

Marta Kierzkowska^{1,2}, Anna Majewska^{1,2*}, Anna Sawicka-Grzelak^{1,2},
Grażyna Młynarczyk^{1,2}

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus

Wpłynęło w maju 2015 r.

Zaakceptowano w sierpniu 2015 r.

1. Wstęp. 2. Diagnostyka laboratoryjna beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych. 3. Znaczenie kliniczne beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych. 4. Podsumowanie

Gram-negative anaerobic rods – diagnostics and clinical significance

Abstract: Among the broad spectrum of anaerobic bacteria constituting the normal flora of humans, some exhibit pathogenic potential and are responsible for serious infections. Gram-negative anaerobic rods belonging to the genera *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium* and *Porphyromonas* represent the most common cause of endogenous, usually mixed, infections. Anaerobes are important pathogens causing infections after abdominal or gynecologic surgery, oral-cavity infections and other infections originating from the mouth or abdomen. The virulence of different species depends on the combination of bacterial properties, including surface structures, metabolic functions, the ability to avoid the host's defenses and the capacity to damage tissues. Special laboratory procedures are needed for the isolation and identification of this diverse group of bacteria. The identification to the species level, if based on phenotypic features, is often time-consuming and not always easy to carry out. Some molecular methods may help in the everyday clinical microbiological practice in laboratories dealing with the diagnostics of anaerobic infections. The taxonomy of the anaerobic bacteria is in a state of continuous change, due to the constant addition of new species and the reclassification of the old ones.

1. Introduction. 2. Laboratory diagnostics of Gram-negative anaerobic rods. 3. Clinical significance of Gram-negative anaerobic rods. 4. Summary

Słowa kluczowe: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*

Key words: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*

1. Wstęp

Beztlenowe pałeczki Gram-ujemne (Anaerobic Gram-Negative Bacilli – AGNB) wchodzą w skład fizjologicznej mikroflory człowieka. Kolonizują jamę ustną, górne drogi oddechowe, przewód pokarmowy i drogi moczowo-płciowe. Drobnoustroje te są patogenami oportunistycznymi, odpowiadają za zakażenia endogenne. W przypadku osłabienia wydolności immunologicznej, niedotlenienia tkanek, kwasicy, przerwania ciągłości skóry i/lub błon śluzowych lub innych zdarzeń, dochodzi do namnażania się bakterii i infekcji. Zakażenia mogą dotyczyć różnych tkanek i narządów. Beztlenowe pałeczki Gram-ujemne, często wraz z mikroflorą tlenową izolowane są z wielu materiałów klinicznych. Beztlenowce w zakażeniach działają synergistycznie ze sobą oraz bakteriami tlenowymi. Takie wielogatunkowe zakażenia nasilają proces zapalny, są wyzwaniem diagnostycznym i problemem terapeutycznym. Do najistotniejszych klinicznie beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych należą: *Bacteroides*

spp., *Parabacteroides* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp. oraz *Fusobacterium* spp.

Metody hodowli i identyfikacji bakterii beztlenowych prowadzone są często w laboratoriach mikrobiologicznych w ograniczonym zakresie. Stopień zaawansowania diagnostyki zakażeń bakteriami beztlenowymi zależy od stopnia referencyjności laboratorium. Identyfikacja najczęściej może być dokonana za pomocą komercyjnych zestawów, opartych na analizie cech biochemicznych bakterii. Obecnie coraz częściej stosowane metody biologii molekularnej, takie jak PCR, multiplex PCR pozwalają na skrócenie czasu badania. Metody te cechują się dużą czułością i powtarzalnością. W ostatnim czasie wprowadzono do laboratoriów metodę spektrometrii masowej, która umożliwia identyfikację bakterii na podstawie analizy białek rybosomalnych. Jednak „złotym standardem” w identyfikowaniu do poziomu gatunku jest sekwencjonowanie bakteryjnego genu 16S rRNA. Niestety, wysoki koszt badania uniemożliwia zastosowanie tej metody w rutynowej diagnostyce [1, 27, 29, 34, 68, 69]. Wadą

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. T. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa; tel. 22 628 27 39; e-mail: anna.majewska@wum.edu.pl

jest również stosunkowo długi czas oczekiwania na wynik, jako że badania są zwykle wykonywane przez placówki zewnętrzne.

2. Diagnostyka laboratoryjna beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych

Schemat postępowania diagnostycznego obejmuje: ocenę makroskopową materiału klinicznego (obecność krwi, gazu, zapach, kolor), wykonanie preparatu bezpośredniego barwionego metodą Grama, hodowlę w warunkach beztlenowych i tlenowych, ocenę makroskopową i mikroskopową wyhodowanych kolonii, identyfikację (różne metody), oznaczenie lekowrażliwości oraz ewentualne wykrycie genów odpowiedzialnych za produkcję toksyn metodami biologii molekularnej [35, 36].

Materiał diagnostyczny posiewany jest na pożywki wzbogacone, specjalnie opracowane do hodowli bezwzględnych beztlenowców. Zawierają one m.in. wyciąg mięsny, będący źródłem składników odżywczych, wyciąg drożdżowy jako bogate źródło witamin oraz glukozę stanowiącą źródło energii. Hemina (czynnik X) i krew są źródłem hemu, niezbędnego składnika umożliwiającego wzrost beztlenowców i dodatkowych substancji wzrostowych. Witamina K uznawana jest za składnik ułatwiający wzrost beztlenowym pałeczkom Gram-ujemnym. Komercyjnie dostępne są: podłoże Schaedler agar z 5% krwią baranią i wit. K₁, podłoże Wilkins-Chalgrena z 5% krwią baranią i wit. K₃, agar Columbia z dodatkiem krwi baraniej, oraz podłoże Brucella z 10% krwią końską [19, 33–35, 41].

Niezwykle praktyczne w diagnostyce laboratoryjnej są podłoża wybiórcze, pozwalające na izolowanie Gram-ujemnych pałeczek beztlenowych bezpośrednio z materiału klinicznego. Do izolacji pałeczek z grupy *B. fragilis* wykorzystuje się podłoże BBE (Bacteroides Bile Esculin). Zawarta w podłożu żółć i antybiotyki, takie jak gentamycyna lub amikacyna hamują namnażanie bakterii względnie beztlenowych i większość Gram-ujemnych pałeczek beztlenowych innych niż z rodzaju *Bacteroides*. Różnicowanie grupy *B. fragilis* opiera się na hydrolizie eskuliny obecnej w podłożu. Uwolniona eskuletyna reaguje z jonami żelaza, tworząc kompleks widoczny w postaci zabarwienia ciemnobrązowego lub czarnego wokół ciemnych kolonii pałeczek grupy *B. fragilis* [23, 50]. Inkubację bakterii beztlenowo rosnących należy prowadzić w anaerostatach (N₂ 85%, H₂ 10%, CO₂ 5%) w temperaturze 37°C od 48 godzin do 7 dni. Metoda hodowli pozwala na ocenę morfologii kolonii i badanie mikroskopowe.

Pałeczki rodzaju *Bacteroides* wzrastają w postaci szarych, gładkich, lśniących kolonii o średnicy 1–3 mm. W preparatach barwionych metodą Grama obserwo-

wane są formy polimorficzne: z rozszerzonym środkiem zawierającym wakuolę, nitkowate lub kuliste. Większość gatunków z rodzaju *Bacteroides* wykazuje właściwości sacharolityczne i proteolityczne [17, 22, 33].

Z kolei niektóre pałeczki z rodzajów *Prevotella* i *Porphyromonas* mają zdolność wytwarzania barwnika (BPAR – black-pigmented anaerobic rod-shaped bacteria). Gatunki pigmentujące należące do rodzaju *Prevotella* to: *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. corporis*, *P. denticola*, *P. loescheii*. Wykazują zdolność do asymilowania hemoglobiny z krwi zawartej w podłożu, a następnie konwertowania jej do protoheminy, która akumulowana jest w komórkach bakteryjnych, powodując ciemnobrązowe lub czarne zabarwienie kolonii po kilkudniowej inkubacji. Kolonie, które nie wytworzyły jeszcze barwnika, fluoryzują na czerwono w świetle lampy UV, emitującej światło o długości fali 366 nm. Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za świecenie jest protoporfiryna IX. Kolonie gatunków niepigmentujących, wyglądem przypominają kolonie *Bacteroides* spp., są szare, błyszczące, okrągłe, o średnicy 1–2 mm. W preparacie mikroskopowym widoczne są krótkie pałeczki, co nie wyróżnia ich spośród innych gatunków bakterii Gram-ujemnych. Pałeczki *Prevotella* spp. mają zdolność fermentacji węglowodanów, produkując z glukozy kwas octowy, bursztynowy i inne [17, 58].

Bakterie rodzaju *Porphyromonas* tworzą małe, szare kolonie o średnicy poniżej 1 mm. Widoczne są na podłożu hodowlanym po co najmniej 48 godzinnej inkubacji. Ciemne zabarwienie kolonii niektórych gatunków (*P. gingivalis*) pojawia się po 3–7 dobach wzrostu na podłożu hodowlanym. Pałeczki *Porphyromonas* nie fermentują glukozy ani innych węglowodanów.

Morfologia kolonii *Fusobacterium* jest zróżnicowana. Wzrastają w postaci kolonii o nierównych, ząbkowanych brzegach i średnicy 1–3 mm, po co najmniej 48 godzinach hodowli. Głównym produktem metabolicznym fermentacji cukrów jest kwas masłowy, co nadaje hodowiom nieprzyjemny zapach. W preparacie mikroskopowym widoczne są jako wydłużone komórki o zaokrąglonych końcach. Pałeczki mogą również przyjmować kształt pałeczkowaty, kokoidalny lub nitkowaty. Gatunki z rodzaju *Fusobacterium* wykazują słabą aktywność metaboliczną [17]. Klasyczna diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń wywołanych przez te bakterie jest trudna. Wysoką wartość diagnostyczną posiadają metody molekularne [9].

Na podstawie powyższych informacji można stwierdzić, że różnicowanie i identyfikacja niektórych gatunków beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych może być trudna z powodu ich niecharakterystycznej morfologii i słabej aktywności metabolicznej. W laboratoriach diagnostycznych dostępne są komercyjne testy oparte na badaniu właściwości biochemicznych, dedykowane dla beztlenowców, takie jak np.: RapID-ANA II (Inno-

vative Diagnostic Systems, Atlanta, GA), Rapid ID 32A (bioMérieux SA, Francja) oraz API 20 A w automatycznym systemie ATB Expression (bioMérieux SA, Francja) [10, 34]. Są to zminiaturyzowane systemy manualne, gdzie w mikroprobówkach znajduje się zliofilizowany substrat i wskaźnik reakcji biochemicznej. Oznaczanych jest co najmniej 20 cech biochemicznych drobnoustroju i na tej podstawie powstaje profil numeryczny, który odpowiada konkretnemu gatunkowi z procentowym prawdopodobieństwem właściwej identyfikacji. Inną metodą detekcji wykorzystującą profil biochemiczny bakterii jest automatyczny system Vitek 2 (bioMérieux SA, Francja), w którym stosowane są karty ANC, identyfikujące oprócz beztlenowców także maczugowce. Obecnie istnieje również możliwość identyfikowania drobnoustrojów za pomocą spektrometrii masowej: MALDI-TOF MS MALDI-TOF MS: MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Niemcy) i VITEK® MS (bioMérieux SA, Francja). Analiza oparta jest na jonizacji laserowej białek rybosomalnych i porównaniu otrzymanego widma z widmami referencyjnymi drobnoustrojów zapisanymi w bazie danych. Aparat wskazuje zakresy wiarygodności identyfikacji do poziomu gatunku i rodzaju [2, 34, 36, 38, 39, 44, 52]. Wyniki badań sugerują, że metoda spektrometryczna jako jedностopniowa identyfikacja istotnych klinicznie gatunków bakterii beztlenowych z sukcesem została zaadoptowana do rutynowej diagnostyki tych bakterii. Pozwala na szybszą i łatwiejszą identyfikację drobnoustrojów w porównaniu z innymi metodami fenotypowymi i molekularnymi [11, 53]. Aktualna taksonomicznie baza systemów rozpoznaje gatunki, które mają obecnie nową pozycję systematyczną i nie są uwzględnione w systemie Apibweb™. Należy zwrócić uwagę, że nowe gatunki rodzaju *Bacteroides* takie jak: *B. dorei*, *B. xylanisolvens* i *B. faecis* nie są włączone do bazy danych systemów MALDI Biotyper i VITEK® MS więc mylnie oznaczane są jako *B. vulgatus*, *B. ovatus* i *B. thetaiotaomicron* [10, 34].

W laboratoryjnej diagnostyce zakażeń bakteryjnych coraz chętniej korzysta się z metod innych niż analizy fenotypowe. Powszechnie stosowaną metodą jest PCR i jej modyfikacje (multiplex PCR i inne), a także hybrydyzacja czy hybrydyzacja *in situ* (FISH). Często łączy się kilka metod molekularnych w celu uzyskania optymalnego efektu. „Złotym standardem” obecnie w identyfikowaniu gatunków beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych jest metoda oparta na podobieństwie w sekwencji genu kodującego 16S rRNA. W genie tym występują zmienne regiony, które warunkują różnicę pomiędzy rodzajami i gatunkami drobnoustrojów. Metoda 16S rRNA umożliwia dokonanie właściwej identyfikacji, ale także szybkie rozpoznanie i klasyfikację wcześniej nieopisanych drobnoustrojów. Bazy danych zawierające sekwencję genu 16S rRNA są ogólnodostępne: Basic Local Alignment Search Tool

(BLAST), Ribosomal Database Project (RDP) lub European Molecular Biology Laboratory (EMBL), co umożliwia porównanie uzyskanych sekwencji ze szczepami referencyjnymi [60, 65, 68].

3. Znaczenie kliniczne beztlenowych pałeczek Gram-ujemnych

Bezettlenowe pałeczki Gram-ujemne należą do drobnoustrojów komensalnych, stanowią naturalny składnik mikroflory przewodu pokarmowego, dróg moczowo-płciowych i górnych dróg oddechowych. Do najistotniejszych klinicznie rodzajów zalicza się: *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella* i *Fusobacterium* [33, 34, 48].

3.1. *Bacteroides* i *Parabacteroides*

Bakterie z rodzajów *Bacteroides* i *Parabacteroides* stanowią ważny składnik naturalnego mikrobiomu jelit. Gatunkami najczęściej zasiedlającymi przewód pokarmowy są: *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* i *P. distasonis*. Tymczasem większość zakażeń w obrębie jamy brzusznej wywołuje, charakteryzujący się najwyższą zjadliwością *B. fragilis*. Pałeczki *Bacteroides* spp. i *Parabacteroides* spp. uczestniczą w zakażeniach endogennych, często o charakterze ropnym. Powodują zakażenia w obrębie jamy brzusznej: ropnie wątroby, trzustki, nerki, zapalenie dróg żółciowych, zapalenie wyrostka robaczkowego, zapalenie błony śluzowej macicy, ropnie jajników i jajowodów. W układzie oddechowym pałeczki te mogą powodować: zapalenie ucha środkowego, zatok, ropnie płuc, aspiracyjne zapalenie płuc, ropniak opłucnej. Związane są również etiologicznie z ropniami mózgu, szczególnie pochodzenia usznego lub zatokowego, oraz ropniami w okolicy okołoodbytniczej, a także z pourazowym zapaleniem kości, szpiku i tkanek miękkich oraz bakteriecią.

Chorobotwórczość *B. fragilis* związana jest z właściwościami adhezyjnymi: wytwarzaniem otoczki, śluzu powierzchniowego, obecnością fimbrii. Gatunki posiadające fimbrie wykazują zdolność wiązania się z komórkami nabłonka i białkami gospodarza: fibrynogenem, fibronektyną, lamininą i laktoferyną. Otoczka chroni drobnoustroj przed układem immunologicznym gospodarza, gdyż stanowi fizykochemiczną barierę chroniącą przed fagocytozą i działaniem enzymów lizosomalnych. Unikatowa struktura wielocukru otoczkowego (*zwitterionic polysaccharide*) predysponuje do tworzenia ropni. W związku z tym bakterie wytwarzające te zewnątrzkomórkowe polisacharydy biorą udział w zakażeniach ran, stopy cukrzycowej, prowadzą do powstawania owrzodzeń i przetok. Kolejna grupa czynników wirulencji odpowiedzialna jest za destrukcję komórek

i inwazję do głębiej leżących tkanek. Należy tu wymienić enzymy: kolagenazę, fibrylizynę, neuraminidazę, hialuronidazę, chondroitynazę, heparynazę, lecytynazę, deoksyrybonukleazy, lipazy, fosfolipazy. Przed toksycznym działaniem tlenu w tkankach bakterie są chronione przez katalazę i dysmutazę nadtlenkową, inaktywującą H_2O_2 i wolne rodniki nadtlenkowe. W wyniku przemian metabolicznych *B. fragilis* produkuje krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe: octowy, bursztynowy, masłowy, izomasłowy, propionowy, które hamują chemotaksję granulocytów obojętnochłonnych, umożliwiając ucieczkę pałeczek spod kontroli układu immunologicznego. Ważnym czynnikiem chorobotwórczości tych pałeczek jest lipopolisacharyd (LPS), który zawiera kwas 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowy (KDO). Ma budowę podobną do LPS bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, jednak charakteryzuje się słabszą aktywnością, czego przyczyną są różnice w budowie lipidu A. Niektóre szczepy gatunku *B. fragilis* wytwarzają fragilizynę (BFT, *Bacteroides fragilis* toxin), ciepłowrażliwą enterotoksynę o masie 20 kDa, będącą metaloproteazą zależną od Zn^{2+} , która kodowana jest przez gen *bft*. Gen enterotoksyny występuje w trzech allelach: *bft-1*, *bft-2* i *bft-3*. Toksyna posiada właściwości proteolityczne, hydrolizuje żelatynę, azocoll, fibrynogen, tropomiozynę, G-aktynę, kolagen typu IV, składnik C_3 dopełniacza. Oddziałuje na białko powierzchniowe komórek eukariotycznych E-kadherynę odpowiadającą za przyleganie komórek. BFT wpływając na E-kadherynę uwalnia związaną z nią β -kateninę, która przedostaje się do jądra. β -katenina po połączeniu z czynnikiem transkrypcyjnym komórki T aktywuje transkrypcję oraz translację protoonkogenu *c-myc*. W związku z tym enterotoksynotwórcze szczepy *B. fragilis* (ETBF) mogą przyczynić się do transformacji nowotworowej komórek jelita grubego. Szczepy ETBF odpowiadają za występowanie biegunek. Enterotoksyna *B. fragilis* powoduje reorganizację struktury F-aktyny, zniekształca filamenty aktynowe w komórkach nabłonka jelita, co odpowiada za sekrecję jonów chlorkowych i wody do światła jelita. Stymuluje również komórki nabłonka do wydzielania IL-8, która z kolei odpowiada za zapalne uszkodzenie nabłonka. Szczepy ETBF hodowane są z kału ludzi i zwierząt, a także ze źródeł pozajelitowych. Rola enterotoksyny *B. fragilis* w patogenezie chorób biegunkowych oraz innych zakażeń nie jest jeszcze do końca wyjaśniona i pozostaje przedmiotem badań w wielu ośrodkach na całym świecie [20, 48, 54–56, 61, 64].

3.2. *Porphyrromonas*

Do gatunków najistotniejszych klinicznie zaliczamy *P. asaccharolytica*, *P. gingivalis* i *P. endodontalis*. Przedstawiciele tych gatunków prezentują podobny profil biochemiczny i z tego powodu ich identyfikacja przy

pomocy konwencjonalnych metod diagnostycznych jest niewiarygodna. Prawidłowe identyfikowanie do poziomu gatunków umożliwia analiza 16S rRNA [21].

P. gingivalis ma zdolność wytwarzania różnorodnych czynników warunkujących zjadliwość. Wprawdzie beztlenowiec ten jest naturalnym składnikiem mikrobiomu jamy ustnej, może jednak powodować zmiany chorobowe. *P. gingivalis* jest kluczowym patogenem uczestniczącym w zapaleniu przyzębia (periodontitis), choroby infekcyjnej prowadzącej do destrukcji wyrostka zębodołowego oraz degradacji tkanek utrzymujących ząb [47, 66]. Zdaniem wielu badaczy również *P. endodontalis* uczestniczy w tej patologii [22]. Bakteria posiada wiele czynników wirulencji, które umożliwiają adhezję, inwazję do wnętrza komórek, a także ewazję spod kontroli układu immunologicznego [31, 57].

Bakterie stałej mikroflory jamy ustnej, w tym *P. gingivalis* w warunkach zachwianej równowagi ilościowej i jakościowej stają się czynnikiem etiologicznym stanów zapalnych tkanek miękkich jamy ustnej. Kolonizacja tymi bakteriami przyjmuje postać płytki nazębnej – biofilmu [49]. Tworzenie płytki jest wynikiem procesu przylegania i namnażania bakterii dzięki adhezji i koagregacji [66]. W rozwoju biofilmu bakteryjnego pewną rolę może odgrywać reakcja krzyżowa z przeciwciałami skierowanymi przeciwko białku szoku termicznego (HSP60), wytwarzanemu przez bakterie z gatunku *P. gingivalis* [45]. Podkreśla się fakt występowania tego drobnoustroju, przede wszystkim w płytce poddziąsłowej, u osób z ciężkimi przypadkami przewlekłego zapalenia przyzębia [59]. Bakterie występujące w postaci biofilmu tworzą przestrzenną, doskonale zorganizowaną strukturę otoczoną zbudowaną z polimerów cukrów i białek macierzą. Biofilm chroni bakterie przed działaniem komórek układu immunologicznego oraz przed penetracją antybiotyków. Enzymy bakteryjne (hialuronidaza, kolagenaza, fosfolipaza A, fibrylizyna) rozkładają struktury tkanki łącznej oraz nabłonka [49, 66]. Istotnym czynnikiem zjadliwości *P. gingivalis* są fimbrie, które biorą udział w adhezji komórki bakteryjnej do powierzchni nabłonka dziąsła. Fimbrie posiadają również właściwości inwazyjne oraz są ważnym induktorem wydzielania prozapalnych cytokin [42, 43]. Otoczka zbudowana z glukozy, glukozaminy, galaktozaminy oraz ze związków kwasu moczowego i galaktozaminy jest następnym czynnikiem zjadliwości [57, 59]. Negatywne oddziaływanie na organizm związane jest z bezpośrednim wpływem drobnoustroju oraz produktów jego metabolizmu na komórki tkanki łącznej i nabłonka, a także indukcją reakcji prozapalnej. Mimo że etiopatogeneza zapalenia przyzębia nie została w pełni wyjaśniona, jednym z mediatorów biologicznych w patogenezie chorób jamy ustnej jest tlenek azotu (NO) i jego metabolity [5, 12, 32, 37]. Wykazano, że *P. gingivalis* oprócz powodowania przewlekłego

stanu zapalnego w początkowej fazie zakażenia może być czynnikiem przyczyniającym się do rozwoju np.: miażdżycy naczyń wieńcowych, reumatoidalnego zapalenia stawów, zapalenia tęczówki i siatkówki, zapalenia mięśnia sercowego, wsierdzia, a także rozwoju cukrzycy [45, 66, 67]. Istotnym czynnikiem zjadliwości *Porphyromonas* jest lipopolisacharyd (LPS) o właściwościach endotoksyny. Lipopolisacharyd jest składnikiem błony zewnętrznej bakterii (outer membranę, OM). Uwalniany z rozpadających się komórek jest jedną z silniejszych substancji aktywujących układ immunologiczny. LPS *P. gingivalis* hamuje aktywność fosfatazy zasadowej (warunkuje mineralizację kości), alfa kolagenu typu I, oraz produkcję osteokalcyny i komórek macierzystych z więzadła trzęsawego, biorących udział w regeneracji struktur zęba. Proteazy cysteinowe (gingipainy) biorą również udział w etiopatogenezie zapaleń przyzębia. Uczestniczą w procesie adhezji oraz niszczą składniki C3 i C5 dopełniacza, immunoglobuliny klasy IgG, IgM, IgA oraz inne białka gospodarza jak: albumina, transferyna, haptoglobina, hemopeksyna. Powodują destrukcję tkanek zawierających fibronektynę i kolagen, zaburzają opsonizację oraz upośledzają chemotaksję granulocytów obojętnochłonnych. Natomiast inny enzym wytwarzany przez pałeczki *P. gingivalis*, deiminaza peptydyloargininy, odgrywa rolę w destrukcji tkanek dziąsła i mostków kolagenowych w szczelinie dziąsłowej w zapaleniu przyzębia. Końcowe produkty przemian metabolicznych pałeczek *Porphyromonas* jak np. kwas masłowy, kwas propionowy, aminy, amoniak, indol są ważnymi cytotoksynami hamującymi wzrost i metabolizm komórek gospodarza. Lotne związki siarki (siarkowódór, merkaptan metylu) wpływają na przepuszczalność komórek błony śluzowej i redukcję syntezy kolagenu [31, 43, 62].

3.3. *Prevotella*

Wiele gatunków z rodzaju *Prevotella* należy do fizjologicznej mikroflory błon śluzowych jamy ustnej (*P. melaninogenica*, *P. intermedia*, *P. oralis*), przewodu pokarmowego oraz dróg rodnych (*P. disiens*, *P. bivia*, *P. melaninogenica*, *P. buccae*). Zachwianie równowagi ilościowej i jakościowej mikrobiomu oraz translokacja bakterii poza miejsce naturalnego bytowania skutkuje zakażeniem. *Prevotella* należy do bakterii inwazyjnych, powoduje infekcje wielobakteryjne. Gatunki należące do tego rodzaju wspólnie z *F. nucleatum* mają zdolność do formowania biofilmu w postaci płytki nazębnej. Z zakażeniami w stomatologii związane są przyczynowo *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. oralis* i *P. buccae*. *P. intermedia* jest przyczyną zapalenia dziąseł u kobiet w ciąży i jednym z ważniejszych czynników zapalenia przyzębia [17, 26]. Z próbek klinicznych pobranych od pacjentów z problemami otorynolaryngologicznymi,

często w przebiegu ostrego i przewlekłego zapalenia zatok, z ropni zamkniętych czy okołomigdałkowych, izolowane są *P. intermedia*, *P. ruminicola*, *P. brevis*, *P. melaninogenica*, *P. oralis*, *P. bivia*. Bakterie z rodzaju *Prevotella* wywołują bakteriemie, krwiopochodne zapalenie kości i stawów oraz uczestniczą w formowaniu ropni np.: mózgu i rzadziej w tkance płucnej. Pałeczki rodzaju *Prevotella* są często izolowane z zakażonych ran powstałych po pogryzieniu przez człowieka lub zwierzę [3, 28, 30]. *P. melaninogenica*, *P. intermedia* i *P. denticola* wywołują zachłystowe zakażenie układu oddechowego. Do czynników ryzyka wystąpienia takiej infekcji należą: choroby przyzębia, cukrzyca, przewlekłe choroby płuc, alkoholizm oraz nikotynizm [19, 24, 27, 30]. *P. bivia*, *P. disiens*, *P. intermedia*, *P. loeschei* oraz *P. melaninogenica* izolowane są z materiałów pobranych w przebiegu zakażenia dróg rodnych, zapalenie narządów miednicy mniejszej [25].

Czynniki zjadliwości wytwarzane przez te bakterie umożliwiają kolonizację (otoczka, fimbrie, adhezyny), degradację immunoglobulin (proteazy) oraz destrukcję tkanek (hemaglutyniny, hemolizyny) [14, 17]. Niektóre gatunki mają zdolność wytwarzania bakteriocyn (nigre-scyna), która wykazuje aktywność przeciwko *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Actinomyces* spp. [46].

3.4. *Fusobacterium*

Bakterie z rodzaju *Fusobacterium* wchodzą w skład normalnej mikroflory jamy ustnej, przewodu pokarmowego, występują w drogach oddechowych i drogach rodnych. Mogą powodować zakażenia mieszane z udziałem mikroflory tlenowej. Biorą udział w zakażeniach ropnych, izolowane są z ropni płuc, mózgu, narządów miednicy mniejszej oraz z krwi. Uczestniczą w zakażeniach w obrębie jamy ustnej, takich jak: ropnie okołomigdałkowe, zapalenie gardła i migdałków, choroby przyzębia. Mogą być przyczynowo związane z septycznym zapaleniem stawów, zapaleniem wsierdzia, zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych [6–9, 15, 16, 18, 40].

Do gatunków najistotniejszych klinicznie zaliczane są: *F. nucleatum*, *F. necrophorum*, *F. mortiferum*, *F. varium*. Na podstawie badań homologii DNA i analizy białek komórkowych w obrębie *F. nucleatum* wyodrębniono pięć podgatunków, z których najczęściej izolowany jest *F. nucleatum* subsp. *nucleatum*. Natomiast w obrębie *F. necrophorum* wyodrębniono dwa podgatunki, z których najistotniejszym jest *F. necrophorum* subsp. *necrophorum*.

Obecność adhezyn u *Fusobacterium* umożliwia przyleganie do błon śluzowych. Bakterie posiadają zdolność produkcji amoniaku i siarkowodoru z cysteiny oraz melatoniny. *F. necrophorum* jest wybitnie inwazyjnym patogenem. Posiada klasyczną endotoksynę

(lipopolisacharyd) i chroniące przed ewazją układu immunologicznego leukotoksyny. Produkuje toksyny dermonekrotyczne, cytotoksyny, hemolizyny. Bakteria generuje także substancje, takie jak: lotne związki siarki, enzymy proteolityczne i fosfatazy. Produkuje hemaglutyninę, która prowadzi do agregacji płytek, a w efekcie rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego i trombocytopenii. Aktywność plazminy na powierzchni bakterii jest również uznawana za ważny czynnik zjadliwości umożliwiający inwazję bakterii. Współwystępując z bakteriami tlenowymi, wykorzystującymi do własnych procesów metabolicznych tlen, korzystają z obniżenia potencjału oksydo-redukcyjnego. Zapewnia to bakteriom *F. necrophorum* dogodne warunki do namnażania się [17].

F. nucleatum bierze udział w zakażeniach mieszanych, głównie w patogenezie chorób przyzębia. Obecność adhezyny A (FadA), umożliwia przyleganie do błon śluzowych. Ważnym schorzeniem jest ostre martwiczo-wrzodziejace zapalenie dziąseł (acute necrotizing ulcerative gingivitis – ANUG), zwykle spowodowane brakiem higieny jamy ustnej, niedożywieniem, chorobami ogólnoustrojowymi czy zakażeniami wirusowymi (np.: pierwotne opryszczkowe zapalenie jamy ustnej i HIV). Czynniki sprzyjającymi są również: nałogowe palenie tytoniu i stres psychiczny. Choroba jest skutkiem współdziałania *F. nucleatum*, *Treponema vincentii*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* i *Porphyromonas gingivalis*. Charakterystycznym objawem jest stan zapalny dziąseł z krwawieniem i owrzodzeniem. Zmiany miejscowe pokryte są błoną rzekomą lub tkanką martwiczą złożoną z leukocytów, erytrocytów, fragmentów tkanek i drobnoustrojów. Chory odczuwa metaliczny, nieprzyjemny smak w ustach. Typowym objawem klinicznym jest również cuchnący zapach z ust [9, 51]. Diagnostyka ANUG opiera się na obserwacji specyficznych objawów klinicznych. Potwierdzeniem jest ocena preparatu mikroskopowego z materiału pobranego z wrzodziejących zmian na dziąsłach. Nieleczona choroba prowadzi do postaci przewlekłej – zgorzeliowego zapalenia jamy ustnej.

Zgorzeliowe zapalenie jamy ustnej zwane nomą jest bardzo ciężką postacią ANUG. Stan zapalny o charakterze zgorzeli obejmuje tkanki miękkie i kości w okolicach żuchwy, szczęki, nosa, i czasem okolice podoczołowe, co prowadzi do dużego ubytku tkanek i poważnych zniekształceń twarzy. Choroba dotyczy głównie dzieci w wieku poniżej 10 roku życia. Czynniki predysponującymi są: ubóstwo, niedobory żywieniowe i towarzyszące zakażenia wirusowe (np. odra, świnka, zakażenie CMV lub HSV) lub bakteryjne (np. gruźlica). Obecnie noma bardzo rzadko występuje w krajach rozwiniętych, natomiast zachorowania nadal obserwowane są w krajach Afryki Subsaharyjskiej. Zgorzeliowe zapalenie jamy ustnej rozpoznawano wśród

więźniów obozów koncentracyjnych w Bergen-Belsen i Auschwitz, u pacjentów z HIV/AIDS i innych osób z głębokimi niedoborami odporności [4, 9, 16, 63].

Kompleks wrzecionowców z krętkami jamy ustnej (*F. necrophorum* i *Treponema vincentii*) jest czynnikiem etiologicznym anginy Plauta-Vincenta. Oba gatunki stanowią fizjologiczną mikroflorę jamy ustnej, ale w wyniku nieprawidłowej higieny, niedoborów żywieniowych oraz infekcji wirusowych, nadmiernie się namnażają, co może doprowadzić do zajęcia migdałków podniebiennych i martwiczo-wrzodziejącego zapalenia dziąseł [6, 9, 13].

4. Podsumowanie

Beztlenowe pałeczki Gram-ujemne to bakterie oportunistyczne, które w przypadku obniżonej lokalnie lub systemowo odporności lub na skutek translokacji poza miejsce naturalnego bytowania powodują zakażenia. Bakterie te wytwarzając liczne czynniki wirulencji, z powodzeniem kolonizują tkanki człowieka, dokonują inwazji do wnętrza komórek oraz unikają odpowiedzi immunologicznej. Ponieważ beztlenowce często są związane z poważnymi stanami chorobowymi szybkie oraz wiarygodne rozpoznanie czynnika etiologicznego niewątpliwie stanowi wyzwanie dla laboratorium mikrobiologicznego.

Piśmiennictwo

- Asnani J.: Persistent fever, left-sided neck pain, night sweats – Dx? *J. Fam. Pract.* **63**, 193–196 (2014)
- Azarko J., Wendt U.: Identyfikacja drobnoustrojów – porównanie metody biochemicznej i spektrometrii masowej. *Diagnostyka Laboratoryjna*, **47**, 409–417 (2011)
- Berardino M., Spanu T., i wsp. Empyema caused by *Prevotella bivia* complicating an unusual case of spontaneous chylothorax. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1284–1286 (2014)
- Berthold P.: Noma: a forgotten disease. *Dent. Clin. North. Am.* **47**, 559–574 (2003)
- Boutrin M.C., Wang C., Aruni W., Li X., Fletcher H.M.: Nitric Oxide Stress Resistance in *Porphyromonas gingivalis* is mediated by a putative hydroxylamine reductase. *J. Bacteriol.* **194**, 1582–1592 (2012)
- Brazier J.S.: Human infections with *Fusobacterium necrophorum*. *Anaerobe*, **206**, 165–172 (2006)
- Brook I.: Fusobacterial infections in children. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **15**, 288–294 (2013)
- Brook I.: Microbiology of polymicrobial abscesses and implications for therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 805–810 (2002)
- Chukwu E.E., Nwaokorie F.O., Coker A.O.: A Review of *Fusobacterium necrophorum* infections in humans. *Br. Microbiol. Res. J.* **4**, 480–496 (2014)
- Culebras E., Rodrigues-Avial I., Betriu C., Gomez M., Picazo J.J.: Rapid identification of clinical isolates of *Bacteroides* species by matrix-assisted laser-desorption/ionization time – of-flight mass spectrometry. *Anaerobe*, **18**, 163–165 (2012)

11. De Bruyne K., Slabbinck B., Waegeman W., Vauterin P., De Baets B., Vandamme P.: Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 20–29 (2011)
12. Dembowska E., Wiernicka-Menkiszak M., Samulak-Zielińska R.: Uogólnione agresywne zapalenie przyzębia – diagnostyka, występowanie, etiopatogeneza. *Dent. Med. Probl.* **46**, 55–62 (2009)
13. De Vos A.I., van Rossem R.N., van Elzaker E.P., Nijhuis-Heddes J.M., Maartense E.: Lemierre's syndrome. Sepsis complicating an anaerobic oropharyngeal infection. *Neth. J. Med.* **59**, 181–183 (2001)
14. Dorn B.R.: Invasion of Human Oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect. Immun.* **66**, 6054–6057 (1998)
15. Eilbert W., Singla N.: Lemierre's syndrome. *Int. J. Emerg. Med.* **6**:40 doi:10.1186/1865-1380-6-40 (2013) 13.04.2015
16. Enwonwu C.O., Falkler W.A., Idigbe E.O.: Oro-facial gangrene (noma/cancrum oris): pathogenetic mechanisms. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **11**, 159–171 (2000)
17. Finegold S.M.: Chapter 20. Anaerobic Gram-negative Bacilli (w) *Medical Microbiology*, red. Baron S. 4th edition. Galveston, 1996
18. Fourage M., Bourguignat C., Fermond B., Delobel P.: A recurrent tonsillitis. *Lancet*, **381**, 266 (2013)
19. Pteita D., Könönen E., Söderling E., Gürsö U.K.: Effect of estradiol on planctonic growth, coaggregation, and biofilm formation of the *Prevotella intermedia* group bacteria. *Anaerobe*, **26**, 7–13 (2014)
20. Galvão B.P., Weber B.W., Rafudeen M.S., Ferreira E.O., Patrick S., Abratt V.R. Identification of a Collagen Type I Adhesin of *Bacteroides fragilis*. *PLoS One*, **9**, e91141 (2014)
21. Gomes B.P., Jacinto R.C., Pinheiro E.T., Sousa E.L., Zaia A.A., Ferraz C.C., Souza-Filho F.J.: *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol. Immunol.* **20**, 211–215 (2005)
22. Guidelines for diagnosis and treatment of anaerobic infections. Chapter 1–1. Anaerobic infections (General): epidemiology of anaerobic infections. *J. Infect. Chemother.* **17** Suppl. 4–12 (2011)
23. Guidelines for diagnosis and treatment of anaerobic infections. Chapter 1–2. Anaerobic infections (general) testing anaerobic infections. *J. Infect. Chemother.* **17** Suppl. 13–25 (2011)
24. Guidelines for diagnosis and treatment of anaerobic infections Chapter 2–1. Anaerobic infections (individual fields): respiratory infections. *J. Infect. Chemother.* **17** Suppl. 42–46 (2011)
25. Guidelines for diagnosis and treatment of anaerobic infections. Chapter 2–6–2. Anaerobic infections (individual fields): femal genital infections. *J. Infect. Chemother.* **17** Suppl. 99–101 (2011)
26. Guidelines for diagnosis and treatment of anaerobic infections Chapter 2–10. Anaerobic infections (individual fields): dental and oral infections. *J. Infect. Chemother.* **17** Suppl. 112–115 (2011)
27. Guidelines for diagnosis and treatment of anaerobic infections Charter 2–11. Anaerobic infections (individual fields): otorhinolartngological infections. *J. Infect. Chemother.* **17** Suppl. 116–118 (2011)
28. Gwo-Jong H., Cheng-ren C., Mei-chu L., Shi-ping L.: Chest wall abscess due to *Prevotella bivia*. *J. Zhejiang Univ. Sci B*, **10**, 233–236 (2009)
29. Han A., Lazarus G.S. i wsp.: The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* **19**, 532–541 (2011)
30. Karabinas P.K., Stergios E.D., Athanasopoulou M.G., Vlamis J.: Hematogenous Long Bone Osteomyelitis by *Prevotella (Bacteroides) melaninogenicus*. *J. Clin. Med. Res.* **2**, 277–280 (2010)
31. Kato H., Taguchi Y., Tominaga K., Umeda M., Tanaka A.: *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch. Oral Biol.* **59**, 167–175 (2014)
32. Kendall H.K., Haase H.R., Li H., Xiao Y., Bartold P.M.: Nitric oxide synthase type – II is synthesized by human gingival tissue and cultured human gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.* **34**, 194–200 (2000)
33. Kierzkowska M., Majewska A., Kądzilska J., Rozpara A., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk G.: Udział beztlenowych Gram-ujemnych bakterii w zakażeniach hospitalizowanych pacjentów. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **63**, 235–240 (2011)
34. Kierzkowska M., Majewska A., Kuthan R.T., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk G.: A comparison of Api 20A vs MALDI-TOF MS for routine identification of clinically significant anaerobic bacterial strains to the species level. *J. Microbiol. Methods*, **92**, 209–212 (2013)
35. Kierzkowska M., Majewska A., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk A., Ładomirska-Pestkowska K., Młynarczyk G.: Specyfika zakażeń bakteriami beztlenowymi na oddziałach chirurgicznych i ortopedycznych. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **64**, 29–34 (2012)
36. Kierzkowska M., Majewska A., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk G.: Beztlenowe ziarenkowce Gram-dodatnie (GPAC) – diagnostyka i znaczenie kliniczne. *Post. Mikrobiol.* **53**, 35–42 (2014)
37. Kozłowski Z., Konopka T., Karolewska E., Kaczmarek U., Wnukiewicz J.: Ocena stężenia tlenków azotu w ślinie pacjentów chorych na raka płaskonabłonkowego błony śluzowej jamy ustnej i przewlekłe zapalenie przyzębia. *Dent. Med. Probl.* **46**, 55–62 (2009)
38. Kuthan R.T., Chabros Ł., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk G.: Zastosowanie spektrometrii masowej MALDI-TOF w rutynowej medycznej diagnostyce bakteriologicznej. *Zakażenia*, **1**, 87–90 (2013)
39. Lee E.H., Degener J.E., Welling G.W., Veloo A.C.M.: Evaluation of Vitek 2 ANC card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1745–1749 (2011)
40. Megged O., Assous M.V., Miskin H., Peleg U., Schlesinger Y.: Neurologic manifestations of *Fusobacterium infections* in children. *Eur. J. Pediatr.* **172**, 77–83 (2013)
41. Młynarczyk G., Młynarczyk A.: Znaczenie diagnostyki mikrobiologicznej w rozpoznawaniu i terapii zakażeń bakteriami rosnącymi beztlenowo. *Zakażenia*, **3**, 90–95 (2013)
42. Moreno S., Contreras A.: Functional differences of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in determining periodontal disease pathogenesis: a literature review. *Colomb. Med.* **44**, 48–56 (2013)
43. Mysak J., Podzimek S., Sommerova P., Lyuya-Mi Y., Bartova J., Janatova T., Prochazkova J., Duskova J.: *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *J. Immunol. Res.* DOI:10.1155/2014/476068 (2014)
44. Nagy E.: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new possibility for the identification and typing of anaerobic bacteria. *Future Microbiol.* **9**, 217–233 (2014)
45. Napora M., Krajewski J., Górska R.: Czy wiemy już wystarczająco dużo o związku chorób przyzębia z patologiami ogólnoustrojowymi? *Nowa Stomatologia*, **1**, 3–33 (2010)
46. Okuda T., Kokubu E., Kawana T., Saito A., Okuda K., Ishihara K.: Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella* species. *Anaerobe*, **18**, 110–116 (2012)
47. Palm E., Khalf H., Bengtsson T.: *Porphyromonas gingivalis* downregulates the immune response of fibroblasts. *BMC Microbiology*, **13**, 155 (2013)
48. Papaparaskevas J., Katsandri A., Pantazatou A., Stefanou I., Avlamis A., Legakis N., Tsakris A.: Epidemiological characteristics of infections caused by *Bacteroides*, *Prevotella* and *Fusobacterium* species: A prospective observational study. *Anaerobe*, **17**, 113–117 (2011)

49. Pasich E., Walczewska M., Pasich A., Marcinkiewicz J.: Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej. *Post. Hig. Med. Dosw.* **67**, 736–741 (2013)
50. Ramamurthy D., Pazhani G.P., Sarkar A., Nandy R.K., Rajendran K., Ramamurthy T.: Case-control study on the role of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* as a cause of diarrhea among children in Kolkata, India. *PLoS One*, **8**, e60622 (2013)
51. Roberts G.L.: Fusobacterial infections: an underestimated threat. *Br. J. Biomed. Sci.* **57**, 156–162 (2000)
52. Sakamoto M., Benno Y.: 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1599–605 (2006)
53. Seng P., Rolain J.M., Fournier P.E., La Scola B., Drancourt M., Raoult D.: MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiol.* **5**, 1733–1754 (2010)
54. Sears C.L.: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a rogue among symbiotes. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 349–369 (2009)
55. Sears C.L.: The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon*, **39**, 1737–1746 (2001)
56. Sears C.L., Geis A.L., Housseau F.: *Bacteroides fragilis* subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis. *J. Clin. Invest.* **124**, 4166–4172 (2014)
57. Singh A., Wyant T., Anaya-Bergman C., Aduse-Opoku J., Brunner J., Laine M.L., Curtis M.A., Lewis J.P.: The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect. Immun.* **79**, 4533–4542 (2011)
58. Shah H.N., Collins D.M.: *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 205–208 (1990)
59. Słotwińska, S.M.: Mikrobiologia zapaleń przyzębia na podstawie piśmiennictwa i badań własnych. Cz. II: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*. *Nowa Stomatologia*, **3**, 151–154 (2005)
60. Song Y., Liu C., Mc Teague M., Finegold S.M.: 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant Gram-positive anaerobic cocci. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1363–1369 (2003)
61. Stachowicz A.M., Łaniewski P., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Wpływ toksyn bakteryjnych na proces nowotworzenia. *Post. Biochemii*, **56**, 389–399 (2010)
62. Szulc M., Radwan-Oczko M.: Rola *Porphyromonas gingivalis* w miażdżycy tętnic. *Kardiochirurgia i Torako-chirurgia Polska*, **1**, 100–105 (2012)
63. Tempest M.N.: Cancrum oris. *Br. J. Surg.* **53**, 949–969 (1966)
64. Wexler H.M.: *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 593–621 (2007)
65. Wildeboer-Veloo A.C.M., Harmsen H.J.M., Welling G.W., Degener J.E.: Development of 16S rRNA-based probes for the identification of Gram-positive anaerobic cocci isolated from human clinical specimens. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 985–992 (2007)
66. Woźakowska-Kapłon B., Filipiak K.J., Opolski G., Górka R.: Związek chorób przyzębia z cukrzycą i nefropatią cukrzycową. *Diabet. Prakt.* **10**, 72–75 (2009)
67. Woźakowska-Kapłon B., Filipiak K.J., Opolski G., Górka R.: Znaczenie opieki periodontologicznej u pacjentów ze schorzeniami sercowo-naczyniowymi. *Kardiolog. Pol.* **67**, 1125–1127 (2009)
68. Veloo A.C.M., Erhard M., Welker M., Welling G.W., Degener J.E.: Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 58–62 (2011)
69. Żabicka D., Literacka E.: Nowoczesne metody wykrywania i identyfikacji bakterii. *Forum Zakażeń*, **4**, 65–72 (2013)