpornih bakterij vsepovsod po svetu, uporaba klindamicina pri empiričnem zdravljenju pri trebušnih okužbah ni priporočena (Goldstein in sod., 2008).

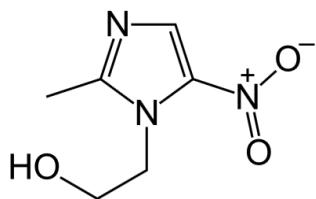
2.2.1.3 Inhibicija sinteze jedrnih kislin

Sintezo jedrnih kislin zavirajo sulfonamidi, trimetoprim in kinoloni. Sulfonamid in trimetoprim inhibirata biosintetsko pot nastanka folne kisline in s tem bakteriji preprečita pridobitev tetrahidrofolata, medtem ko kinoloni inhibirajo DNA girazo (Franklin in Snow, 2005).

2.2.1.4 Poškodbe DNA

Med bolj uporabne nitroheterociklične antibiotike spadajo metronidazol (slika 11), nitrofurantoin, benzonidazol, nitrofurazon in furazolidon.

Zaradi svojega nizkega redoks potenciala (-480 mV) je metronidazol aktiviran le z piruvat-ferodoksin oksido reduktazami in hidrogenazami anaerobnih bakterij, nastali bioaktivni produkti redukcije metronidazola pa nato napadejo DNA in na njej povzročijo bazne mutacije in prelome v enojni ali dvojni vijačnici (Franklin in Snow, 2005).



Slika 11: Kemijska formula metronidazola (Franklin in Snow, 2005: 108).

Metronidazol je uspešen pri zdravljenju okužb z anaerobi kot sta *B. fragilis* in *Clostridium difficile*, prav tako se uporablja pri zdravljenju okužb z *Helicobacter pylori* in nekaterimi paraziti (Franklin in Snow, 2005).

Mehanizem odpornosti proti metronidazolu temelji na šestih *nim* genih (A–F), ki nosijo zapis za nitroimidazolno reduktazo, ki pretvori 4- ali 5-nitroimidazol v 4- ali 5-aminoimidazol in s tem prepreči nastanek toksičnih nitrozo skupin, ki so potrebne za delovanje metronidazola (Carlier in sod., 1997). Proti metronidazolu so naravno odporni skoraj vsi izolati *Propionibacterium acnes* in *Actinomyces* spp., pogosto tudi predstavniki *Peptostreptococcus* spp. (Brook, 2009).

2.2.1.5 Inhibicija delovanja celične membrane

Antibiotiki, ki zavirajo delovanje celične membrane selektivno zavirajo procese v plazemski membrani in tako ovirajo razmnoževanje bakterij, primer takšnih antibiotikov so polimiksini, ki delujejo podobno kot kationski detergenti – razgrajujejo fosfolipidni dvosloj (Kotnik, 2002).

2.3 OBČUTLJIVOST ANAEROBNIH BAKTERIJ ZA ANTIBIOTIKE

Odpornost anaerobnih bakterij je v svetu zadnje čase vedno bolj pogosta in odraža veliko porabo antibiotikov (Hecht, 2004). Zato je spremljanje odpornosti v laboratorijih, ki določajo občutljivost anaerobov za antibiotike, pomembno.

Vse te pogoje za uspešno študijo o odpornosti anaerobnih bakterij proti antibiotikom so upoštevali Glupczynski in sod. (2008) v svoji raziskavi v Belgiji, kjer so upoštevali kar 327 anaerobnih izolatov, da bi pridobili pravo sliko o občutljivosti za antibiotike (preglednica 2), od tega je bilo kar 77 izolatov vrste *B. fragilis*. Anaerobne bakterije so testirali tudi za odpornost proti meropenemu, vendar niso izolirali izolata, ki bi bil proti temu antibiotiku odporen.

Preglednica 2: Aktivnost penicilina, amoksicilin/klavulanske kisline, meropenema, klindamicina in metronidazola proti različnim skupinam anaerobnih bakterij iz dveh belgijskih bolnišnic. Vsi sevi so bili testirani proti vsem petim antibiotikom z Etesti. Rezultati, kjer so bile skupine v celoti za antibiotik občutljive v preglednici niso navedeni. % S – delež občutljivih sevov, % I – delež delno odpornih sevov, % R – delež odpornih sevov (Glupczynski in sod., 2008: 264).

Bakterija	Protimikrobovo sredstvo	% S	% I	% R
<i>Bacteroides fragilis</i> (77 sevov)	Penicilin	1	1	<u>98</u>
	Klindamicin	58	12	<u>30</u>
<i>Bacteroides fragilis</i> skupina brez <i>B. fragilis</i> (64 sevov)	Penicilin	0	0	<u>100</u>
	Amoksicilin/klavulanska kislina	81	9	<u>9</u>
<i>Prevotella</i> spp. in drugi po Gramu negativni bacili (81 sevov)	Klindamicin	34	9	<u>56</u>
	Penicilin	34	5	<u>61</u>
<i>Fusobacterium</i> spp. (24 sevov)	Klindamicin	75	2	<u>23</u>
	Penicilin	88	4	<u>8</u>
<i>Clostridium</i> spp. (19 sevov)	Klindamicin	92	0	<u>8</u>
	Penicilin	69	5	<u>25</u>
Anaerobni nesporulirajoči po Gramu pozitivni bacili (15 sevov)	Klindamicin	58	16	<u>26</u>
	Metronidazol	87	0	<u>13</u>
Anaerobni po Gramu pozitivni koki (47 sevov)	Penicilin	53	0	<u>47</u>
	Klindamicin	87	4	<u>9</u>
	Penicilin	72	4	<u>23</u>

2.3.1 Občutljivost *Bacteroides* spp. za antibiotike

Skoraj vse vrste znotraj skupine *B. fragilis* (13 vrst) so zaradi produkcije beta-laktamaz odporne proti penicilinu (Hecht, 2004). Odpornost proti amoksicilin/klavulanski kislini in drugim betalaktamskim antibiotikom z inhibitorji beta-laktamaz je med vrstami te skupine med 2-9 %, proti klindamicinu odporni sevi pa se po svetu vedno bolj pogosto pojavljajo (Behra-Miellet in sod., 2003; Goldstein, 2000; Hecht in Osmolski, 2003; Hedberg in Nord, 2003; Koeth in sod., 2004; Snydman in sod., 1999; Teng in sod., 2002). To je povezano z geni *ermF*, *ermS* in *ermG* vrst skupine *B. fragilis*, ki nosijo zapis za odpornost proti

klindamicinu in so zapisani na plazmidu (Goldstein in sod., 2008). Prav tako imajo vrste te skupine *B. fragilis* gene *ccrA* in *cfa*, ki nosijo zapis za mehanizme odpornosti proti karbapenemom (imipenemu), ti so prav tako prenosljivi – zapisani na plazmidu (Goldstein in sod., 2008). Proti ertapenemu in meropenemu je po trenutnih raziskavah večji delež odpornih sevov *B. fragilis* skupine (do 5 %) kot proti metronidazolu 0,9 % (Seifert in Dalhoff, 2010). Sevi odporni proti imipenemu so zelo redki, vendar pa se tudi pojavljajo (Polglajen in sod., 1994; Snydman in sod., 1999; Schaumann in sod., 2000). Odpornost proti metronidazolu je na splošno redka med anaerobnimi bakterijami (izjemni sta rod *Propionibacterium* in *Actinomyces*), vendar pa imajo vrste skupine *B. fragilis* skupino genov *nma*-F, ki so zapisani na plazmidu, torej prenosljivi in imajo zapis za mehanizem odpornosti proti metronidazolu (Goldstein in sod., 2008; Schapiro in sod., 2004; Seifert in Dalhoff, 2010). Medtem, ko je v Ameriki odpornost proti metronidazolu med izolati *B. fragilis* skupine še precej redek pojav, so v nekaterih državah Evrope poročali o kar 1 % deležu ali več odpornih izolatov teh vrst (Mory in sod., 1998; Wybo in sod., 2007; Papaparaskevas in sod., 2008; Seifert in Dalhoff, 2010).

Snydman in sod. (2010) so določali odpornost izolatov skupine *B. fragilis* proti antibiotikom (preglednica 3). Odpornost proti metronidazolu je redka in se je glede na njihove rezultate v ZDA pojavila šele po letu 2000.

Preglednica 3: Deleži odpornosti proti določenim antibiotikom pri izolatih bakterij *Bacteroides fragilis* skupine od leta 1981 do leta 2007 v ZDA (Snydman in sod., 2010: S27).

Antibiotik	REZISTENCA (%)		
	Leto 1981-1989 (n=1229)	Leto 1990-1999 (n=2080)	Leto 2000-2007 (n=3140)
Klindamicin	5–6	23	31–>35
Imipenem	< 1	< 1	< 1
Metronidazol	0	0	2 izolata (ni v %)

2.3.2 Občutljivost *Prevotella* spp. in *Porphyromonas* spp. za antibiotike

Beta-laktamaze so pri *Prevotella* spp. prisotne v povprečju pri 70 % sevov v Evropi (Papaparaskevas in sod., 2008; Falagas in Siakavellas, 1999; Wybo in sod., 2007; Glupczynski in sod., 2008) in v povprečju pri 50 % sevov v svetu (Goldstein in sod.,

2008). Pri *Porphyromonas* spp. je delež nižji, in sicer do 20 % sevov odpornih proti penicilinu (Fagas in Siakavellas, 1999; Pelak in sod., 2002). Tako *Prevotella* spp. kot *Porphyromonas* spp. sta občutljiva za imipenem (Papaparaskevas in sod., 2008), za metronidazol in amoksicilin/klavulansko kislino (Wybo in sod., 2007). Delež proti klindamicinu odpornih sevov pa je vedno večji pri vrstah rodu *Prevotella*, in sicer med 18 in 31 % v Evropi (Papaparaskevas in sod., 2008; Wybo in sod., 2007; Glupczynski in sod., 2008), saj imajo na transpozonu zapis gena *ermF*, ki nosi zapis za mehanizem odpornosti proti klindamicinu (Goldstein in sod., 2008)

2.3.3 Občutljivost *Fusobacterium* spp. za antibiotike

Ta rod je večinoma občutljiv za vse testirane antibiotike. Jacinto in sod. (2008) pa so v raziskavi ugotovili, da je bilo 3 % *F. nucleatum* od tridesetih izolatov odpornih proti penicilinu, in 3 % proti klindamicinu, vsi izolati te vrste pa so bili popolnoma občutljivi za metronidazol in amoksicilin/klavulansko kislino. Prav tako so ugotovili, da je bilo 13 % od petnajstih izolatov *F. necrophorum* odpornih proti penicilinu, 13 % odpornih proti klindamicinu in 6 % odpornih proti metronidazolu (Jacinto in sod., 2008).

2.3.4 Občutljivost *Clostridium* spp. za antibiotike

C. perfringens je ponavadi precej občutljiv za vse antibiotike, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb z anaerobnimi bakterijami (Hecht in Osmolski, 2003). Medtem, ko so ostali predstavniki tega rodu, predvsem *Clostridium difficile* lahko odporni proti penicilinu in klindamicinu (Goldstein in sod., 2003). Wybo in sod. (2007) so v študiji med 57 izolati rodu *Clostridium* ugotovili 12 % proti penicilinu odpornih sevov in 23 % proti klindamicinu odpornih sevov, vsi sevi so bili občutljivi za metronidazol in amoksicilin/klavulansko kislino. *C. perfringens* ima gene *ermQ* in *ermP* z zapisom za mehanizem odpornosti proti klindamicinu, *C. difficile* ima gene *ermB*, *ermZ* in *ermBZ* zapisane na transpozonu (Goldstein in sod., 2008).

2.3.5 Občutljivost po Gramu pozitivnih anaerobnih kokov za antibiotike

Ponavadi so anaerobni po Gramu pozitivni koki občutljivi za penicilin in imipenem, amoksicilin/klavulansko kislino in metronidazol, večinoma so občutljivi za klindamicin, kot vse anaerobne bakterije so odporni proti aminoglikozidom (Murray in sod., 2009). Brazier in sod. (2008) so raziskovali občutljivost GPAC v 10 evropskih državah. Največ izolatov so zbrali na Švedskem, Finsku in v Veliki Britaniji, med katerimi so številčno prevladovali izolati iz mehkih tkiv in kože (preglednica 4).

Preglednica 4: Deleži posameznih vrst med najpogosteje izoliranimi po Gramu pozitivnimi anaerobnimi koki (Brazier in sod., 2008).

Deleži izolatov				
<i>Finegoldia magna</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Peptoniphilus harei</i>	<i>Anaerococcus vaginalis</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
37,1 %	17,7 %	14,7 %	7 %	6,7 %

V manjšem številu so izolirali tudi *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Peptoniphilus ivorii*, *Peptoniphilus indolicus*, *Peptoniphilus lacrimalis*, *Anaerococcus octavius*, *Anaerococcus prevotii*, *Anaerococcus tetradius* in *Anaerococcus lactolyticus*.

Vsi izolati so bili občutljivi za imipenem in metronidazol, pri nekaterih pa so zasledili odpornost proti penicilinu in klindamicinu. Od 299 izolatov je bilo odpornih proti vsaj enemu antibiotiku 21 izolatov oz. 7 %. Trije predstavniki *F. magna* (preglednica 5) so bili istočasno odporni proti penicilinu in klindamicinu, prav tako velja za enega predstavnika *P. indolicus* (Brazier in sod., 2008).

Preglednica 5: Število proti klindamicinu in penicilinu odpornih izolatov posameznih vrst po Gramu pozitivnih kokov (Brazier in sod., 2008).

Antibiotik	Število izolatov odpornih proti antibiotiku			
	<i>Finegoldia magna</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	<i>Parvimonas micra</i>
Klindamicin	7	0	2	1
Penicilin	4	3	2	1

Bilo je še pet drugih posameznih izolatov odpornih ali proti penicilinu ali proti klindamicinu, vendar jih zaradi majhnega števila v študiji niso izpostavili. Mesta okužb z

proti antibiotikom odpornimi sevi so bili v glavnem kri, abscesi in mehka tkiva (Brazier in sod., 2008).

2.3.6 Občutljivost po Gramu pozitivnih nesporulirajočih anaerobnih bacilov za antibiotike

Rodovi *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium* in *Eggerthella* so ponavadi občutljivi za peniciline, karbapeneme in vse kombinacije betalaktam/beta-laktamazni inhibitor, veliko vrst znotraj teh rodov pa je odpornih proti metronidazolu. Wybo in sod. (2007) pa so med 31 izolati ugotovili 16 % delež odpornosti proti penicilinu, 10 % delež odpornosti proti klindamicinu. Delež proti metronidazolu odpornih je bil v njihovi raziskavi 65 %.

3 MATERIALI IN METODE

Pri uporabi materialov, pripravi gojišč in izvajjanju metod smo upoštevali predpise splošnih operativnih postopkov (SOP) Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, ki sledijo navodilom Inštituta za klinične in laboratorijske standarde (CLSI). Analiza vzorcev je potekala od 1. oktobra 2010 do 31. marca 2011. V tem času je bilo v Laboratorij za hemokulture in druge urgentne mikrobiološke preiskave sprejetih 12340 hemokultur in 4420 drugih kužnin, ki smo jih pregledali tekom preiskave.

3.1 MATERIAL

Pri izvajjanju metod smo uporabili številne kemikalije, laboratorijsko opremo, vzorce kužnin, gojišča in reagente in identifikacijske sisteme.

3.1.1 Kemikalije

Kemikalije, ki smo jih uporabili pri izvedbi metod so naštete v preglednici 6.

Preglednica 6: Kemikalije in dodatki uporabljeni pri pripravi gojišč za kultivacijo in identifikacijo izolatov.

Proizvajalec	Kemikalija
Becton Dickinson	Dehidriran agar: BBL Brucella Agar, dehidrirana osnova za tioglikolatni bujon: Difco Fluid Thioglycollate Medium, dehidrirana osnova za tripsin bujon: Bacto-Tryptone
BDH Biochemicals	Hemin
bioMérieux	Mešanica hrani za gojišča PolyViteX, Barvilo kristalvijolično, Lugol, Barvilo sarfranin, Jamesov reagent, FB reagent, NIT1, NIT2 reagenti
Kefo	96-odstotni etanol
Roche	Konaktion (Vitamin K ₁)
Merck	Dehidrirana osnova za krvni agar: Blood Agar Base, 4-(dimetil-amino)-benzaldehid, izoamilni alkohol, 37-odstotna klorovodikova kislina, ocetna kislina, NaCl, natrijev acetat trihidrat

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 7: Kemikalije in dodatki uporabljeni pri pripravi gojišč za kultivacijo in identifikacijo izolatov.

Proizvajalec	Kemikalija
Sigma Aldrich	3-odstotni vodikov peroksid, 1-odstotna vodna raztopina barvila akridin oranž, aceton alkohol, 100-odstotni metanol za fiksacijo preparatov, kanamicin (razt. 100 mg/mL), vankomicin (razt. 7,5 mg/mL)
Oxoid	Hemoglobinski prah, dehidrirana GC osnova za čokoladni agar: GC Agar Base

3.1.2 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabili pri izvedbi metod je našteta v preglednici 7.

Preglednica 8: Laboratorijska oprema uporabljena pri kultivaciji in identifikaciji izolatov.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Becton Dickinson	Avtomatski inkubator in analizator hemokultur: BACTEC 9120
	Avtomatski inkubator in analizator hemokultur: BACTEC 9240
	Merilec optične gostote: CrystalSpec
	Igle za precepljanje hemokultur
bioMérieux	Avtomatski inkubator in analizator hemokultur: BacT ALERT 3D
	Merilec optične gostote: Denzimat
	Merilec optične gostote: Vitek DENSICHEK
	Avtomatska elektronska pipeta
	Vrečke za vzpostavljanje anaerobne atmosfere: GENbox anaer
	Indikator anaerobne atmosfere z metilenskim modrilom: Anaer Indicator
	Ampulne stekleničke (za izvedbo API testa)
	Ščitnik ampulne stekleničke (za izvedbo API testa)
Binder	Inkubator nastavljen na 35–37 °C s 5 % CO ₂ atmosfero
BMS International	Inokulator petrijevk: JROEPA

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 7: Laboratorijska oprema uporabljena pri kultivaciji in identifikaciji izolatov.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Brand	Avtomatizirana črpalka: Dispensette®
	Krovna stekelca
Iskra PIO	Brezprašna varnostna komora 2. stopnje: LFVP9
OPTON	Fluorescentni mikroskop za pregledovanje preparatov barvanih z akridin oranžem: Axioplan OPTON
Labo d.o.o.	Grelna plošča za sušenje preparatov: TPb
LTH	Termostatska soba nastavljena na 35- 37 °C
MARIENFELD	Objektna stekelca
Nikon	Svetlobni mikroskop za pregledovanje preparatov barvanih po Gramu: Nikon eclipse 80i
OXOID	Lonec za vzdrževanje anaerobne atmosfere iz polikarbonata ali polipropilena
SARSTEDT	Sterilne plastične kapalke Plastične sterilne cepilne zanke
Sartorius stedim	Sistem za pridobivanje destilirane vode: avium® proUV
Tehtnica®	Vibracijski mešalnik: Vibromix 10

3.1.3 Vzorci

Vzorce (preglednica 8) za preiskave smo pridobili iz različnih oddelkov Kliničnega centra Ljubljana in nekaterih splošnih bolnišnic. Vključili smo le kužnine, kjer so se pojavile anaerobne bakterije. Spremljali smo tako anaerobne kot tudi aerobne in fakultativno anaerobne bakterije, ki so v nekaterih kužinah spremljale anaerobe kot mešane okužbe.

Preglednica 9: Preiskovani punktati telesnih tekočin.

Področje	Punktati
Glava in prsni del	Plevrálni, pljučni, torakalni, mediastinalni, perikardialni, intraokularni, punktati srednjega ušesa in punktati obnosnih votlin
Trebuh	Peritonealni, amnijski, punktati Douglasovega prostora, punktati jajčnika in punktati ledvice

3.1.4 Gojišča in reagenti

Gojišča in reagenti, ki smo jih uporabili pri izvedbi metod so našteti v preglednici 9.

Preglednica 10: Gojišča in reagenti, ki smo jih uporabljali za kultivacijo, izolacijo in identifikacijo bakterij.

Gojišče/ reagent	Sestavine in priprava
Tioglikolatni bujon (TIO) (1 L)	29,8 g dehidriranega gojišča, ki je sestavljeno iz 15 g/L kazeina iz trebušne slinavke, 5 g kvasnega ekstrakta, 5,5 g dekstroze, 2,5 g natrijevega klorida, 0,5 g L-cisteina, 0,5 g natrijevega tioglikolata, 0,75 g Bacto agarja in 0,001 g resazurina. Pred uporabo smo gojišče alikvotirali v epruvete po 7 mL in avtoklavirali.
Schaedler gojišče (Sch) (1 L)	43 g dehidriranega gojišča Brucella agar sestavljenega iz 10 g kazeina iz trebušne slinavke, 10 g razgrajenega živalskega tkiva, 1 g dekstroze, 2 g kvasnega ekstrakta, 5 g natrijevega klorida, 0,1 g natrijevega bisulfita, 15 g agarja in hemin smo raztopili, avtoklavirali in ohladili. Z aseptičnimi tehnikami smo dodali vitamin K in sterilno defibrinirano ovčjo kri in razlili v petrijeve posodice do debeline 3–5 mm.
Krvni agar (KA) (1 L)	Osnova Blood Agar Base iz 20 g srčnega ekstrakta, 5 g natrijevega klorida in 15 g agarja. Po avtoklaviranju, smo ohladili in aseptično dodali citirano govejo kri. Razlili smo v petrijeve posodice do debeline 3–5 mm.
Čokoladni agar (ČA) (0,5 L)	Dehidrirana GC osnova iz 15 g specialnega peptona, 1 g koruznega škroba, 5 g natrijevega klorida, 4 g K_2HPO_4 , 1 g KH_2PO_4 in 10 g agarja. Po avtoklaviranju smo ohladili in aseptično dodali 10 g/L hemoglobina in 10 mL oziroma 1 ampulo MelangePolyVitek, razlili smo v petrijeve posodice do debeline 3–5 mm.
Kanamicin vankomicin agar z lakirano krvjo (KVLB) (1 L)	Dehidrirana osnova Brucella agarja iz 10 g kazeina iz trebušne slinavke, 10 g razgrajenega živalskega tkiva, 1 g dekstroze, 2 g kvasnega ekstrakta, 5 g natrijevega klorida, 0,1 g natrijevega bisulfita in 15 g agarja. Po avtoklaviranju raztopine smo ohladili in z aseptičnimi tehnikami dodali sterilne dodatke: 50 mL lakirane ovčje krvi, 1 mL vitamina K ₂ (1 mg/mL), 1 mL hemina (5 mg/mL), 1 mL vankomicina (7,5 mg/mL) in 0,75 mL kanamicina (100 mg/mL). Razlili smo v petrijeve posodice do debeline 3–5 mm.

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 9: Laboratorijska oprema uporabljena pri kultivaciji in identifikaciji izolatov.

Gojišče/reagent	Sestavine in priprava
Tripsin bujon (1 L)	10 g dehidriranega Bacto-Triptona. Odpipetirali smo po 7 mL v epruvete in avtoklavirali.
0,2 M acetatni pufer s pH 4	11,46 mL ocetne kisline smo dodajali destilirano vodo do 1 L skupnega volumna. V 250 mL destilirane vode smo raztopili 6,8 g natrijevega acetata trihidrata. Tej raztopini smo dolili predhodno pripravljeno ocetno kislino do pH 4. Prefiltrirali smo skozi filter s porami premera 0,2 µm in aseptično nalili v sterilno stekleničko.
Barvilo akridin oranž	V merilni valj smo odmerili 5 mL osnovne 1-odstotne raztopine barvila akridin oranž in dodali 45 mL acetatnega pufra s pH 4. Vlili smo v zatemnjeno stekleničko za barvanje.
Kovacs-ev reagent	50 g 4-dimetilamino benzaldehida in 750 mL izoamil alkohola smo raztopili z uporabo magnetnega mešala, dodali 37-odstotno klorovodikovo kislino, dobro premešali in prefiltrirali skozi filter papir v steklenico, ki ne prepušča svetlobe.

Vsa gojišča smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C.

3.1.5 Identifikacijski sistemi

Identifikacijski sistemi, ki smo jih uporabili pri izvedbi metod so našteti v preglednici 10.

Preglednica 11: Identifikacijski sistemi uporabljeni pri identifikaciji izolatov.

Proizvajalec	Identifikacijski testi
bioMérieux	Vitek® 2 ANC
	API® rapid ID 32 A

3.2 METODE

Pri identifikaciji anaerobnih bakterij in določanju njihove občutljivosti za antibiotike, smo uporabili klasične metode in komercialne identifikacijske sisteme.

3.2.1 Mikrobiološka preiskava tekočin iz normalno sterilnih mest

Po prejetju vzorca v laboratorij smo s sterilno plastično kapalko aseptično odvzeli kapljico punktata in jo razmazali na objektno stekelce. Pripravljen preparat smo posušili, fiksirali z metanolom in obarvali po Gramu. Nato smo preparat opazovali z svetlobnim mikroskopom pri 1000-kratni povečavi, skušali določiti morfologijo in obarvanje po Gramu. S kapalko smo nato zopet aseptično odvzeli punktat in ga približno 1 mL inokulirali v tekoči tioglikolatni bujon, 2 kapljici smo kanili na Schaedler agar (Sch), čokoladni agar (ČA) in krvni agar (KA) in razmazali po SOP Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo. Na krvnem agarju smo po sredini petrijeve posode potegnili še stafilokokno črto za hitrejšo identifikacijo *Haemophilus influenzae*. Punktate v hemokulturnih stekleničkah, smo preiskali le v primeru, ko so jih sistemi BacT/ALERT (poglavlje 3.2.2.) zaznal kot pozitivne. Takrat smo tudi opravili zgoraj omenjen postopek.

3.2.2 Hemokulture

Hemokulture smo preiskovali s pomočjo sistemov in gojišč BACTEC (Becton Dickinson) in BacT/ALERT (bioMérieux) za detekcijo mikrobne rasti (preglednica 11). Pri obeh sistemih temelji detekcija na podlagi tvorbe CO₂ v gojišču. Poleg tega pa sistem BACTEC sprembla tudi spremembo pH, ki se odraža kot sprememba flurescence gojišča.

Preglednica 12: Sistemi, gojišča in namen pri preiskovanju hemokultur.

	Sistem BACTEC	Sistem BacT/ALERT	Detekcija
Gojišča, kamor inokuliramo kri	BACTEC Plus Aerobic F BACTEC Lytic Anaerobic F BACTEC Peds Plus F	BacT/ALERT FA BacT/ALERT FN BacT/ALERT PF	Aerobne bakterije Anaerobne bakterije Anaerobne in aerobne bakterije pri otrocih

Ob pozitivni rasti v steklenički smo zunanjost le-te sprva razkužili in preko zamaška z iglo odvzeli nekaj tekočine za barvanje po Gramu in z akridin oranžem. Na objektna stekelca smo nanašali po dve kapljici tekočine. Podobno količino smo nanesli tudi na Sch (le za detekcijo anaerobov), ČA in KA ter razmazali po SOP Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo.

3.2.3 Inkubacija gojišč za izolacijo anaerobnih bakterij

Gojišča za izolacijo anaerobnih bakterij smo inkubirali v anaerobnih loncih oz. loncih za inkubacijo v posebnih atmosferskih pogojih. Anaerobni lonec je plastična ali kovinska posoda s pokrovom in je nepropustna za pline. Uporablja se za inkubacijo vzorcev, v katerih so lahko bakterije, ki potrebujejo anaerobno atmosfero. To, z deleži plinov 5 % CO₂, 10 % H₂ in 85 % N₂, ustvarimo na kemičen način s pomočjo ustreznih komercialnih reagentov.

Zasejane petrijeve posode s kulturo in indikator anaerobne atmosfere Anaer Indicator (bioMérieux), katerega smo predhodno navlažili s kapljico destilirane vode, smo vstavili v lonec za anaerobno kultivacijo. Indikator ima modro reakcijsko mesto (oksidirano metilensko modrilo), ki se v odsotnosti kisika in prisotnosti anaerobne atmosfere razbarva. V sistem smo vstavili tudi reagent za vzpostavljanje anaerobnih razmer GENbox anaer (bioMérieux). Ustreznost vstavljenih reagentov in indikatorjev smo preverjali s sevom *Clostridium novyi* ATCC 19402. Zaprt lonec smo inkubirali pri 35–37 °C 48 h.

3.2.4 Identifikacija anaerobnih bakterij

Pogoj, da smo lahko izvedli identifikacijo anaerobnih bakterij je bila izolacija bakterij v čisti kulturi. Po inkubaciji primarnih vzorcev oz. nacepljenih punktatov ali hemokultur, smo običajno dobili mešane kulture. Vsako različno kolonijo smo nato nanesli na Sch agar in inkubirali pri 35–37 °C v anaerobni atmosferi, da bi pridobili čisto kulturo z eno anaerobno bakterijo. Vzporedno smo to isto kolonijo nanesli še na krvni agar in inkubirali v inkubatorju nastavljenem na 35–37 °C s 5 % CO₂ atmosfero.

3.2.4.1 Klasične metode identifikacije anaerobnih bakterij

Klasične metode identifikacije anaerobnih bakterij obsegajo rast na Sch in KVLB agarju, barvanje po Gramu, barvanje z akridin oranžem, katalazni test in indol test.

3.2.4.1.1 Rast na Schaedler agarju in agarju s kanamicinom, vankomicinom ter z lakirano krvjo

V primeru, da je bakterija zrasla na Sch agarju in na krvnem agarju v inkubatorju s 5 % CO₂ atmosfero izolata je nismo uvrstili med anaerobne bakterije. Če se je izolat pojavit le na Schaedler agarju smo nadaljevali z identifikacijo s klasičnimi metodami in komercialnimi testi. Na kanamicin vankomicin agar z lakirano krvjo (KVLB) smo nacepili tako primarne kužnine kot čiste izolate, da bi dobili približno informacijo o rodu anaerobne bakterije. Za kanamicin in vankomicin občutljive bakterije na KVLB agarju niso zrasle.

3.2.4.1.2 Barvanje po Gramu

Na stekelce smo razmazali v fiziološki raztopini suspendirano kolonijo ali pa nanesli eno do dve kapljici tekočine iz hemokulturne stekleničke ali punktata. Razmaz smo posušili pri 60 °C na grelni plošči. Preparat smo nato fiksirali s 100 % metanolom. Fiksiranega smo barvali s kristalvijoličnim barvilom od 30 do 60 s, sprali z vodo in prelili z lugolom. Po 30 do 60 s smo preparat razbarvali z aceton alkoholom. Po petih s ali ko je postal izpirek brezbarven, smo zopet sprali z vodo. Sledilo je 30 s barvanje s safraninom, spiranje barvila z vodo in sušenje preparata.

3.2.4.1.3 Barvanje z akridin oranžem

Na stekelce smo nanesli eno do dve kapljici tekočine iz hemokulturne stekleničke. Razmaz smo sušili pri 60 °C na grelni plošči. Preparat smo nato fiksirali s 100 % metanolom. Fiksiranega smo prelili z akridin oranžem in pustili stati 2 min. Po 2 min smo barvilo sprali z vodo in preparat posušili.

3.2.4.1.4 Katalazni test

Prisotnost katalaz smo preverjali tako, da smo izolat s plastično cepilno zanko nanesli v kapljico 3 % vodikovega peroksida. Pozitivno reakcijo smo potrdili s pojavom mehurčkov v raztopini.

3.2.4.1.5 Indol test

Pri tem testu smo analizirali sposobnost bakterije, da cepi triptofan v tripsin bujonu do indola, prisotnost katerega pa lahko dokažemo s Kovacs-evim reagentom. V omenjen bujon smo aseptično nacepili čisto kulturo in inkubirali 48 ur pri 35–37 °C. Po inkubaciji smo dodali še Kovacs-ev reagent. V primeru pojava rožnatega obroča je bil rezultat testa pozitiven.

3.2.4.2 Identifikacijski sistem API® rapid ID 32 A

Čisto kulturo, ki je zrasla na Sch agarju smo suspendirali v API® mediju (bioMérieux) v 2 mL ampulni steklenički do gostote 4 po McFarlandu. Suspenzijo smo nato odpipetirali po 55 µL v vsako vdolbinico API® testne ploščice (bioMérieux). Vdolbinico za test prisotnosti ureaze (URE test) smo prekrili še z dvema kapljicama mineralnega olja. Po štirih urah inkubacije pri 35–37 °C smo dodali še reagente za test nitratne redukcije – NIT1 in NIT2 reagente (bioMérieux), Jamesov reagent za test produkcije indola in Fast Blue reagent (FB reagent) za detekcijo kanabionoidov, fenolov in podobnih spojin (bioMérieux) v vdolbinice po navodilih proizvajalca. Nato smo odčitali rezultate reakcije z uporabo identifikacijske opreme ATB™Expression™.

3.2.4.3 Identifikacijski sistem VITEK 2 ANC

Najprej smo v polistirensko epruveto z avtomatsko črpalko dodali 3 mL fiziološke raztopine za pripravo inokuluma. Nato smo sterilno odvzeli izolirano kolonijo bakterije in v epruveti pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 2,7-3,3 po McFarlandu. Epruveto s suspenzijo smo nato vstavili v nosilec, namestili kaseto s kartico ANC (bioMérieux) s substrati za identifikacijo anaerobnih bakterij na podlagi prisotnosti encimov (levcin

arilamidaze, fenilalanin arilamidaza, L-prolin arilamidaza, L-pirolidonil arilamidaza, tirozin arilamidaza, alanin-fenilalanin-prolin arilamidaza, beta-D-fukozidaza, alfa-L-fukozidaza, ureaza, fosfataza, eskulin hidrolaza, indoksil beta-galaktopiranozidaza, alfa-arabinozidaza in beta-manozidaza) in sposobnosti razgradnje nekaterih substratov (D-galaktoze, substrat po Ellmanu, D-celobioza, D-glukoza, D-manoza, D-maltoza, saharoza/sukroza, arbutin, N-acetil-D-glukozamin, 5-bromo-4-kloro-3-indoksil-beta-glukozid, 5-bromo-4-kloro-3-indoksil-beta-glukuronid, 5-bromo-4-kloro-3-indoksil-alfa-galaktozid, arginin GP, piruvat, maltotrioza, 5-bromo-4-kloro-3-indoksil-beta-N-acetil-glukozamid, 5-bromo-4-kloro-3-indoksil-alfa-manozid, L-arabinoza, D-riboza 2, fenilfosfonat, alfa-L-arabinofuranozid in D-ksiloza).

V računalnik smo vnesli tudi podatke o rezultatih barvanja po Gramu (Gram pozitivni, Gram negativni, Gram variabilni), morfologiji (bacili, koki, kokobacili) in aerotoleranci (anaerobni, aerobni, fakultativni). Na koncu smo na Sch agar nacepili pripravljeno suspenzijo, ki služi kot kontrola čistosti kulture in suspenzije in anaerobno inkubirali. Biokemijski profil se pridobi na podlagi metabolizma substratov. Končno ime bakterije je rezultat primerjave biokemijskega profila testirane bakterije z biokemijskimi profili bakterij, ki so del informacijske baze sistema.

3.2.5 Testi za določanje občutljivosti bakterij za antibiotike

Za določanje občutljivosti izoliranih in identificiranih bakterij smo uporabili teste antibiotičnega gradiента – Eteste (bioMérieux). To so plastični trakovi, ki imajo nanešen gradient koncentracij antibiotika. Namenjeni so za določanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Trak z antibiotikom smo položili na petrijevo posodico s Sch gojiščem, kjer smo predhodno s sterilnim bombažnim brisom enakomerno razporedili suspenzijo izolata bakterije z gostoto 1 po McFarlandu (CLSI, 2007) V preglednici 12 so našteti uporabljeni Etesti in njihove mejne vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije.

Preglednica 13: Etesti za določanje občutljivosti anaerobnih bakterij na antibiotike in mejne vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije.

Antibiotik	Etest	Mejne vrednosti MIK ($\mu\text{g/mL}$)		
		S (\leq)	I (=)	R (\geq)
Penicilin	PGH	0,5	1	2
Klindamicin	CM	2	4	8
Amoksicilin/ klavulanska kislina	XL	4/ 2	8/ 4	16/ 8
Metronidazol	MZ	8	16	32
Imipenem	IP	4	8	16

3.2.5.1 Kontrola Etestov

Da bi ovrednotili veljavnost oz. verodostojnost uporabljenih antibiotičnih gradientov, smo naredili pozitivno kontrolo vseh petih Etestov. Aseptično smo odmrznili in nacepili sev *B. fragilis* ATCC® 25285 na Sch agar in ga 48 ur inkubirali v anaerobni atmosferi s 5 % CO₂, 10 % H₂ in 85 % N₂. Po inkubaciji smo kulturo seva suspendirali v fiziološki raztopini do gostote 1 po McFarlandu in nato z uporabo inokulatorja v aseptičnih pogojih enakomerno inokulirali plošče Sch agarja. Nanje smo položili Eteste tako, da je po inkubaciji enostavno razbrati rezultate (CLSI, 2007).

Preglednica 14: Vrednosti MIK pri sevu *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285 (CLSI, 2007).

Antibiotik	Etest	Standardne vrednosti MIK ($\mu\text{g/mL}$)
Penicilin	PGH	8-32
Klindamicin	CM	0,5-2
Amoksicilin/ klavulanska kislina	XL	0,25/0,125-1/0,5
Metronidazol	MZ	0,25-2
Imipenem	IP	0,03-0,25

Nato smo plošče inkubirali 48 ur v anaerobni atmosferi in po inkubaciji preverili ustreznost Etestov s primerjavo dobljenih vrednosti MIK s standardnimi MIK seva *B. fragilis* ATCC® 25285.

3.2.6 Filogenetska analiza sorodnosti izoliranih vrst na podlagi primerjave 16S rRNA zaporedij pridobljenih iz podatkovne baze RDP

Pri analizi sorodnosti na podlagi 16S rRNA smo uporabili sosedsko pridružitveno metodo filogenetske analize: NJ (ang. »Neighbor-joining«), za obdelavo zaporedij pa smo uporabili Kimurin dvoparametrični model nukleotidnih substitucij. Ker smo želeli le vizualno prikazati raznolikost bakterijskih vrst znotraj posameznih kužnin (področja telesa: trebuh, glava in prsni del, hemokulture) smo nukleotidna zaporedja 16S rRNA pridobili iz podatkovne baze RDP (ang. »Ribosomal Database Project«) (Olsen in sod., 1993), sami pa nismo izvajali metod za pridobitev teh zaporedij. Poravnavo zaporedij smo naredili s programskim orodjem ClustalX2 (Larkin in sod., 2007). Izračun razdalj med zaporedji smo opravili s programskim orodjem Phylip 3.69 (Baum, 1989). Za vizualizacijo sorodstvenih odnosov (v obliki filogenetskega drevesa) smo uporabili programsko orodje TreeView (Page, 1996).

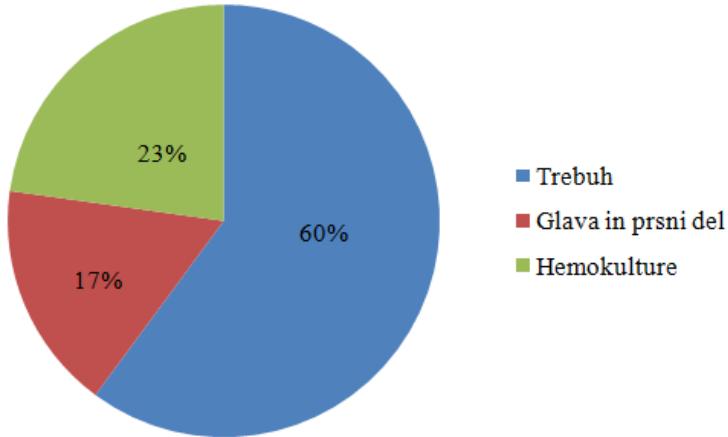
4 REZULTATI

4.1 IZOLATI ANAEROBNIH BAKTERIJ

Iz vseh kužnin skupaj smo osamili 158 prvih izolatov anaerobnih bakterij. Anaerobne bakterije, ki smo jih izolirali iz kužnin v laboratoriju smo uvrstili v tri večje skupine: izolate iz trebuha, izolate iz glave s prsnim delom in izolate iz krvi (preglednica 14, slika 12).

Preglednica 15: Število in deleži izolatov anaerobnih bakterij glede na kužnine iz katere so bili izolirani.

Kužnine	Skupno število bakterij (%)
Trebuh	95 (60 %)
Glava in prsn del	27 (17 %)
Hemokulture	36 (23 %)
Skupaj	158 (100 %)



Slika 12: Deleži izolatov anaerobnih bakterij glede na vrsto kužnine, iz katere so bile izolirane.

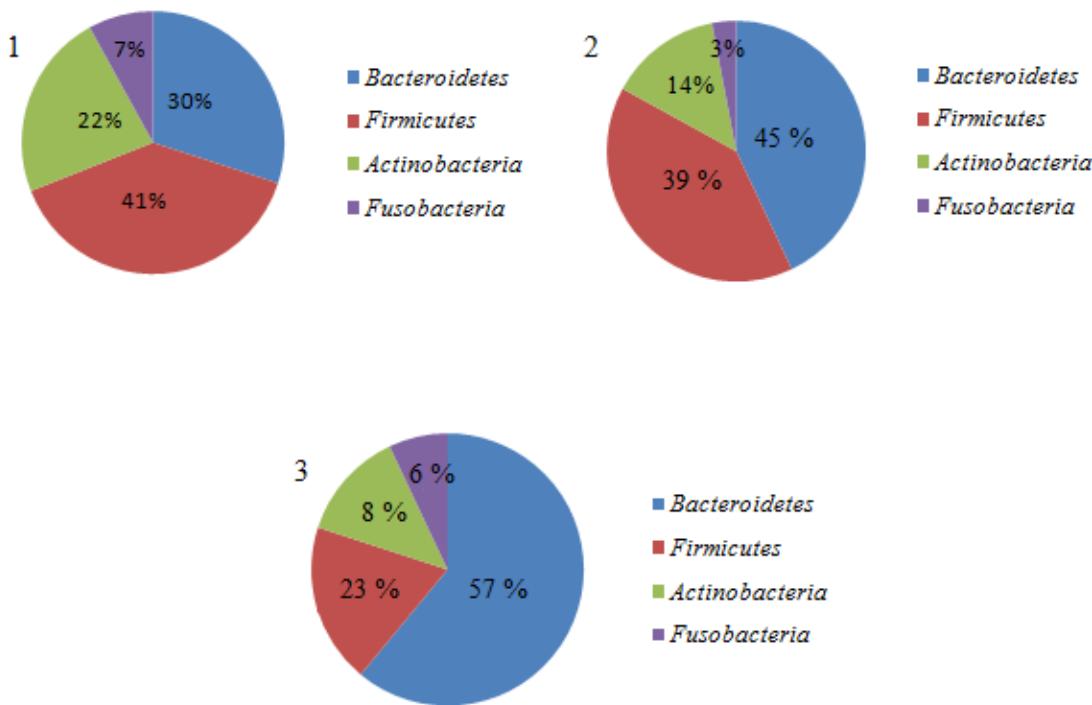
Iz 12340 vzorcev hemokultur in 4420 vzorcev drugih kužnin, ki smo jih pregledali od meseca oktobra do meseca marca, smo izolirali 158 izolatov anaerobnih bakterij. Največ anaerobnih bakterij smo izolirali iz predela trebuha, najmanj pa iz glave in prsnega dela.

Med vzorci iz predela trebuha so bili pozitivni brisi in vsebine abdominalnih abscesov, brisi in vsebine abdominalnih drenov, punktati analno, punktati trebušne votline, gnoj iz medenice, bris abscesa medeničnega dna, ascitesi in brisi ascitesov, placenta, košček

črevesa, vsebina abscesa ob vranici, punktati ledvice, punktat maternice, punktati rane presakralno, vsebina trebušne votline, punktati jeter, abscesi ob slepiču, peritiflitični abscesi in placenta. Med vzorci glave in prsnega dela pa smo anaerobne bakterije izolirali iz brisov abscesne votline submandibularno, brisov nosne ciste, punktatov dojke, možganskih abscesov, torakalnih puktatov in plevralnih punktatov.

Anaerobne bakterije, ki smo jih izolirali, taksonomsko uvrščamo v štiri debla in sicer *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* in *Fusobacteria*. Zaradi večjega števila predstavnikov rodu *Clostridium*, *Bacteroides* in *Prevotella* smo znotraj teh štirih debel razdelili izolate v manjše skupine. Predstavnike debla *Bacteroidetes* smo razdelili na skupino *Bacteroides* spp. in *Prevotella* spp, k slednji smo uvrstili tudi rod *Porphyromonas*. Predstavnike debla *Firmicutes* smo razdelili na skupino *Clostridium* spp. in skupino GPAC. Skupina *Fusobacterium* spp. spada v deblo *Fusobacteria* in GPNAB v deblo *Actinobacteria*.

Na sliki 13 vidimo deleže taksonomskih bakterijskih skupin po deblih glede na lokacijo izolacije. Pri vseh treh mestih izolacije je najmanjši delež predstavnikov debla *Fusobacteria*, drugi najmanjši delež predstavljajo izolati iz debla *Actinobacteria*. Pri izolatih iz predela prsi in glave je največ predstavnikov debla *Firmicutes*. Pri izolatih iz hemokultur je delež predstavnikov debla *Bacteroidetes* le za 3 % večji od deleža predstavnikov debla *Firmicutes*. Pri vzorcih iz trebuha delež predstavnikov debla *Firmicutes* obsega le 6 % več od debla *Actinobacteria*, medtem ko delež predstavnikov debla *Bacteroidetes* obsega več kot 60 % vseh izolatov iz predela trebuha.



Slika 13: Deleži posameznih bakterijskih skupin glede na lokacijo izolacije. Oznake: 1- glava in prsn. del, 2- hemokultura, 3- trebuh.

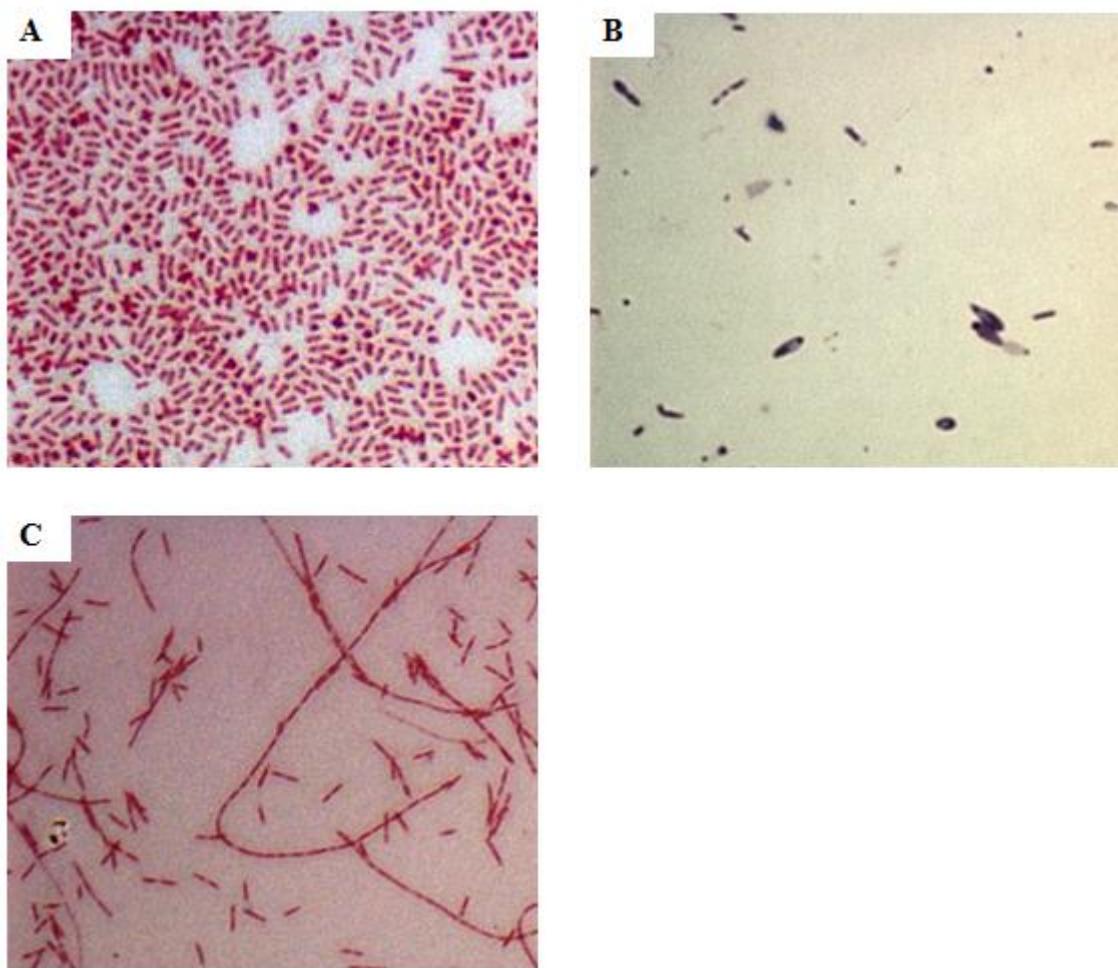
Kot je razvidno iz preglednice 15 smo v trebušnem delu in iz hemokultur izolirali največ predstavnikov rodu *Bacteroides*, v glavi in prsnem delu so prevladovali GPAC.

V preglednici 15 smo število in deleže anaerobnih bakterij navedli z uporabo dveh pristopov: glede na kužnine, iz katerih smo jih izolirali in glede na vrste bakterij oz. skupine, v katere smo anaerobne bakterije razdelili.

Preglednica 16: Število (%) anaerobnih bakterij po skupinah iz različnih kužnin.

IZOLATI	<i>Bacteroides</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Clostridium</i>	Po Gramu pozitivni anaerobni koki	Po Gramu pozitivni nesporulirajoči anaerobni bacili	<i>Fusobacterium</i>	<i>Skupaj</i>
	spp.	spp.	spp.			spp.	
glava in							27 (100 %)
prsn. del	4 (15 %)	4 (15 %)	0	11 (41 %)	6 (22 %)	2 (7 %)	
hemokulture	14 (39 %)	2 (6 %)	9 (25 %)	5 (14 %)	5 (14 %)	1 (3 %)	36 (100 %)
trebuh	33 (35 %)	21 (22 %)	14 (15 %)	8 (8 %)	13 (8 %)	6 (6 %)	95 (100 %)
Skupaj	51 (32 %)	27 (17 %)	23 (15 %)	24 (15 %)	24 (15 %)	9 (6 %)	158 (100 %)

Primeri mikroskopskih slik izolatov so prikazani na sliki 14.



Slika 14: Mikroskopske slike izolatov vrste *Bacteroides fragilis*, izolirane iz abdominalnega abscesa (A), bakterij *Clostridium* spp. izoliranih iz hemokultur (B) in *Fusobacterium nucleatum* izolirane iz plevravnega punktata (C).

Predstavniki *Bacteroides* spp. in *Prevotella* spp. so bili najbolj pogosti v trebušnem predelu, prav tako tudi predstavniki *Clostridium* spp. (priloga A). GPAC so bili najbolj pogosto izolirani iz predela glave in prsnega dela, GPNAB pa v predelu trebuha. Predstavniki *Fusobacterium* spp. so bili le z manjšim odstopanjem bolj prisotni v trebuhu ter glavi in prsnem delu (preglednica 15).

Najpogostejsi izolati predela glave in prsnega dela so pripadali *P. acnes*, takoj za njimi pa *F. magna* in *Peptostreptococcus* spp. (priloga A).

Kar 25 % vseh izolatov iz hemokultur smo uvrstili v *B. fragilis*, medtem ko ostale vrste anaerobnih bakterij ne izstopajo po pogostosti izolacije (priloga A).

Iz priloge A je prav tako razvidno, da so bili v trebuhu najpogosteje izolirani predstavniki *B. fragilis*, med deleži ostalih vrst bakterij pa ni bilo velikih razlik. Raznolikost predstavnikov vrst anaerobnih bakterij v trebuhu je bila precej velika, zato kljub temu, da prevladujejo predstavniki *B. fragilis*, zastopajo le 15 %.

4.2 KONTROLE Etestov

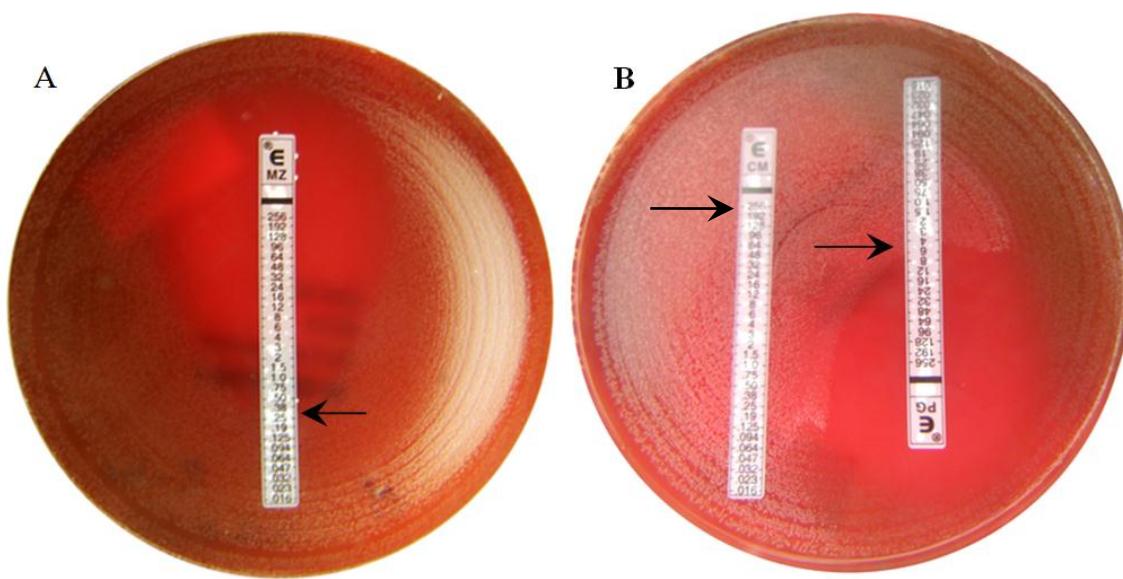
Rezultati kontrole antibiotičnih gradientov Etestov, ki smo jih uporabljali pri določanju občutljivosti bakterij za antibiotike penicilin, klindamicin, amoksicilin/klavulansko kislino, imipenem in metronidazol s sevom *B. fragilis* ATCC® 25285, so obsegali standardne vrednosti inhibitornih koncentracij. Tako smo s sevom *B. fragilis* ATCC® 25285 veljavnost Etestov potrdili, kar je vidno iz primerjave rezultatov (preglednica 16) in standardnih vrednosti (preglednica 13).

Preglednica 17: Rezultati kontrole veljavnosti uporabljenih Etestov s sevom *Bacteroides fragilis* ATCC® 25285.

Antibiotik	Etest	Vrednosti MIK ($\mu\text{g/mL}$) pri kontroli Etestov
Penicilin	PG	16
Klindamicin	CM	1
Amoksicilin/ klavulanska kislina	XL	0,75
Metronidazol	MZ	0,75
Imipenem	IP	0,064

4.3 DELEŽI ANAEROBNIH BAKTERIJ ODPORNIH PROTI ANTIBIOTIKOM

Deleži anaerobov odpornih proti različnim antibiotikom so povzeti v preglednici 17, na sliki 15 pa je prikazan primer za metronidazol občutljivega izolata in primer izolata, ki je odporen proti penicilinu in klindamicinu. *B. fragilis* je naravno odporen proti penicilinu, in tudi sevi ostalih vrst *Bacteroides* so se izkazali kot odporni proti penicilinu. Pridobljeno odpornost proti penicilinu smo zasledili pri 56 % izolatov uvrščenih v rod *Prevotella* in *Porphyromonas*, medtem ko je bilo proti penicilinu odpornih 17 % predstavnikov rodu *Clostridium*.



Slika 15: Za metronidazol občutljiv izolat (A). Puščica označuje MIK pri $0,25 \mu\text{g}/\text{mL}$. Proti klindamicinu in penicilinu odporen izolat (B). Puščica pri Etestu s penicilinom označuje MIK pri $4 \mu\text{g}/\text{mL}$ in puščica pri Etestu s klindamicinom označuje MIK pri $256 \mu\text{g}/\text{mL}$. Na slikah se vidijo ihibicijske cone okoli Etestov, s pomočjo katerih smo določili odpornost proti antibiotikom.

Med izolati predstavnikov rodu *Bacteroides* je bilo 18 % odpornih proti klindamicinu, medtem ko je bilo 26 % izolatov rodu *Prevotella* ter 26 % izolatov rodu *Clostridium* odpornih proti klindamicinu. Proti klindamicinu sta bila odporna dva izolata GPAC in en izolat GPNAB.

Odpornost proti amoksicilin/klavulanski kislini smo zasledili le pri rodovih *Bacteroides* in *Prevotella*, kjer je bila pojavnost odpornosti pri rodovih *Prevotella* (11 %) višja kot pri rodovih *Bacteroides* (6 %).

Preglednica 18: Število (%) anaerobov odpornih proti penicilinu, klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini. V preglednici nismo predstavili odpornosti proti metronidazolu in imipenemu, saj nismo izolirali nobenega seva, ki bi bil odporen proti imipenemu. Odporni proti metronidazolu pa so bili le predstavniki *Actinomyces* in *Propionibacterium*, ki so naravno odporni.

IZOLATI	št. odpornih proti penicilinu/ št. vseh (%)	št. odpornih proti klindamicinu/ št. vseh (%)	št. odpornih proti amoksicilin/klavulanski kislini/ št. vseh (%)
<i>Bacteroides</i> spp.	51/51 (100 %)	9/51 (18 %)	3/51 (6 %)
<i>Prevotella</i> spp. in			
<i>Porphyromonas</i> spp.	15/27 (56 %)	7/27 (26 %)	3/27 (11 %)
<i>Clostridium</i> spp.	4/23 (17 %)	6/23 (26 %)	0/23 (0 %)
<i>Fusobacterium</i> spp.	1/9 (11 %)	0/9 (0 %)	0/9 (0 %)
Po Gramu pozitivni anaerobni koki	0/26 (0 %)	2/26 (8 %)	0/26 (0 %)
Po Gramu pozitivni nesporulirajoči anaerobni bacili	0/25 (0 %)	1/25 (4 %)	0/25 (0 %)

4.3.1 Občutljivost za penicilin, klindamicin in amoksicilin/klavulansko kislino pri izolatih rodu *Bacteroides*

Največ proti klindamicinu odpornih izolatov v rodu *Bacteroides* je bilo iz vrste *B. fragilis* (preglednica 18). Odpornost proti amoksicilin/klavulanski kislini smo zasledili le pri izolatih identificiranih kot pripadniki *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* in *P. distasonis*. Izolat *B. fragilis*, ki je bil odporen proti amoksicilin/klavulanski kislini je bil odporen tudi proti penicilinu. Izolata *B. thetaiotaomicron* in *P. distasonis* sta bila odporna proti trem antibiotikom: penicilinu, amoksicilin/klavulanski kislini in še proti klindamicinu.

Preglednica 19: Število izolatov znotraj *Bacteroides* spp., *Parabacteroides distasonis* in *Pseudoflavonifractor capillosus* odpornih proti klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini. Slednjo vrsto so tekom tega laboratorijskega dela identifikacijski sistemi še vedno uvrščali med bakterije vrste *Bacteroides capillosus*.

IZOLATI	št. odpornih proti klindamicinu/ št vseh	št. odpornih proti amoksicilin/klavulanski kislini/ št. vseh
<i>B. fragilis</i>	4/25	1/25
<i>B. ovatus</i>	1/7	0/7
<i>B. thetaiotaomicron</i>	1/5	1/5
<i>B. vulgatus</i>	1/4	0/4
<i>B. caccae</i>	0/1	0/1
<i>Bacteroides</i> spp.	0/1	0/1
<i>P. distasonis</i>	1/2	1/2
<i>P. capillosus</i>	1/6	0/6
Skupaj	9/51 (18 %)	3/51 (6 %)

4.3.2 Občutljivost za penicilin, klindamicin in amoksicilin/klavulansko kislino pri izolatih rodu *Prevotella* in *Porphyromonas*

V preglednici 19 so navedeni deleži odpornosti proti penicilinu, klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini pri posameznih vrstah rodu *Prevotella* in *Porphyromonas*.

Opazili smo odpornost proti večim antibiotikom in sicer: en izolat *P. bivia* je bil odporen proti penicilinu in amoksicilin/klavulanski kislini, en izolat *P. disiens* je bil odporen proti klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini, en izolat *P. buccae* pa je pridobil odpornost proti trem antibiotikom, penicilinu, klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini.

Preglednica 20: Število izolatov znotraj vrst rodu *Prevotella* in *Porphyromonas* odpornih proti penicilinu, klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini.

IZOLATI	št. odpornih proti penicilinu/ št. vseh	št. odpornih proti klindamicinu/ št. vseh	št. odpornih proti amoksicilin/klavulanski kislini/ št. vseh
<i>Prevotella bivia</i>	2/4	0/4	1/4
<i>Prevotella buccae</i>	2/4	1/4	1/4
<i>Prevotella intermedia</i>	2/3	1/3	0/3
<i>Prevotella disiens</i>	1/3	2/3	1/3
<i>Prevotella</i> spp.	3/5	2/5	0/5
<i>Prevotella oralis</i>	2/2	0/2	0/2
<i>Prevotella buccalis</i>	1/1	0/1	0/1
<i>Prevotella denticola</i>	1/1	0/1	0/1
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0/1	0/1	0/1
<i>Prevotella loeschi</i>	0/1	1/1	0/1
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1/2	0/2	0/2
Skupaj	15/27 (56 %)	7/27 (26 %)	3/27 (11 %)

4.3.3 Občutljivost za penicilin, klindamicin in amoksicilin/klavulansko kislino pri izolatih rodu *Clostridium*

V preglednici 20 je navedeno število izolatov rodu *Clostridium*, ki so bili odporni proti penicilinu, klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini.

Izlat, ki ga nismo uspeli identificirati do vrste je bil istočasno odporen proti penicilinu in klindamicinu, medtem ko so bili širje izolati odporni le proti penicilinu in pet izolatov le proti klindamicinu.

Preglednica 21: Število izolatov znotraj vrst rodu *Clostridium* odpornih proti penicilinu, klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini.

IZOLATI	št. odpornih proti penicilinu/ št. vseh	št. odpornih proti klindamicinu/ št. vseh	št. odpornih proti amoksicilin/klavulanski kislini/ št. vseh
<i>Clostridium perfringens</i>	0/5	0/5	0/5
<i>C. bifermentas</i>	0/3	1/3	0/3
<i>C. paraputrifificum</i>	0/2	1/2	0/2
<i>C. ramosum</i>	0/2	1/2	0/2
<i>C. butyricum</i>	1/2	0/2	0/2
<i>C. clostradioforme</i>	1/2	1/2	0/2
<i>C. tertium</i>	0/1	1/1	0/1
<i>C. septicum</i>	1/1	0/1	0/1
<i>C. sporogenes</i>	0/1	0/1	0/1
<i>Clostridium</i> spp.	1/4	1/1	0/4
Skupaj	4/23 (17 %)	6/23 (26 %)	0/23 (0 %)

4.3.4 Polimikrobne okužbe

Iz večine kužnin smo izolirali več kot eno bakterijo (mešane oziroma polimikrobne okužbe z več anaerobnimi bakterijami in tudi aerobnimi bakterijami), kar je razvidno iz preglednice 21 in slike 16.

Preglednica 22: Število izolatov iz mešanih okužb anaerobnih, fakultativno anaerobnih in aerobnih bakterij.

Kužnine	Število izoliranih anaerobnih bakterij	Prisotnost drugih mikrobov	Delež mešanih okužb (%)
Hemokulture	36	12	33,3 %
Trebuh	95	86	90,5 %
Glava in prsni del	27	15	55,6 %
Anaerobni izolati	158	113	71,5 %

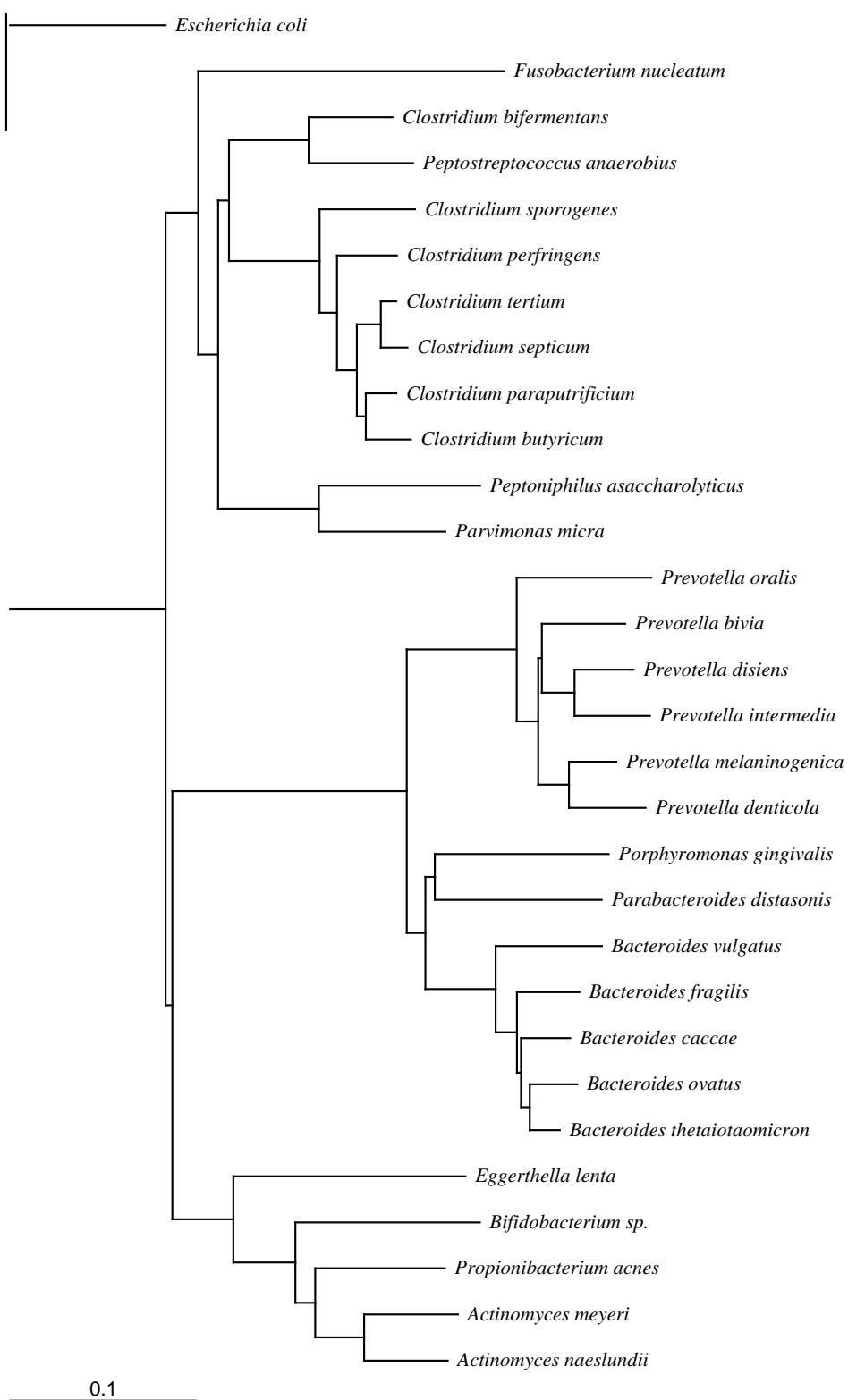
V preglednici 21 smo prikazali, koliko anaerobnih okužb je bilo mešanih, torej spremljenih še z aerobnimi mikroorganizmi oziroma fakultativno anaerobnimi. Največ mešanih okužb je bilo v predelu trebuha (skoraj vse okužbe) in najmanj iz hemokultur.



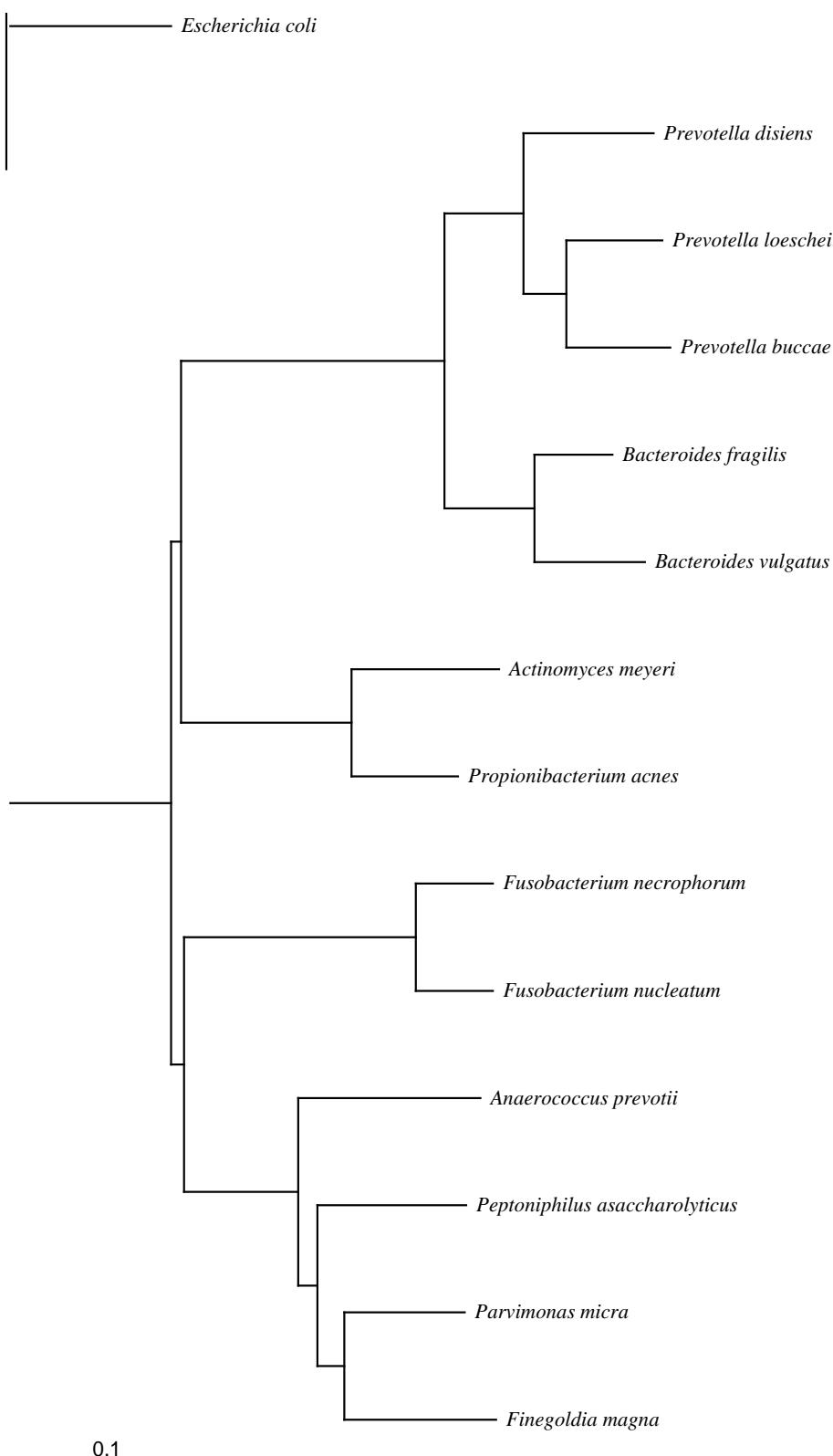
Slika 16: Fotografija mešane kulture brisa abdominalnega abscesa na Schaedler agarju. Vidna sta *Bacteroides fragilis* (belo-sive), *Prevotella melaninogenica* (črne) in bakterije, ki so se izkazale za aerobne.

4.4 EVOLUCIJSKA ANALIZA IZOLATOV IZ HEMOKULTUR, GLAVE IN PRSNEGA DELA IN TREBUHA

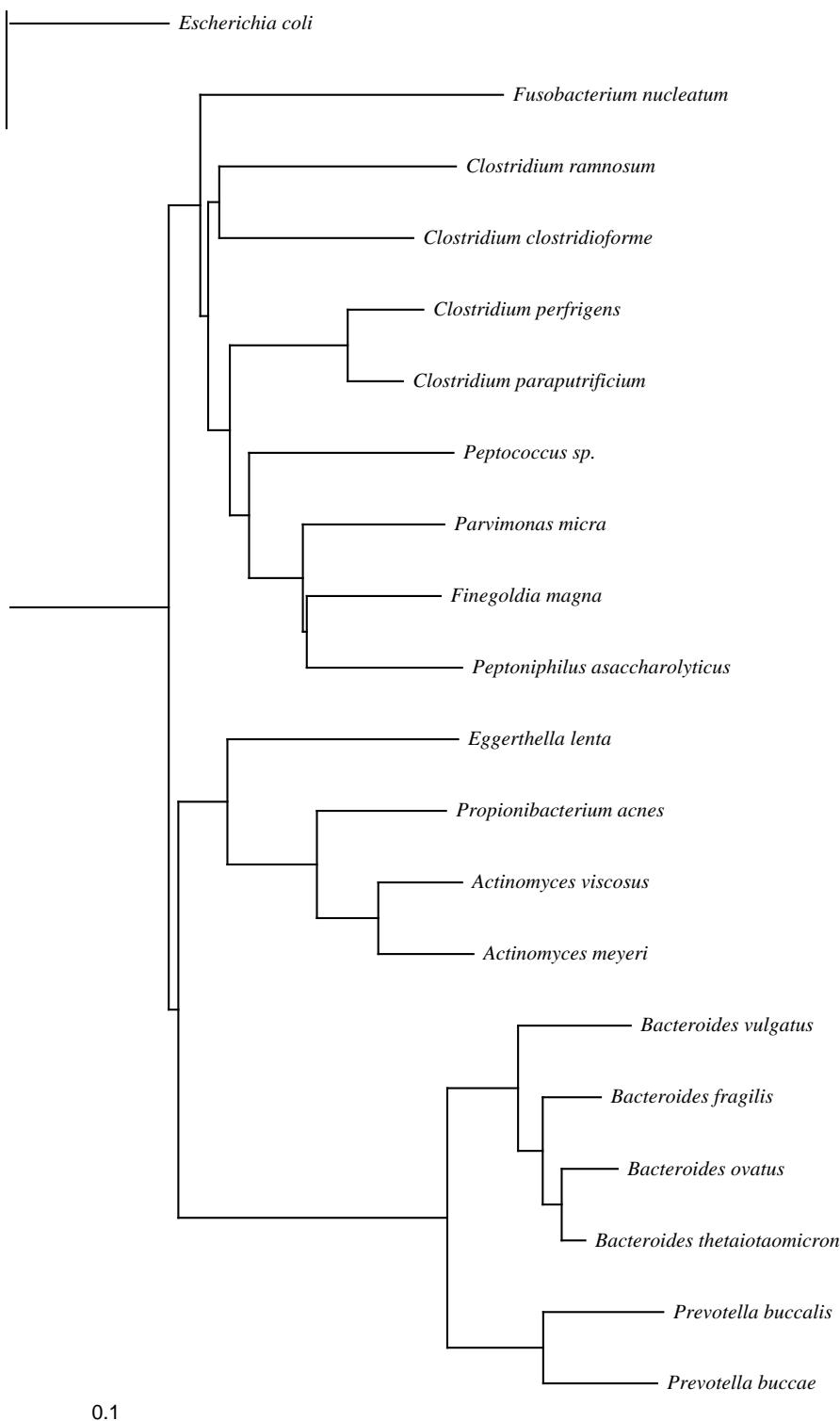
Z evolucijsko analizo izolatov smo prikazali filogenetske odnose med izoliranimi bakterijami in samo raznolikost pojavnosti anaerobnih bakterijskih vrst glede na področje izolacije. Rezultate teh analiz vidimo na sliki 17, sliki 18 in sliki 19, kjer je razvidno, da je največja razlika v raznolikosti vrst med predelom trebuha in predelom glave s prsnim delom.



Slika 17: Filogram koreninjen z *Escherichia coli*, ki prikazuje filogenetske odnose med posameznimi bakterijskimi izolati iz trebuha. Evolucijska razdalja 0.1 na sliki pomeni 10 % razlik v sorodstvu.



Slika 18: Filogram koreninjen z *Escherichia coli*, ki prikazuje filogenetske odnose med posameznimi bakterijskimi izolati glave in prsnega dela. Evolucijska razdalja 0.1 na sliki pomeni 10 % razlik v sorodstvu.



Slika 19: Filogram koreninjen z *Escherichia coli*, ki prikazuje filogenetske odnose med posameznimi bakterijskimi izolati iz hemokultur. Evolucijska razdalja 0.1 na sliki pomeni 10 % razlike v sorodstvu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Spremljanje odpornosti v laboratorijih, ki določajo občutljivost anaerobov za antibiotike je zelo pomembno, saj odpornost anaerobnih bakterij proti antibiotikom v svetu narašča (Hecht, 2004). Ker se na podlagi tega spremljanja zdravniki v bolnišnicah odločajo za empirično zdravljenje, je pomembno, da so te študije redne in natančne v vseh laboratorijih, ki se srečujejo z anaerobnimi bakterijami.

V našem raziskovalnem delu smo želeli določiti, kateri anaerobi se v določenih kužinah najpogosteje pojavljajo in kakšna je njihova občutljivost za antibiotike. S tem namenom smo šest mesecev (od oktobra 2010 do marca 2011) spremļjali vse kužnine, ki so bile sprejete v Laboratorij za hemokulture in druge urgentne mikrobiološke preiskave na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo. Izolate, ki so se tekom kultivacije v anaerobni atmosferi in kontrolne kultivacije v 5 % CO₂ atmosferi izkazali za anaerobne bakterije, smo s pomočjo klasičnih metod in komercialnih identifikacijskih sistemov Vitek 2 (bioMérieux) ter API® rapid ID 32 A (bioMérieux) na podlagi metabolnih značilnosti uvrstili do vrste ali izjemoma do rodu in jim s pomočjo testov antibiotičnega gradiента oz. Etestov (bioMérieux) določili občutljivost za antibiotike. Dodatno smo z evolucijsko analizo izolatov prikazali še filogenetske odnose med izoliranimi bakterijami glede na področje izolacije.

Potrdili smo domnevo, da bomo največ anaerobnih bakterij izolirali iz abdominalnega predela. Med 158 izolati anaerobnih bakterij smo več kot pol izolatov pridobili iz kužnin omenjenega predela telesa, kar je podobno kot Wybo in sod. (2007), kjer so med izolati znanega predela odvezama kužnine več kot pol izolirali iz predela trebuha.

Ker smo predvidevali, da bomo v kužinah iz abdomna pogosteje osamili bakterije, ki jih uvrščamo v *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. in *Prevotella* spp., nas ne preseneča, da so izolati uvrščeni v *Bacteroides* spp. predstavljeni kar 35 % izolatov trebuha, *Prevotella* spp. pa 22 % izolatov trebuha, medtem ko nas preseneča nižji delež *Clostridium* spp., in sicer le 15 % izolatov trebuha (preglednica 15). Do podobnih rezultatov so prišli Müller-Premru in

sod. (2007) pri preučevanju kužnin iz trebuha bolnikov iz Kliničnega centra Ljubljana, kjer so med anaerobnimi bakterijami izolirali največ predstavnikov *Bacteroides* spp., tem so sledili *Clostridium* spp. ter manjši delež predstavnikov *Prevotella* spp. in *Peptostreptococcus* spp. Skladnost naših rezultatov s predhodnimi nakazuje, da v Sloveniji med anaerobnimi povzročitelji v največji meri prevladujejo vrste rodu *Bacteroides*. Pomembno je tudi omeniti, da smo najpogosteje izolirali seve *B. fragilis*, ki pa so prav tako najpogostejši med anaerobnimi izolati hemokultur (priloga A).

Naši rezultati kot podpora predvidevanjem nakazujejo, da med izolati hemokultur izstopa vrsta *B. fragilis*, medtem ko ostale vrste anaerobnih bakterij ne izstopajo (priloga A). Kljub temu, da *B. fragilis* predstavlja večji del vseh izolatov iz hemokultur, pa smo izolirali manjše število drugih pripadnikov debla *Bacteroidetes*, in sicer skupno le nekaj izolatov več kot pri deblu *Firmicutes* (slika 13), kjer so bili *Clostridium* spp. pogostejši kot GPAC (preglednica 15, priloga A). Iz hemokultur smo izolirali le en izolat *Fusobacterium* spp., in sicer *F. nucleatum*.

Naše raziskave podpirajo naša predvidevanja, da bomo v glavi in prsih izolirali največ GPAC, preseneča pa nas, da iz tega predela nismo izolirali niti enega predstavnika *Clostridium* spp. (preglednica 15). Drugi največji delež izolatov v tem delu predstavlja deblo *Bacteroidetes*, kjer so bili *Bacteroides* spp. zastopani v enakem številu kot *Prevotella* spp., sledili pa so jim GPNAB, kjer je poleg enega izolata *A. meyeri* prevladovala vrsta *P. acnes*. V tem predelu smo izolirali le en izolat *F. nucleatum* in en izolat *F. necrophorum*. Iz predela glave in prsi smo izolirali najmanj izolatov (slika 12), in sicer trikrat manj kot iz trebuha. Če izvzamemo bakterije v krvi, ki jih pri zdravem človeku ne najdemo, lahko naše rezultate primerjamo z deleži bakterij v normalni flori glave, prsnega dela in trebuha.

Dethlefsen in sod. (2007) so ugotovili, da deblo *Firmicutes* obsega več kot pol vseh bakterij normalne flore ust in požiralnika, kar je zelo podobno našim rezultatom povzročiteljev okužb v tem predelu. V črevesju je normalna flora sestavljena pol iz *Firmicutes* in pol iz *Bacteroidetes*. Debla *Actinobacteria* in *Fusobacteria* so redka v črevesju. V primerjavi z našimi rezultati, kjer smo v predelu trebuha izolirali več kot pol predstavnikov debla *Bacteroidetes*, se GPAC in *Clostridium* spp. bolj pogosto pojavljajo v

normalni flori kot oportunistični patogeni tega predela. Pri vseh treh skupinah kužnin (hemokulture, glava in prsi, trebuh) so anaerobne bakterije debla *Actinobacteria* prisotne v 8 % ali več (slika 13, preglednica 15). Ta rezultat lahko povežemo z dejstvom, da *Actinobacteria* obsegajo več kot polovico normalne flore kože pri človeku in se v kliničnih vzorcih največkrat pojavljajo kot kontaminanti. Predvsem *P. acnes* je v odvzetih vzorcih kužnin pogosto le posledica nepravilnega in nenatančnega odvzema le-te. Opažanja podobnosti rezultatov našega dela z študijami o normalni flori pri človeku potrjujejo dejstvo, da so okužbe z anaerobnimi bakterijami endogene (povzročene z bakterijami lastne flore).

Odpornost anaerobnih bakterij proti antibiotikom, ki se uporabljam pri zdravljenju okužb s temi bakterijami je v preteklih tridesetih letih precej narasla. Pomembno je izpostaviti, da je bilo do leta 1975 proti klindamicinu odpornih v povprečju le nekaj predstavnikov *Bacteroides* spp., ki niso bili *B. fragilis* (Sutter in Finegold, 1976), do 1987 se je odpornost proti klindamicinu pojavila tudi med *B. fragilis* (Cornick in sod., 1990), do danes pa je narasla do tretjine vseh izolatov, kar smo ugotovili tudi v naši raziskavi.

Glede na ugotovitve predhodnih raziskav smo pričakovali visoko odpornost proti penicilinu in klindamicinu pri *Prevotella* spp. in *Bacteroides* spp. Vsi izolati *Bacteroides* spp. odporni proti penicilinu, kar lahko pojasnimo z dejstvom, da smo izolirali le člane *B. fragilis* skupine, ki so skoraj v celoti naravno odporni proti penicilinu zaradi prisotnosti beta-laktamaz C in drugih nepojasnjenih mehanizmov. Veliko študij nakazuje na prisotnost beta-laktamaz pri *Prevotella* spp., kar prikazuje tudi naše delo (preglednica 17), kjer je bilo več kot pol odpornih proti penicilinu. Kljub temu, da na podlagi drugih raziskav nismo pričakovali visokega deleža proti penicilinu odpornih predstavnikov, smo izolirali skoraj petino odpornih *Clostridium* spp.. Med *Fusobacterium* spp. je bilo v našem delu nekaj odpornih izolatov, medtem ko pri GPAC in GPNAB nismo zasledili odpornosti proti penicilinu, kar je ravno nasprotno kot pri odpornosti proti klindamicinu.

Naši rezultati (preglednica 17) ne podpirajo popolnoma naših predvidevanj, da bo delež proti klindamicinu odpornih izolatov največji pri *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp. in *Clostridium* spp. Večji je bil namreč pri *Prevotella* spp. in *Clostridium* spp. in manjši pri *Bacteroides* spp., kar je v nasprotju s predhodnimi raziskavami (Glupczynski in sod., 2008;

Snydman in sod., 2010), kjer so ugotovili 30–56 % delež proti klindamicinu odpornih izolatov rodu *Bacteroides*. Druge Evropske študije prikazujejo 18–31 % delež odpornih izolatov *Prevotella* spp. (Papaparaskevas in sod., 2008; Wybo in sod., 2007; Glupczynski in sod., 2008) in 23–26 % delež odpornih izolatov *Clostridium* spp. (Wybo in sod., 2007; Glupczynski in sod., 2008), kar prikazuje tudi naša. Pri *Fusobacterium* spp. nismo zasledili odpornosti proti klindamicinu, medtem ko smo pri GPAC ter GPNAB izolirali nekaj odpornih predstavnikov, kar odstopa od predhodnih raziskav (Glupczynski in sod., 2008), kjer so izolirali tudi proti klindamicinu odporne izolate *Fusobacterium* spp., pri GPAC in GPNAB pa je bil delež proti klindamicinu odpornih izolatov večji od našega. Med GPAC je bila *F. magna* tista, ki je doprinesla k deležu proti klindamicinu odpornih izolatov, kar je podobno kot so ugotovili Brazier in sod. (2008).

Poleg tega smo izolirali tudi nekaj predstavnikov *Bacteroides* spp. in *Prevotella* spp., ki so bili odporni proti amoksicilin/klavulanski kislini. Podobno kot v naši raziskavi opisujejo odpornost proti amoksicilin/klavulanski kislini tudi v drugih raziskavah. Naše raziskave predlagajo, da delež proti amoksicilin/klavulanski kislini odpornih izolatov *Prevotella* spp. narašča hitreje kot pri *Bacteroides* spp. (preglednica 17), kar je nasprotno kot pri drugih raziskavah (Glupczynski in sod., 2008, Wybo in sod., 2007). Zanimivo pa je, da so vsi izolati, ki so bili odporni proti amoksicilin/klavulanski kislini, bili odporni tudi proti klindamicinu ali penicilinu. Po en predstavnik *P. buccae*, *B. fragilis* in *P. distasonis* so pridobili rezistenco kar proti vsem trem antibiotikom: penicilinu, klindamicinu in amoksicilin/klavulanski kislini. Kljub tem trem izolatom pa menimo, da naši rezultati nakazujejo na nizko prisotnost odpornosti proti antibiotikom med anaerobnimi bakterijami na tem področju Slovenije.

Medtem, ko so v nekaterih študijah ugotovili tudi odpornost proti metronidazolu in imipenemu, naši podatki nakazujejo na odsotnost te rezistence pri izolatih, izoliranih iz kužnin zajetih v našem delu. Ta opažanja so v neskladju z drugimi avtorji, ki so našli proti metronidazolu odporne seve (Mory in sod., 1998; Wybo in sod., 2007; Papaparaskevas in sod., 2008; Seifert in Dalhoff, 2010).

Pričakovali smo višji odstotek rezistence proti klindamicinu in penicilinu, kot proti imipenemu, metronidazolu in amoksicilin/klavulanski kislini, kar naši podatki tudi

potrjujejo (preglednica 17). Naši podatki sicer nakazujejo na visok odtotek proti metronidazolu odpornih izolatov znotraj debla *Actinobacteria*, vendar tega ne moremo upoštevati kot odpornost, saj so npr. *Propionibacterium acnes* in nekatere vrste *Actinomyces* naravno odporne proti temu antibiotiku.

V našem delu smo prikazali tudi filogenetske odnose med izoliranimi bakterijami glede na področje izolacije, kjer je dobro razvidna sorodnost posameznih vrst in rodov izolatov (slika 21, 22, 23). Najpogostejša izolata *Bacteroides* in *Prevotella* sta tudi filogenetsko najbližje. Glede na to, da sta glede na deleže med bolj odpornimi predstavniki anaerobnih bakterij v našem raziskovalnem delu, lahko predvidevamo, da je prenos genov za odpornost povezan s sorodnostjo znotraj debla *Bacteroidetes*. Drugi najpogostejši izolati so GPAC in rod *Clostridium*, ki so si prav tako filogenetsko najbližje. Rod *Fusobacterium* je bolj soroden GPAC in *Clostridium*, medtem ko so po Gramu pozitivni, nesporulirajoči anaerobni bacili filogenetsko bližje rodovoma *Bacteroides* in *Prevotella*. S primerjavo filogenetskih dreves kužnin iz trebuha, glave s prsnim delom in hemokultur, smo prav tako lahko opazili, da je raznolikost vrst bakterij, ki se pojavljajo kot povzročitelji anaerobnih okužb največja v predelu trebuha in najmanjsa v predelu glave in prsi.

Predvidevali smo da bomo iz abdomna izolirali več anaerobnih bakterij kot iz ostalih predelov, da bomo v kužninah iz abdomna pogosteje osamili bakterije *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp. in *Prevotella* spp., v kužninah iz prsne votline, vratu in glave GPAC in iz hemokultur *B. fragilis*. Naši rezultati potrjujejo ta predvidevanja z več kot pol izolati iz abdomna. Prav tako smo izolirali največ *Bacteroides* spp. in *Prevotella* spp. v abdomnu in malo nižji odtotek *Clostridium* spp, vendar še vedno dovolj visok, da naša predvidevanja o najpogostejših izolatih iz abdomna držijo. V kužninah iz glave in prsi so prevladovali GPAC in *B. fragilis* v hemokulturah. Napovedali smo tudi, da bodo *Bacteroides* in *Prevotella* pogosteje odporni proti penicilinu in proti klindamicinu kot druge anaerobne bakterije, kar smo delno potrdili. Opazili smo pogostejši pojav odpornosti proti klindamicinu od pričakovanega tudi pri vrstah *Clostridium*, kar smo potrdili, poleg tega pa smo proti pričakovanjem ugotovili kar visok delež proti penicilinu odpornih izolatov.

Odpornost proti klindamicinu in penicilinu je bila v naši raziskavi pogostejša od odpornosti proti amoksicilin/klavulanski kislini, imipenemu in metronidazolu, kar smo predvidevali.

Kljudno vedno večjemu opisu genov za mehanizme odpornosti proti metronidazolu v tujih raziskavah (Mory in sod., 1998; Seifert in Dalhoff, 2010), pa nismo izolirali proti metronidazolu odpornega *B. fragilis*.

Kljudno temu, da je že mnogo znanega o genih za odpornost proti antibiotikom, ki se uporablajo za zdravljenje okužb z anaerobi, pa vedno večje število bakterijskih sevov odpornih na antibiotike nakazuje na očitno preveč pomanjkljivo poznavanje le-teh. Z večjim razumevanjem mehanizmov, ki so odgovorni za prenos rezistence med bakterijami in samega delovanja rezistence bi lažje razvili ali prepoznali inhibitorje teh mehanizmov, kot so v preteklosti že naredili z inhibitorji beta-laktamaz, ki pa niso več popolnoma učinkoviti.

V naši raziskavi smo prikazali občutljivost anaerobnih bakterij iz kužnin v obdobju šestih mesecev, kjer smo skoraj med vsemi rodovi uspeli pridobiti vsaj 10 izolatov, medtem ko smo izolirali kar 51 predstavnikov *Bacteroides* spp., ki se pogosteje pojavljajo v kužninah. Naši rezultati prikazujejo odpornost anaerobnih bakterij proti antibiotikom, in ne odstopajo bistveno od drugih podobnih raziskav. Kljudno temu pa bi v daljšem časovnem obdobju in z večjim številom izolatov, lahko še bolje prikazali stanje občutljivosti anaerobnih bakterij v Sloveniji, kot so to storili Müller-Premru in sod. (2007). Taka raziskovalna dela so zelo pomembna, saj naj bi občutljivost spremljali v vseh kliničnih laboratorijih v vseh državah. Le na podlagi zanesljivih podatkov o občutljivosti iz rezultatov laboratorija s svojega področja se lahko zdravniki v bolnišnicah, kjer je stanje bolnikov ponavadi kritično, lažje odločijo za empirično zdravljenje bolnika z anaerobno okužbo.

5.2 SKLEPI

- V našem delu smo uspešno izolirali anaerobne bakterije iz kužnin, jih identificirali vsaj do rodu ali do vrste ter jim določili občutljivost za antibiotike.
- Iz abdomna smo izolirali več anaerobnih bakterij kot iz ostalih predelov.
- V kužninah iz abdomna so prevladovali *Bacteroides* spp. in *Prevotella* spp., pogosti pa so bili tudi *Clostridium* spp. in GPNAB.
- V kužninah iz prsne votline, vratu in glave so prevladovali GPAC, drugi najpogosteje pa so bili GPNAB.

- Med izolati hemokultur je prevladoval *B. fragilis*.
- Vrste rodov *Bacteroides*, *Prevotella* in *Clostridium* so bile pogosteje odporne proti penicilinu in proti klindamicinu kot druge anaerobne bakterije.
- Odpornost proti klindamicinu in penicilinu je bila v naši raziskavi pogostejša od odpornosti proti amoksicilin/klavulanski, medtem ko noben izolat ni bil odporen proti imipenemu in metronidazolu.
- S pomočjo filogenetskega drevesa smo prikazali, da je v kužninah trebuha raznolikost vrst anaerobnih bakterij, ki se pojavljajo večja kot v kužninah glave in prsnega dela.

6 POVZETEK

Večina kliničnih laboratoriјev po svetu spremi občutljivost tako aerobnih kot anaerobnih bakterij. Na podlagi teh raziskav se zdravniki v bolnišnicah odločajo za empirično zdravljenje. Do prejšnjega desetletja so bili vzorci odpornosti pri anaerobnih bakterijah dokaj predvidljivi in stabilni, vendar je velika poraba antibiotikov povzročila pogostejoče pojavljanje odpornosti proti tem učinkovinam. V raziskavah ugotavljajo visok delež proti klindamicinu in penicilinu odpornih izolatov, še posebej med vrstami rodov *Bacteroides* in *Prevotella*, v zadnjih letih pa poročajo tudi o proti amoksicilin/klavulanski kislini, imipenemu in metronidazolu odpornih izolatih, največkrat pri vrstah *B. fragilis* skupine.

Za zdravljenje okužb z anaerobnimi bakterijami se uporabljam antibiotiki penicilin, imipenem, amoksicilin/klavulanska kislina, klindamicin in metronidazol, mehanizmi odpornosti bakterij proti omenjenim antibiotikom pa v današnjem času predstavljam pereč problem. Tako so pri anaerobi pogoste beta-laktamaze C, ki inhibirajo delovanje penicilinov, pojavljajo pa se tudi metalo beta-laktamaze B, ki inhibirajo delovanje karbapenemov (primer je imipenem). Odpornost bakterij proti klavulanski kislini je posledica hiperprodukce encimov beta-laktamaz, ali pa spremenjenega aktivnega mesta tega encima. Mehanizem odpornosti proti klindamicinu je posredno povezan z makrolid-linkozamid-streptogramin tipom 23S RNA metilazo, ki z metilacijo ribosomov prepreči vezavo klindamicina na te nukleoproteine. Drugačen mehanizem odpornosti pa je proti metronidazolu, kjer zaradi delovanja encima nitroimidazolne reduktaze ne pride do nastanka toksičnih skupin potrebnih za delovanje metronidazola.

Cilj diplomske naloge je bil določiti, kateri anaerobi se v določenih kužninah najpogosteje pojavljajo in kakšna je njihova občutljivost za antibiotike. Zato smo po predpisih splošnih operativnih postopkov (SOP) Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani identificirali izolate anaerobnih bakterij in jim določili občutljivost. Primarno kužnino smo nacepili na Schaedler agar in druga gojišča, inkubirali v anaerobni atmosferi in izolirali posamezne kolonije do čiste kulture. Te smo barvali po Gramu, nacepili na kanamicin vankomicin agar z lakirano krvjo, naredili katalazni test in test indola za lažjo odločitev o uporabi identifikacijskega sistema. S pomočjo identifikacijskih sistemov na podlagi metabolnih značilnosti, VITEK 2 in API® rapid ID 32 A smo izolat

dokončno identificirali vsaj do rodu ali do vrste. V kužinah iz abdomna so prevladovali *Bacteroides* spp. in *Prevotella* spp., v kužinah iz prsne votline, vratu in glave so prevladovali po Gramu pozitivni anaerobni koki, v hemokulturah pa vrsta *B. fragilis*.

Za določanje občutljivosti izoliranih in identificiranih bakterij smo uporabili test antibiotičnega gradienta. Izolatom smo določali MIK za penicilin, klindamicin, metronidazol, imipenem in amoksicilin/klavulansko kislino. Vrste rodov *Bacteroides*, *Prevotella* in *Clostridium* so bili pogosteje odporni proti penicilinu in proti klindamicinu kot druge anaerobne bakterije. Vrste rodu *Bacteroides* so bile v celoti odporne proti penicilinu, 18 % je bilo odpornih proti klindamicinu in 6 % proti amoksicilin/klavulanski kislini. Med predstavniki rodu *Prevotella* je bilo 56 % izolatov odpornih proti penicilinu, 26 % proti klindamicinu in 11 % proti amoksicilin klavulanski/kislini. Rod *Clostridium* se je izkazal za enako odpornega proti klindamicinu kot *Prevotella*, proti penicilinu je bilo odpornih 17 % teh izolatov, medtem ko noben izolat tega rodu ni bil odporen proti amoksicilin/klavulanski kislini. Med vrstami *Fusobacterium* je bilo nekaj izolatov odpornih proti penicilinu, odpornosti proti drugim antibiotikom pa nismo zasledili. Po po Gramu pozitivni anaerobni koki in po Gramu pozitivni nesporulirajoči anaerobni bacili so bili odporni le proti klindamicinu. Odpornosti proti metronidazolu (z izjemo izolatov vrst debla *Actinobacteria*) in imipenemu nismo zasledili.

Podobne raziskave kot je naša izvajajo v večini kliničnih laboratorijev v tujini, saj z njimi pridobijo zanesljive podatke za svoje področje. Mi smo pridobili novejše informacije o občutljivosti za antibiotike pri anaerobnih bakterijah izoliranih iz kužnin pri nas, kar lahko v neki meri pripomore k empiričnemu zdravljenju pri nas.

7 VIRI

- Aas J. A., Paster B. J., Stokes L. N., Olsen I., Dewhirst F. E. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 5721-5732
- Aldridge K. E., Ashcraft D., Cambre K., Pierson C. L., Jenkins S. G., Rosenblatt J. E. 2001. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1238-1243
- Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P. B., Steitz T. A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*, 289: 905-920
- Bandoh K., Watanabe K., Muto Y., Tanaka Y., Kato N., Ueno K. 1992. Conjugal transfer of imipenem resistance in *Bacteroides fragilis*. *Journal of Antibiotics*, 45: 542-547
- Baum B. R. 1989. PHYLIP: Phylogeny interference package Version 3.2. *Quarterly Review of Biology*, 64: 539-541
- Behra-Miellet J., Dubreuil L., Jumas-Bilak E. 2003. Antianaerobic activity of moxifloxacin compared with that of ofloxacin, ciprofloxacin, clindamycin, metronidazole and betalactams. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 20: 366-374
- Bik E. M., Eckburg P. B., Gill S. R., Nelson K. E., Purdom E. A., Francois F., Perez-Perez G., Blaser M. J., Relman D.A. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 732-737
- Brazier J., Chmelar D., Dubreuil. L., Feierl G., Hedberg. M., Kalenic S., Könönen E., Lundgren B., Malamou-Ladas H., Nagy E., Sullivan Å., Nord. C. E. 2008. European surveillance study on antimicrobial susceptibility of Gram-positive anaerobic cocci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31: 316-320

- Brian L. E., Kowand S. K., Van den Elzen H. M. 1979. Mechanism of aminoglycoside antibiotic resistance in anaerobic bacteria. *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15: 7-13
- Brook I. 2008. The role of anaerobic bacteria in chronic suppurative otitis media in children: implications for medical therapy. *Anaerobe*, 14: 297-300
- Brook I. 2009. Antibiotic resistance of anaerobic bacteria. V: *Antimicrobial drug resistance*. Vol. 2. Mayers D. L. (ed.). New York, Humana Press: 873-899
- Buchanan B. B., Pine L. 1967. Path of glucosebreakdown and cell yields of a facultative anaerobe, *Actinomyces naeslundii*. *Journal of General Microbiology*, 46: 225-236
- Byarugaba D. K. 2010. Mechanisms of antimicrobial resistance V: *Antimicrobial resistance in developing countries*. Sosa A. J., Byarugaba D. K., Amábile-Cuevas C. F., Hsueh P. R., Kariuki S., Okeke I. N. (eds.). New York, Springer: 15-26
- Carlier J. P., Sellier N., Ranger M. N., Reysset G. 1997. Metabolism of a 5-nitroimidazole in susceptible and resistant isogenic strains of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 7: 1495-1499
- Carlier J. P., Bedora-Faure M., K'ouas G., Alauzet C., Mory F. 2010. Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* Winter et al. 1991 and *Eubacterium plautii* (Séguin 1928) Hofstad and Aasjord 1982, with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov., comb. nov., and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 60, 3: 585-590
- Carter A. P., Clemons W. M., Broderson D. E., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T., Ramakrishnan V. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, 407: 340-348
- CLSI. 2007. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: Approved standard. 7th ed. CLSI document M11-A7. Wayne, CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute: 49 str.

- Cornick N. A., Cuchural G. J. Jr., Snydman D. R., Jacobus N. V., Ianini P., Hill G., Cleary T., O'Keefe J. P., Pierson C., Finegold C. M. 1990. The antimicrobial susceptibility patterns of the *Bacteroides fragilis* group in the United States, 1987. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25: 1011-1019
- Dethlefsen L., McFall-Ngai M., Relman D. A. 2007. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. *Nature*, 449: 811-818
- De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. 2009. Genus V. *Parvimonas* Tindall and Euzéby 2006, 2712VP. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 3. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 1135-1136
- Eady E. A., Ingham E. 1994. *Propionibacterium acnes*- friend or foe? *Reviews in Medical Microbiology*, 5: 163-173
- Eckburg P. B., Bik E. M., Bernstein C. N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S. R., Nelson K. E., Relman D. A. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308: 1635-1638
- Ezaki T. 2009a. Genus *Peptostreptococcus*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed Vol. 3. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 1008-1009
- Ezaki T. 2009b. Genus *Finegoldia*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 3. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 1131-1132
- Ezaki T. 2009c. Genus *Peptococcus*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 3. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 971-971

- Ezaki T., Kawamura Y. 2009. Genus *Peptoniphilus*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 3. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 1136-1137
- Ezaki T., Ohkusu K. 2009. Genus *Anaerococcus*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 3. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 1130-1131
- Falagas M. E., Siakavellas E. 1999. *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. International Journal of Antimicrobial Agents, 15: 1-9
- Finegold S. M., Baron E. J., Wexler H. M. 1992. A clinical guide to anaerobic infections. Belmont, STAR Publishing Company: 159 str.
- Finegold S. M., Jousimies-Somer H. 1997. Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. Clinical Infectious Diseases, 25, Suppl. 2: S78-S87
- Franklin T. J., Snow G. A. 2005. Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action. 6th ed. New York, Springer: 182 str.
- Gavini F., Pourche A. M., Neut C., Monget D., Ramond C., Oger H., Izard D. 1991. Phenotypic Differentiation of *Bifidobacteria* of human and animal origins. International Journal of Systematic Bacteriology, 41, 4: 548-557
- Gharbia S. E., Shah H. N., Edwards K. J. 2010. Genus *Fusobacterium*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 4. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 748-758

Glupczynski Y., Berhin C., Nizet H. 2008. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Belgium as determined by E-test methodology. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 28, 3: 261-267

Goldstein E. J. C., Citron D. M., Merriam C. V., Warren Y., Tyrrell K. L. 2000. Comparative *in vitro* activities of ertapenem (MK-0826) against 1,001 anaerobes isolated from human intraabdominal infections. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44: 2389-2394

Goldstein E. J. C., Citron D. M., Merriam C. V., Warren Y., Tyrrell K., Fernandez H. T. 2003. *In vitro* activities of dalbavancin and nine comparator agents against anaerobic grampositive species and corynebacteria. Antimicrobial Aagents and Chemotherapy, 47: 1968-1971

Goldstein E. J. C., Citron D. M., Hecht D. W. 2008. Antimicrobial resistance of anaerobic bacteria. V: Antimicrobial resistance and implications for the twenty-first century. Fong I. W., Drlica K. (eds.). New York, Springer: 207-230

Graves M. H., Morello J. A., Kocka F. E. 1974. Sodium polyanethol sulfonate sensitivity of anaerobic cocci. Applied Microbiology, 32: 1131-1133

Guillemot D. 1999. Antibiotic use in humans and bacterial resistance. Current Opinion in Microbiology, 2: 494-498

Harms J. M., Bartels H., Schlünzen F., Yonath A. 2003. Antibiotics acting on the translational machinery. Journal of Cell Science, 116: 1391-1393

Hecht D. W., Osmolski J. R. 2003. Activities of garenoxacin (BMS-284756) and other agents against anaerobic clinical isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47: 910-916

Hecht D. W. 2004. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. Clinical Infectous Diseases, 39: 92-97

Hedberg M., Nord C.E. 2003. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe. Clinical Microbiology and Infection, 9: 475-488

Holdeman M. L. V., Johnson J.L., Moore W.E.C. 1986. Genus *Peptostreptococcus*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G. (eds.). Baltimore, The Williams & Wilkins Co.: 1083-1092

NCBI. 2005. Imipenem - compound summary (CID 104838). Bethesda, NCBI - National Center for Biotechnology Information. 1 str.
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=104838&loc=ec_rcs
(19. dec. 2012)

Jacinto R. C., Montagner F., Signoretti F. G. C., Almeida G. C., Gomes B. P. F. A. 2008. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infections. Journal of Endodontics, 34, 12: 1451-1456

Jousimies-Somer H. R., Finegold S. M. 1984. Problems encountered in anaerobic bacteriology. Review of Infectious Diseases, 6, Suppl. 1: S45-S50

Kageyama A., Benno Y., Nakase T. 1999. Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium lenthum* to the genus *Eggerthella* as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, 49: 1725-1732

Kahan J. S., Kahan F. M., Goegelman R., Currie S. A., Jackson M., Stapley E. O., Miller T. W., Miller A. K., Hendlin D., Mochales S., Hernandez S., Woodruff H. B., Birnbaum J. 1979. Thienamycin, a new β -lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. Journal of Antibiotics, 32: 1-12

Koeth L. M., Good C. E., Appelbaum P. C., Goldstein E. J. C, Rodloff A. C., Claros M., Dubreuil L. J. 2004. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobial agents. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53: 1039-1044

Kotnik. V. 2002. Antibiotiki in kemoterapevtiki. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 427-438

Kuwabara S., Abraham E. P. 1967. Some properties of two extracellular β -lactamases from *Bacillus cereus*. Biochemical Journal, 103: 27C-30C

Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin. F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23: 2947-2948

Lau S. K. P., Woo P. C. Y., Woo G. K. S, Fung A. M. Y., Wong M. K. M., Chan K., Tam D. M. W., Yuen K. 2004a. *Eggerthella hongkongensis* sp. nov. and *Eggerthella sinensis* sp. nov., two novel *Eggerthella* species, account for half of the cases of *Eggerthella* bacteremia. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 49: 255-263

Lau S. K. P., Woo P. C. Y., Fung A. M. Y., Chan K., Woo G. K. S, Yuen K. 2004b. Anaerobic, non-sporulating, Gram-positive bacilli bacteraemia characterized by 16S rRNA gene sequencing. Journal of Medical Microbiology, 53: 1247-1253

Ley R. E., Peterson D. A., Gordon J. I. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell, 124: 837-848

Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. San Francisco, Pearson education: 374-393

Marik P. E. 2001. Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. New England Journal of Medicine, 344: 665-671

McManus M. C. 1997. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. American Journal of Health-System Pharmacy, 54: 1420-1433

Mory F., Lozniewski A., Bland S., Sedallian A., Grollier G., Girard-Pipau F., Paris M. F., Dubreuil L. 1998. Survey of anaerobic susceptibility patterns: A French multicentre study. International Journal of Antimicrobial Agents, 10: 229-236

Mosca A., Summanen P., Finegold S. M., De Michele G., Miragliotta G. 1997. Cellular fatty acid composition, soluble-protein profile, and antimicrobial resistance pattern of *Eubacterium lentum*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 3: 752-755

Murray R. P., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. 2009. Medical microbiology. 6th ed. Philadelphia, Elsevier Mosby: 377-404

Murdoch D. A. 1998. Gram-positive anaerobic cocci. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 81-120

Müller-Premru M., Hergouth K. V., Jeverica S. 2007. Občutljivost gramnegativnih in anaerobnih bakterij pri okužbah v trebuhu. V: Infektološki simpozij, marec 2007, Ljubljana. Beović B., Strle F., Čižman M. (ur.). Ljubljana, Povše: 81-87

Nagy E. 2010. Anaerobic infections: Update on treatment considerations. *Drugs*, 70, 7: 841-858

Nguyen M. H., Yu V. L., Morris A. J., McDermott L., Wagener M. W., Harrell L., Snydman D. R. 2000. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteraemia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clinical Infectious Diseases*, 30, 6: 870-876

Olsen G. J., Overbeek R., Larsen N., Marsh T. L., McCaughey M. J., Maciukenas M. A., Kuan W. M., Macke T. J., Xing Y., Woese C. R. 1992. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research*, 20: 2199-2200

Oprica C. 2006. Characterisation of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* from *Acne vulgaris* and other diseases. Stockholm, Karolinska University Press: 1-4

Page R. D. M. 1996. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358

Papaparaskevas J., Pantazatou A., Katsandri A., Houhoula D. P., Legakis N. J., Tsakris A., Avlamis A. 2008. Moxifloxacin resistance is prevalent among *Bacteroides* and *Prevotella* species in Greece. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 137-141

Pei Z., Bini E. J., Yang L., Zhou M., Francois F., Blaser M. J. 2004. Bacterial biota in the human distal esophagus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 12: 4250-4255

Pelak B. A., Citron D. M., Motyl M., Goldstein E. J. C., Woods G. L., Teppler H. 2002. Comparative *in vitro* activities of ertapenem against bacterial pathogens from patients with acute pelvic infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50: 735-741

Polglajen I., Breuil J., Collatz E. 1994. Insertion of a novel DNA sequence, 1S1186, upstream of the silent carbapenemase gene *cfa*, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. Molecular Microbiology, 12: 105-114

Queenan A. M., Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile β-lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 20, 3: 440-458

Rainey F. A., Hollen B. J., Small A. 2009. Genus *Clostridium* V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 3. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 738-828

Roberts M. C., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen L. B., Rood J., Seppala H. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43: 2823-2830

Sakamoto M., Benno Y. 2006. Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 1599-1605

Schapiro J. M., Gupta R., Stefansson E., Fang F. C., Limaye A. P. 2004. Isolation of metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* carrying the *nma* nitroreductase gene from a patient in Washington state. Journal of Clinical Microbiology, 42, 9: 4127-4129

- Schaumann R., Ackermann G., Pless B., Claros M. C., Goldstein E. J. C., Rodlof A. C. 2000. *In vitro* activities of fourteen antimicrobial agents against obligately anaerobic bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents, 16: 225-232
- Schlunzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A., Franceschi F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in *Eubacteria*. Nature, 413: 814-821
- Seifert H., Dalhoff A. 2010. German multicentre survey of the antibiotic susceptibility of *Bacteroides fragilis* group and *Prevotella* species isolated from intra-abdominal infections. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65: 2405-2410
- Seme K. 2002. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 439-446
- Shah H. N., Chattaway M. A., Rajakurana L., Gharbia S. E. 2010. Genus *Prevotella*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 4. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 86-102
- Slack J. M. 1974. Family *Actinomycetaceae* V: Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Buchanan R. E., Gibbons N. E. (eds.). Baltimore, The Williams & Wilkins Co.: 659-667
- Snydman D. R., Jacobus N. V., McDermott L. A., Supran S., Cucheral G. J. Jr, Finegold S. M., Harrell L. J., Hecht D. W., Iannini P., Jenkins S. G., Pierson C., Rihs J., Gorbach S. L. 1999. Multicenter study of *in vitro* susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group, 1995 to 1996, with comparison of resistance trends from 1990 to 1996. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43: 2417-2422
- Snydman D. R., Jacobus N. V., McDermott L. A., Golan Y., Hecht D. W., Goldstein E. J. C., Harrell L., Jenkins S., Newton D., Carl Pierson C., Rihs J. D., Yu V. L., Richard Venezia R., Finegold S. M., Rosenblatt J. E., Gorbach S. L. 2010. Lessons learned from

the anaerobe survey: Historical perspective and review of the most recent data (2005–2007). *Clinical Infectious Diseases*, 50, Suppl. 1: S26-S33

Song Y., Liu C., M. Finegold S. M. 2007. Development of a flow chart for identification of Gram-positive anaerobic cocci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2: 512-516

Song Y., Liu C., M. Finegold S. M. 2010. Genus *Bacteroides*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed Vol. 4. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 27-41

Steingrube V. A., Wallace R. J. Jr., Brown B. A., Pang Y., Zeluff B., Steele L. C., Zhang Y. 1991. Acquired resistance of *Nocardia brasiliensis* to clavulanic acid related to a change in beta-lactamase following therapy with amoxicillin-clavulanic acid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 3: 524-528

Summanen P., Finegold S. M. 2010. Genus *Porphyromonas*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. Vol. 4. Krieg N. R., Staley J. T., Brown D. R., Hedlund B. P., Paster B. J., Ward N. L., Ludwig W., Whitman W. B. (eds.). New York, Springer: 62-70

Sutter V. L., Finegold S. M. 1976. Susceptibility of anaerobic bacteria to 23 antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10, 4: 736-752

Teng L. J., Hsueh P. R., Tsai J. C., Liaw S. J., Ho S. W., Luh K. T. 2002. High incidence of cefoxitin and clindamycin resistance among anaerobes in Taiwan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2908-2913

Tenover F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*, 119, Suppl. 1: S3–S10

Toney J. H., Fitzgerald P. M., Grover-Sharma N., Olson S. H., May W. J., Sundelof J. G., Vandervall D. E., Cleary K. A., Grant S. K., Wu J. K., Kozarich J. W., Pompliano D. L., Hammond G. G. 1998. Antibiotic sensitization using biphenyl tetrazoles as potent

inhibitors of *Bacteroides fragilis* metallo-beta-lactamase. Chemistry and Biology, 5: 185-196

Vanhoutte T., Huys G., De Brandt E., Swings J. 2004. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers. FEMS Microbiology Ecology, 48: 437-446

Vester B., Douthwaite S. 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45: 1-12

Walsh C. 2003. Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington, D. C., ASM Press: 3-10

Wang Z., Fast W., Valentine A. M., Benkovic S. J. 1999. Metallo-beta-lactamase: Structure and mechanism. Current Opinion in Chemical Biology, 3: 614-622

Watanabe M., Iyobe S., Inoue M., Mitsuhashi S. 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 35: 147-151

Wright G. D. 2003. Mechanisms of resistance to antibiotics. Current Opinion in Chemical Biology, 7: 563-569

Wybo I., Piérard D., Verschraegen I., Reynders M., Vandoorslaer K., Claeys G., Delmée M., Glupczynski Y., Gordts B., Ieven M., Melin P., Struelens M., Verhaegen J., Lauwers S. 2007. Third Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 59: 132-139

Zoetendal E. G., Vaughan E. E., Vos W. M. 2006. A microbial world within us. Molecular Microbiology, 59, 6: 1639-1650

ZAHVALA

PRILOGE

Priloga A: Število vseh izolatov anaerobnih bakterij razporejenih po vrstah in izvoru kužnine.

Kužnina	Izolati in število
Predel trebuha	<i>B. fragilis</i> (14), <i>B. ovatus</i> (6), <i>P. capillosus</i> (4), <i>B. thetaiotaomicron</i> (3), <i>B. vulgatus</i> (2), <i>B. caccae</i> (1), <i>Parabacteroides distasonis</i> (2), <i>Bacteroides</i> spp. (1), <i>Prevotella bivia</i> (4), <i>P. intermedia</i> (3), <i>P. buccae</i> (2), <i>P. disiens</i> (2), <i>P. oralis</i> (2), <i>P. melaninogenica</i> (1), <i>P. denticola</i> (1), <i>Prevotella</i> spp. (4), <i>Porphyromonas gingivalis</i> (2), <i>C. perfringens</i> (3), <i>C. bifermentas</i> (3), <i>C. butyricum</i> (2), <i>. tertium</i> (1), <i>C. septicum</i> (1), <i>C. sporogenes</i> (1), <i>C. paraputreficum</i> (1), <i>Clostridium</i> spp. (2), <i>F. nucleatum</i> (6), <i>Bifidobacterium</i> spp. (2), <i>Eggerthella lenta</i> (3), <i>Actinomyces naeslundii</i> (1), <i>Actinomyces meyeri</i> (1), <i>P. acnes</i> (5) <i>Propionibacterium</i> spp. (1), <i>Peptostreptococcus</i> spp. (5), <i>P. anaerobius</i> (1), <i>P. micra</i> (1), <i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> (1).
Glava in prsni del	<i>F. magna</i> (3), <i>Peptostreptococcus</i> spp. (3), <i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> (2), <i>Parvimonas micra</i> (2), <i>Anaerococcus prevotii</i> (1), <i>B. fragilis</i> (2), <i>B. vulgatus</i> (1), <i>P. capillosus</i> (1), <i>Prevotella loescheii</i> (1), <i>P. buccae</i> (1), <i>P. disiens</i> (1), <i>Prevotella</i> spp. (1), <i>F. nucleatum</i> (1), <i>F. necrophorum</i> (1), <i>Actinomyces meyeri</i> (1), <i>P. acnes</i> (5).
Hemokulture	<i>B. fragilis</i> (9), <i>B. thetaiotaomicron</i> (2), <i>B. ovatus</i> (1), <i>B. vulgatus</i> (1), <i>P. capillosus</i> (1), <i>P. buccae</i> (1), <i>P. buccalis</i> (1), <i>C. perfringens</i> (2), <i>C. ramosum</i> (2), <i>C. clostridioforme</i> (2), <i>C. paraputreficum</i> (1), <i>Clostridium</i> spp. (2), <i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> (2), <i>F. magna</i> (1), <i>P. micra</i> (1), <i>Peptococcus</i> spp. (1), <i>Eggerthella lenta</i> (1), <i>Actinomyces viscosus</i> (1), <i>Actinomyces meyeri</i> (1), <i>P. acnes</i> (2), <i>F. nucleatum</i> (1).
