

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, ul. T. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

²Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus, ul. T. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

Wpłynęło w lipcu 2013 r.

1. Wstęp. 2. Systematyka beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich. 3. Znaczenie kliniczne GPAC. 4. Diagnostyka laboratoryjna. 4.1. Hodowla. 4.2. Identyfikacja fenotypowa. 4.3. Identyfikacja genotypowa. 5. Podsumowanie

Gram-positive anaerobic cocci (GPAC) – diagnostic and clinical significance

Abstract: Among the Gram-positive anaerobic bacteria associated with clinical infections, the Gram-positive anaerobic cocci (GPAC) are the most predominant and account for approximately 25–30% of all isolated anaerobic bacteria from clinical specimens. They can be cultured from a wide variety of sites, particularly abscesses and infections of the mouth, skin and soft tissues, bone and joints and upper respiratory and female genital tracts. Most infections involving GPAC are polymicrobial. Still, routine culture and identification of these slowly growing anaerobes to the species level has been limited in the diagnostic laboratory, mainly due to the requirement of prolonged incubation times and time-consuming phenotypic identification. The development of molecular methods such as PCR, multiplex PCR, sequencing of the 16S rRNA gene have led to improved identification of GPAC. In recent years, MALDI-TOF MS has been implemented in routine laboratories and utilized as a completely new approach for the identification of bacteria. Data from molecular methods have led to extensive taxonomic changes during the last decades and also to the occurrence of new genera and species. This review describes clinical significance of GPAC and virulence factors one of the most pathogenic species – *Finegoldia magna*.

1. Introduction. 2. Taxonomy of Gram-positive anaerobic cocci. 3. Clinical significance of GPAC. 4. Laboratory diagnostic. 4.1. Culture. 4.2. Phenotypic identification. 4.3. Genotypic identification. 5. Summary

Słowa kluczowe: *Finegoldia magna*, GPAC, MALDI-TOF MS, sekwencjonowanie 16S rRNA

Key words: *Finegoldia magna*, GPAC, MALDI-TOF MS, sequence analysis 16S rRNA

1. Wstęp

Bakterie beztlenowe po raz pierwszy zaobserwował Louis Pasteur w 1861 roku opisując martwe drobnoustroje na obrzeżu preparatu przyżyciowego, podczas gdy bakterie w centralnej części preparatu pozostawały aktywne. Pasteur określił bakterie żyjące bez dostępu tlenu jako „anaerobies”. Rosnące beztlenowo ziarenkowce zostały po raz pierwszy opisane w 1893 r. przez Veillon [34]. Wykryty szczep wyizolowano z czystej hodowli w przebiegu ropnego zapalenia gruczołu Bartholina. W latach 1888–1916 w literaturze opisano ponad 300 metod generowania warunków beztlenowych (odtleniania) umożliwiających hodowanie drobnoustrojów w warunkach *in vitro* [34].

Bezettlenowe ziarenkowce Gram-dodatnie (Gram-positive anaerobic cocci – GPAC) stanowią około 25–30% bakterii beztlenowych izolowanych z próbek materiałów klinicznych [21]. Drobnoustroje te często są pomijane w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej. Niewątpliwie ma to związek z wydłużonym czasem generacji (czasochłonna hodowla i identyfikacja). Ponadto GPAC wchodzi w skład fizjologicznej mikroflory skóry i błon śluzowych i najczęściej są izolowane z zakażeń mieszanych [25].

W poprzednich latach identyfikację bakterii beztlenowych prowadzono na podstawie morfologii kolonii na podłożu agarowym, obserwacji mikroskopowej komórek i ich układów w preparatach barwionych metodą Grama oraz przy użyciu szeregów biochemicznych. Identyfikacja na podstawie biochemicznej i metabolicznej charakterystyki szczepu jest procesem długotrwałym i nie zawsze daje zadowalające wyniki. Obecnie istnieje możliwość identyfikowania drobnoustrojów na podstawie analizy białek rybosomalnych za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF MS. Skrócenie czasu identyfikacji bakterii beztlenowych uzyskano także po wprowadzeniu nowoczesnych metod biologii molekularnej takich jak PCR, multiplex PCR, sekwencjonowanie genu 16S rRNA oraz mikromacierzy. Metody genetyczne są szybkie, wysoce swoiste i czułe [28, 29, 39]. Udoskonalenie metod badawczych, oprócz umożliwienia szybszej i precyzyjniejszej identyfikacji, doprowadziło do konieczności dokonania istotnych zmian w nomenklaturze GPAC. Istniejące gatunki przemianowano, a nowe zostały dodane, w wyniku czego pojawiły się zmiany w nomenklaturze. Obecnie w piśmiennictwie coraz częściej prezentowane są wyniki badań wskazujące na udział GPAC w etiologii zakażeń, jednocześnie wzrasta częstość izolacji tych bakterii z materiałów

* Autor korespondencyjny: Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. T. Chałubińskiego 5; 02-004 Warszawa; tel. 22 62 82739, e-mail: marta.kierzkowska@wum.edu.pl

klinicznych. Istnieje więc potrzeba precyzyjnej identyfikacji izolowanych szczepów oraz poznania ich czynników wirulencji i profilu wrażliwości na antybiotyki.

Do najważniejszych beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich (GPAC), izolowanych z próbek materiałów klinicznych od ludzi, należą rodzaje *Peptostreptococcus*, *Finegoldia*, *Parvimonas*, *Anaerococcus* i *Peptoniphilus*.

2. Systematyka beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich

Na przestrzeni lat dokonano istotnych zmian taksonomicznych w obrębie GPAC. Początkowo bakterie na podstawie morfologii nazwane były beztlenowo rosnącymi paciorkowcami – rodzaj *Peptostreptococcus* oraz beztlenowo rosnącymi gronkowcami – rodzaj *Peptococcus* należących do rodziny *Peptococcaceae*. W 1983 roku przekwalifikowano gatunki należące do GPAC. Analizy dokonano na podstawie składu zasad DNA, hybrydyzacji DNA-DNA, produkcji kwasów tłuszczowych oraz innych reakcji biochemicznych. W rodzaju *Peptococcus* pozostał tylko gatunek *Peptococcus niger*, a gatunki *P. asaccharolyticus*, *P. indolicus*, *P. prevotii* i *P. magnus* zostały przyporządkowane do rodzaju *Peptostreptococcus* [7, 9]. Przez kolejne lata dokonywano wielu badań przedstawicieli poszczególnych gatunków i ostatecznie na podstawie analizy genu 16S rRNA uporządkowano systematykę ziarenkowców beztlenowo rosnących. W 1998 roku rodzaj *Peptostreptococcus* został podzielony, wyodrębniono nowe rodzaje – *Finegoldia* i *Micromonas* [24], po czym rodzaj *Micromonas* reklasfikowano na *Parvimonas* [31]. W 2001 E z a k i i wsp. [8] wyodrębnili w obrębie GPAC trzy nowe rodzaje – *Peptoniphilus*, *Anaerococcus*, *Gallicola*. Z kolei rodzaj *Ruminococcus* został zamieniony na rodzaj *Blautia* [20]. W latach 2009–2010 zostały utworzone dwa kolejne rodzaje *Anaerosphaera* [32] i *Murdochiella* [33]. Poniżej przedstawiono aktualnie obowiązującą systematykę GPAC, w której zostały wymienione również gatunki odkryte i nazwane w latach 2012–2013.

Ziarenkowce Gram-dodatnie

Rodzina: *Peptococcaceae*

Rodzaj: *Peptococcus*

Gatunek: *P. niger*

Rodzina: *Peptostreptococcaceae*

Rodzaj: *Peptostreptococcus*

Gatunki: *P. anaerobius*, *P. russellii*, *P. stomatis*

Rodzaj: *Anaerosphaera*

Gatunek: *A. aminiphila*

Clostridiales Rodzina XI. Incertae Sedis:

Rodzaj: *Anaerococcus*

Gatunki: *A. hydrogenalis*, *A. lactolyticus*,
A. murdochii, *A. octavius*, *A. prevotii*,
A. tetradius, *A. vaginalis*

Rodzaj: *Blautia*

Gatunek: *B. producta*

Rodzaj: *Gallicola*

Gatunek: *G. barnesae*

Rodzaj: *Murdochiella*

Gatunek: *M. asaccharolytica*

Rodzaj: *Parvimonas*

Gatunek: *P. micra*

Rodzaj: *Peptoniphilus*

Gatunki: *P. asaccharolyticus*, *P. coxii*, *P. duerdenii*,
P. gorbachii, *P. harei*, *P. indolicus*, *P. ivorii*,
P. koenoeneniae, *P. lacrimalis*, *P. methio-*
ninivorax, *P. olsenii*, *P. tyrrelliae*

Rodzaj: *Finegoldia*

Gatunek: *F. magna*

Rodzina: *Coriobacteriaceae*

Rodzaj: *Atopobium*

Gatunek: *A. parvulum*

3. Znaczenie kliniczne GPAC

Beztlenowe ziarenkowce Gram-dodatnie stanowią około 1/3 wszystkich bakterii beztlenowych izolowanych z próbek materiałów klinicznych [21, 25]. GPAC to część prawidłowej mikroflory u ludzi. Ta zróżnicowana grupa drobnoustrojów kolonizuje różne partie ciała, przede wszystkim skórę i powierzchnię błon śluzowych jamy ustnej oraz przewód pokarmowy i dolne odcinki układu moczowo-płciowego u kobiet [22, 25]. Przy każdym zaburzeniu panującej równowagi komensale te mogą uczestniczyć w procesie infekcyjnym w miejscu swojego naturalnego bytowania. Zakażenia występują również wskutek translokacji drobnoustrojów z miejsc naturalnego bytowania do miejsc, które z natury są jałowe. Jest to zwykle skutek stosowania inwazyjnych zabiegów medycznych, ale może mieć miejsce również na skutek wielu innych przyczyn. Zakażenia mogą dotyczyć każdej tkanki i narządu. GPAC często są obecne w zakażeniach głębokich tkanek miękkich, kości i stawów, w infekcjach żeńskich dróg płciowych, zakażeniach stomatologicznych oraz górnych i dolnych dróg oddechowych [3, 17]. Z materiału pobranego w przebiegu ropniaka opłucnej izolowano *Paravimonas micra*, ale również *Finegoldia magna*, *Peptostreptococcus anaerobius* i *Anaerococcus vaginalis*, przy czym GPAC stanowiły 26,3% wśród beztlenowych bakterii izolowanych z tego typu materiałów [2]. Wykazano również obecność GPAC w próbkach materiałów pobranych w ostrych i przewlekłych zakażeniach ran (np. przewlekłe owrzodzenia). Bakterie te i ich metabolity mogą znacznie upośledzać procesy prawidłowego gojenia ran [30, 37]. Szczepy te najczęściej izolowane są z materiałów klinicznych wraz z mikroflorą tlenową lub innymi bakteriami beztlenowymi. Wykazano, że w takich wielogatunkowych zakażeniach

bakterie oddziałują na siebie w sposób synergistyczny, wnikając przebieg infekcji. Powoduje to obniżenie potencjału oksydoredukcyjnego w tkankach, ochronę przed fagocytozą i potęguje zdolność do tworzenia ropni. Wiele zakażeń o przebiegu przewlekłym, np. owrzodzenia, odleżyny, stopa cukrzycowa, związanych jest z kolonizacją rany przez bakterie wytwarzające biofilm. Ta wielokomórkowa struktura chroni drobnoustroje przed reakcjami obronnymi układu odpornościowego gospodarza i stanowi istotną barierę uniemożliwiającą penetrację antybiotyku [13, 37]. W 2011 r. Han i wsp. [13] wykazali, że w zakażeniach ran, oprócz bakterii tlenowych, takich jak *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, uczestniczą także beztlenowe ziarenkowce Gram-dodatnie, głównie *Peptoniphilus* sp., *Finegoldia* sp. i *Anaerococcus* sp. Biorąc pod uwagę odmienne czynniki wirulencji u różnych rodzajów GPAC (*Finegoldia*, *Parvimonas*) prawidłowa identyfikacja drobnoustrojów do poziomu gatunku izolowanych z materiałów klinicznych staje się bardzo ważna. W wielu przypadkach GPAC występują w zakażeniach jednogatunkowych, należy tu wymienić głównie *Finegoldia magna*, ale także: *P. micra*, *P. harei*, *P. anaerobius* [38].

Kliniczne znaczenie beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich było niezauważane, z uwagi na to, że wyniki badania uzyskuje się dopiero, gdy leczenie empiryczne zostało rozpoczęte, często z pozytywnym skutkiem terapeutycznym. Ponadto identyfikacja poszczególnych gatunków GPAC jest pomijana w laboratoriach diagnostycznych z powodu trudności laboratoryjnych (przedłużona hodowla, specjalne wymagania atmosferyczne i odżywcze, wielogatunkowe zakażenia).

Finegoldia magna

F. magna jest najbardziej patogennym i najczęściej występującym gatunkiem GPAC izolowanym z różnych materiałów klinicznych [3, 22, 38]. Wchodzi w skład mikroflory przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego oraz jamy ustnej i skóry. W większości przypadków drobnoustrój jest uważany za zanieczyszczenie próbek materiału klinicznego, a nie czynnik etiologiczny zakażenia [26]. Dane z piśmiennictwa wskazują jednak na istnienie wielu różnych zakażeń wywołanych przez *F. magna*, dotyczących przede wszystkim infekcji tkanek miękkich, ran, kości i stawów oraz zakażeń związanych z obecnością endoprotez. Opisano również rzadziej występujące zakażenia, takie jak: ropniak opłucnej i zapalenie wsierdza [2, 10, 26].

U *F. magna* opisano wiele czynników wirulencji, do najważniejszych należą omówione poniżej: białko L, PAB (peptostreptococcal albumin binding protein), SufA (subtilisin-like proteinase) i FAF (*F. magna* adhesion factor) oraz kolagenaza i zdolność wytwarzania biofilmu.

W 1988 roku Björck [1] pierwszy opisał białko powierzchniowe ściany komórkowej (białko L), zdolne

do wiązania się ze wszystkimi klasami ludzkich immunoglobulin. Białko L ma powinowactwo do IgG, IgM, IgA. Jest także zdolne do wiązania się z domeną κ lekkiego łańcucha IgE, co stymuluje uwalnianie histaminy z komórek tucznych i z zasadochłonnych granulocytów, wywołując reakcje zapalne. Zauważono obecność białka L u *F. magna* w próbkach materiałów pochodzących z żeńskich narządów płciowych z podejrzeniem bakteryjnej waginozy [22]. Struktura białka L jest podobna do białka A gronkowców i białka G paciorkowców. Białko L jest znacznie mniejsze od białka G, co ułatwia penetrację tkanek. Wszystkie te białka posiadają wiele kopii wysoce konserwatywnych domen wiążących Ig [12]. De Chateau i Björck [4] wykazali, że niektóre szczepy *F. magna* wytwarzają powierzchniowe białka PAB (peptostreptococcal albumin binding protein), zdolne do wiązania białek surowicy ludzkiej (HSA – human serum albumin). PAB zawiera niepowtarzające się domeny, w przeciwieństwie do większości innych białek powierzchniowych bakterii Gram-dodatnich, w tym białek L i G. Szczepy *F. magna* zawierające białka PAB cechuje wzmożona patogenność, większość tych szczepów została wyizolowana z materiałów od pacjentów z różnie umiejscowionym zakażeniem ropnym. Spośród 30 badanych szczepów, u 16 stwierdzono zdolność do wiązania znacznej ilości HSA. Natomiast szczepy wyizolowane z pochwy oraz określone, jako komensale nie wykazały powinowactwa do HSA. Wskazuje to na związek pomiędzy zdolnością wiązania albumin, a infekcjami o ropnym przebiegu. W związku z tym białka PAB odgrywają istotną rolę w zwiększaniu zjadliwości bakterii w procesie infekcyjnym. Ponadto szczepy zdolne do generowania białek PAB, nie są zdolne do wytwarzania białek L, wiążących lekkie łańcuchy Ig, co sugeruje, że lokalizacja i przebieg zakażenia zależny jest od określonych właściwości wirulentnych bakterii [5]. SufA (subtilisin-like proteinase) to proteinaza, która degradowała fibrynogen w ludzkim osoczu. Wykazano, że SufA opóźnia tworzenie się sieci włóknika wokół *F. magna*, która przylega do ludzkich keratynocytów i ułatwia zapoczątkowanie infekcji [14, 15]. Podczas rozpadu fibrynogenu uwalniane są fibrynopeptydy (FPA, FPB), które działają chemotaktycznie na neutrofile, makrofagi, fibroblasty. Ekspresja SufA może upośledzać gojenie się ran [30]. Białko FAF (*F. magna* adhesion factor) jest wytwarzane przez ponad 90% szczepów. Struktura i funkcje podobne są do białka M *Streptococcus pyogenes*. FAF występuje w znacznej ilości na powierzchni komórki bakteryjnej, ale jest też uwalniane na zewnątrz. Białko to ma cechy typowe dla innych białek powierzchniowych bakterii Gram-dodatnich. FAF uczestniczą w interakcjach pomiędzy bakteriami w organizmie człowieka, umożliwiając kolonizację i przetrwanie *F. magna* w organizmie ludzkim. Wykazano, że białko FAF indukuje agregację bakterii. Badania

nad biologicznymi funkcjami tego czynnika patogenności są jeszcze na wstępnym etapie [11]. Niektóre szczepy *F. magna* (w zależności od miejsca zakażenia) wydzielają kolagenazę. Stwierdzono, że szczepy *F. magna* wyizolowane z nieropnego zapalenia gruczołu sutkowego i stopy cukrzycowej, wytwarzają kolagenozę w wyższych stężeniach w porównaniu ze szczepami wyizolowanymi z zakażeń w obrębie jamy brzusznej [18]. Kolagen obficie występuje w skórze, ścięgnach, tkance chrzęstnej; jest składnikiem organicznym kości, zębów i rogówki. Uszkodzenie kolagenu powoduje utratę integralności tkanek i postęp choroby. Jego produkcja jest ważna dla wzrostu bakterii asacharolitycznych. Podczas rozpadu kolagenu uwalniane są aminokwasy niezbędne do wzrostu i przeżycia drobnoustroju [18].

W 2012 r. Donelli [6] opisał zdolność *F. magna* do tworzenia biofilmu. Gatunek ten wykazuje silną adhezję i może uczestniczyć w tworzeniu biofilmu z udziałem innych bakterii beztlenowych, np. *Bacteroides fragilis* i *Clostridium difficile*. Biofilm zabezpiecza mikroorganizmy przed komórkami układu immunologicznego oraz stanowi barierę dla antybiotyków [37].

4. Diagnostyka laboratoryjna

Identyfikacja bakterii beztlenowych stanowi dla bakteriologów klinicznych jedno z najtrudniejszych wyzwań. Znanych jest wiele metod umożliwiających ich detekcję w materiałach od pacjentów z podejrzeniem choroby infekcyjnej. Niektóre z nich zostały wyparte przez intensywnie rozwijające się techniki molekularne. W niniejszej pracy zostały szerzej opisane metody rutynowo stosowane w laboratoriach mikrobiologicznych.

4.1. Hodowla

Właściwe pobranie i transport próbek materiałów klinicznych są konieczne do przeprowadzenia poprawnej diagnostyki laboratoryjnej [22, 23]. Materiał powinien być pobrany w sposób minimalizujący możliwość zanieczyszczenia próbek drobnoustrojami fizjologicznie zasiedlającymi skórę i błony śluzowe oraz transportowany w podłożach zapewniających warunki beztlenowe. Materiał diagnostyczny posiewany jest na podłoże Sheadler agar z 5% krwią baranią, heminą i witaminą K (bioMerieux SA, Francja). GPAC do wzrostu potrzebują atmosfery beztlenowej, dlatego inkubację należy prowadzić w anaerostatach (N_2 85%, H_2 10%, CO_2 5%) w temperaturze 37°C od 48 godzin do 7 dni. Metoda hodowli pozwala na ocenę morfologii wyhodowanych kolonii, a następnie badanie mikroskopowe (barwienie metodą Grama). Bakterie te są Gram-dodatnimi ziarenkowcami, które układają się w łańcuszki, dwoinki, tetrazy lub nieregularne skupiska. Nie wytwarzają katalazy.

4.2. Identyfikacja fenotypowa

Różnicowanie i identyfikacja beztlenowych ziarenkowców Gram-dodatnich jest utrudniona z powodu ich słabej aktywności metabolicznej. W ostatnim dziesięcioleciu fenotypowa identyfikacja bakterii beztlenowych wykonywana była przy użyciu komercyjnie dostępnych testów: RapID-ANA II (Innovative Diagnostic Systems, Atlanta, GA), Rapid ID 32A (bioMerieux SA, Francja) oraz zestawu API 20 A w automatycznym systemie ATB Expression (bioMerieux SA, Francja) [16, 28].

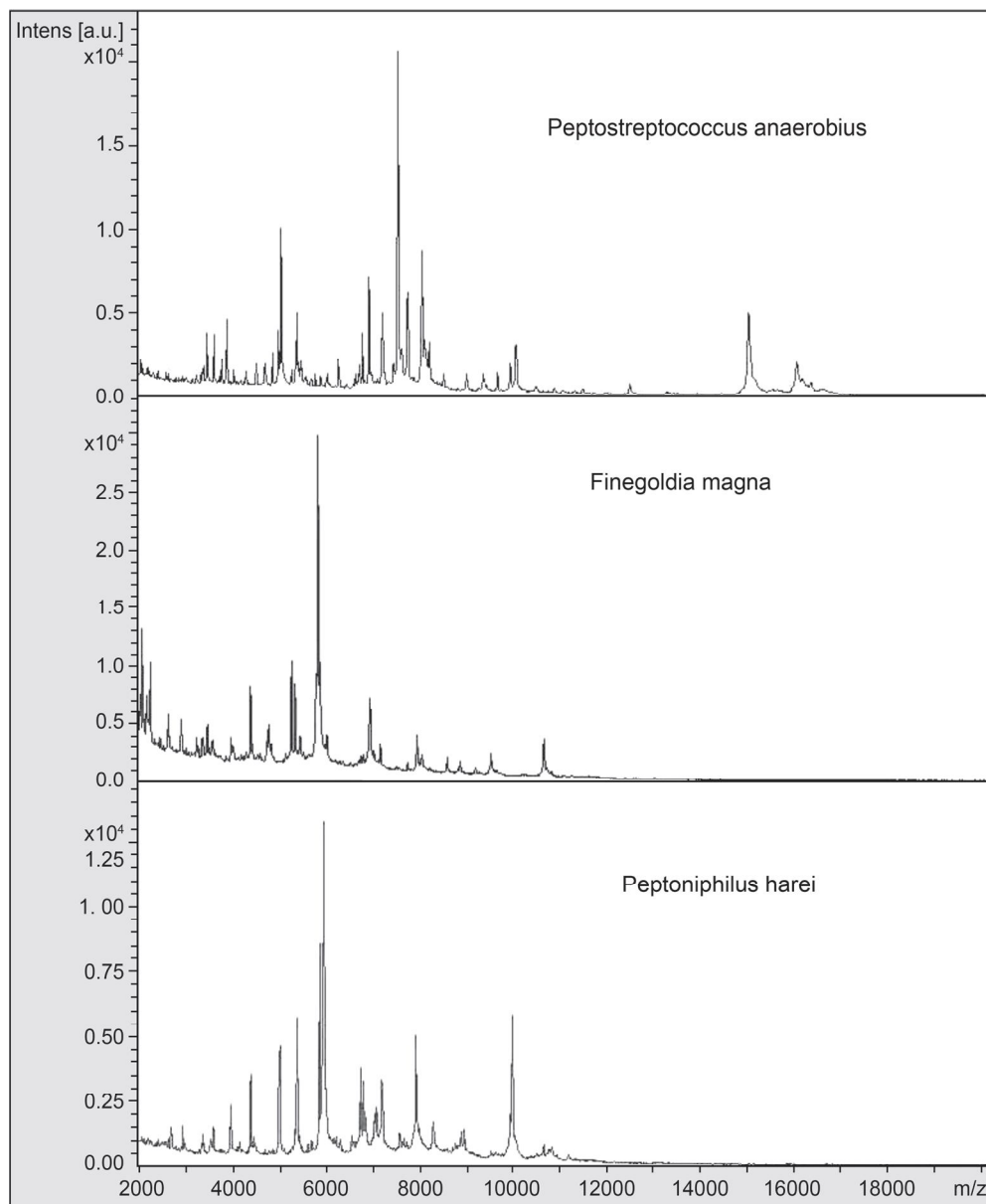
API 20 A. Do wykonania tego badania konieczne jest przygotowanie inokulum z czystej, świeżej hodowli w API 20A Medium do osiągnięcia zmętnienia równego lub większego 3 w skali McFarland'a. Aby uzyskać takie zmętnienie dla wolnorosnących, drobnych kolonii bakterii należy użyć więcej niż jednej płytki z hodowlą. Zawiesina z ampułki nanoszona jest na pasek API 20A i inkubowana w ciągu 24–48 godzin w warunkach beztlenowych. Test ten pozwala na ocenę metabolicznej aktywności badanego szczepu bakterii w reakcjach z umieszczonymi w mikroprobówkach liofilizowanymi substratami. Ocenie podlega zdolność do fermentacji 16 węglowodanów (D-glukoza (GLU), D-mannitol (MAN), D-laktoza (LAC), D-sacharoza (SAC), D-maltoza (MAL), salicyna (SAL), D-ksyloza (XYL), L-arabinoza (ARA), glicerol (GLY), D-celobioza (CEL), D-mannoza (MNE), D-melecytoza (MLZ), D-rafinoza (RAF), D-sorbitol (SOR), L-ramnoza (RHA), D-trehaloza (TRE); zdolność do hydrolizy żelatyny i eskuliny, wytwarzania indolu i ureazy oraz aktywność katalazy. W odczycie testu uwzględniane są również cechy morfologiczne: zdolność do wytwarzania spor, morfologia komórki oraz sposób barwienia metodą Grama. Identyfikację uzyskuje się z 8 cyfrowego profilu numerycznego, używając bazy danych z oprogramowania komputerowego Apiweb™. System API 20A służy jedynie do biochemicznej identyfikacji tych bakterii, które są włączone do bazy danych. Istnieje możliwość rozpoznawania 52 drobnoustrojów beztlenowo rosnących, identyfikacja jest więc mało precyzyjna. Dotyczy to głównie ziarenkowców, które są identyfikowane w większości przypadków, jako grupa *Peptostreptococcus* lub jako *Peptoniphilus asaccharolyticus* – jedyny gatunek GPAC istniejący w bazie danych. Opiswane bakterie na ogół nie fermentują węglowodanów. *P. asaccharolyticus* ma zdolność do generowania w warunkach *in vitro* indolu (zawarty w podłożu tryptofan za pośrednictwem tryptofanazy przekształcany jest w indol), co jest cechą wyróżniającą go w systemie API 20A. Jakość identyfikacji zależna jest od wartości procentowej identyfikacji: $\geq 99,9\%$ – wspaniała identyfikacja, $\geq 99,0\%$ – bardzo dobra identyfikacja, $\geq 90,0\%$ – dobra identyfikacja, $\geq 80,0\%$ – identyfikacja do akceptacji.

Vitek 2. Obecnie często stosowaną w laboratoriach metodą detekcji jest automatyczny system Vitek 2 (bioMérieux SA, Francja), w którym wykorzystuje się karty ANC, identyfikujące oprócz beztlencowców także maczugowce. Badanie może być wykonane w ciągu około 6 godzin, system nie wymaga generowania atmosfery beztlencowej. Podobnie jak w metodzie API 20 A, bardzo ważna jest duża gęstość zawiesiny bakteryjnej użyta do inokulacji karty ANC, około 2,7–3,3 McFarland'a. Karta zawiera 64 mikropróbki z 36 kolorymetrycznymi testami enzymatycznymi, z których 13 opartych jest na zdolności do fermentacji, 17 prezentuje aktywność glikozydazy i arylamidazy, 2 testy to reakcje alkaliczne oraz 4 inne reakcje biochemiczne. Badania przeprowadzone przez Lee i wsp. [19] wykazały, że Vitek 2 nieprecyzyjnie identyfikuje do poziomu gatunku. W badaniu 49 gatunków GPAC, za pomocą Vitek 2 błędnie zidentyfikowano do poziomu gatunku 77,6% badanych szczepów, a 36,7% poprawnie rozpoznano jedynie do poziomu rodzaju [19]. Nieprecyzyjna identyfikacja dotyczyła *P. harei* (100%). Gatunek ten z powodu podobieństwa fenotypowego również w pracy Velloo i wsp. [36] mylnie rozpoznawano, jako *Peptoniphilus asaccharoliticus*, co prowadzi do przeszacowania częstości izolacji z próbek materiałów klinicznych [36]. Identyfikacja szczepów klinicznych może być wykonana tylko wówczas, jeśli gatunki zostały zawarte w bazie danych, która obecnie nie zawiera pełnego spektrum ważnych klinicznie drobnoustrojów [19].

MALDI-TOF MS. Obecnie istnieje możliwość identyfikowania drobnoustrojów za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry), z systemem MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Niemcy). W odróżnieniu od wyżej wspomnianych metod do badania używa się jednej kolonii (10^5 CFU) wyhodowanego szczepu, która nanoszona jest na 96-dółkową metalową płytkę (Bruker Daltonics, Niemcy). Należy przygotować 1 μ l roztworu matrix [HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, HCCA, Bruker Daltonics, Niemcy) i 250 μ l stock solution. 1 ml stock solution zawiera: 475 μ l wody dejonizowanej, 25 μ l 100% kwasu trifluorooctowego [TFA] i 500 μ l acetonitrilu [ACN]. Roztwór matrix nanoszony jest na kolonię. Po wysuszeniu próbkę wprowadza się do komory pomiarowej aparatu i usuwa powietrze. Po uzyskaniu próżni wykonuje się właściwy pomiar. MALDI-TOF MS wykorzystuje laser gazowy N_2 pracujący impulsowo w zakresie nadfioletu ($\lambda = 337$ nm). Analiza oparta jest na jonizacji laserowej białek rybosomalnych. Pod wpływem promieni lasera białka bakteryjne ulegają desorpcji i jonizacji. Zjonizowane peptydy przyspieszane są w silnym polu elektrycznym, następnie ulegają rozdziałowi według masy cząsteczkowej, ładunku oraz

odmiennego czasu przelotu. Generowane jest widmo pików, które odpowiadają jonom o różnym stosunku masy do ładunku. Na Rys.1 przedstawiono widma wybranych GPAC. Zasada działania tej metody polega na automatycznym porównaniu otrzymanego widma z widmami referencyjnymi drobnoustrojów zapisanymi w bazie danych. Zgodnie z zaleceniami producenta wartość wskaźnika w zakresie 2,300–3,000 wskazuje na wiarygodną identyfikację do poziomu gatunku. Zakres 2,000–2,299 wiarygodnie identyfikuje drobnoustrój do poziomu rodzaju oraz wykazuje prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu gatunku; 1,700–1,999 wskazuje na prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu rodzaju, natomiast wartość poniżej 1,699 oceniana jest jako wynik niewiarygodny. Metoda ta umożliwia przeprowadzenie wiarygodnej identyfikacji w ciągu kilku minut dla pojedynczej próbki badanej lub w ciągu około 1,5 godziny dla płytki z 96 próbkami [16, 35]. W Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM przeprowadzono porównanie metod identyfikacji GPAC metodą Api 20A i MALDI-TOF MS (tabela I) [16]. Zidentyfikowano 15 gatunków ziarenkowców Gram-dodatnich i przy tak małej puli szczepów badanych, dzięki spektrometrii masowej, wykryto trzy gatunki *Fingoldia magna*. Jak wiadomo z piśmiennictwa, drobnoustrój ten jest szczególnie istotny w chorobach infekcyjnych [3, 22, 26].

Chromatografia gazowo-cieczowa (GLC). Analiza metodą chromatografii gazowej (GLC) została po raz pierwszy zastosowana w latach 70-tych do celów taksonomicznych. Następnie adoptowano ją i przez wiele lat stosowano jako metodę identyfikacji bakterii beztlencowych w laboratoriach na całym świecie. Analiza umożliwiała detekcję kwasów tłuszczowych np.: kwasu octowego, propionowego, masłowego, izomasłowego, walerianowego, izowalerianowego, izokapronowego oraz alkoholi wytwarzanych przez bakterie beztlencowe w hodowli na podłożach sztucznych oraz w hodowli krwi. Metoda ta umożliwiała klasyfikację Gram-dodatnich beztlencowców do grup: octanowej, masłowej, kapronowej. W grupie octowej znalazły się gatunki wytwarzające kwas octowy oraz nie wytwarzające lotnych kwasów tłuszczowych (VFA), do grupy masłowej natomiast zaliczono gatunki oraz nierozpoznane grupy GPAC wytwarzające kwas masłowy, natomiast do grupy kapronowej – gatunki, które produkują duże ilości długołańcuchowych lotnych kwasów tłuszczowych [22, 27]. W badaniu Murdoch i wsp. [23] analizowano 256 klinicznych szczepów GPAC i sklasyfikowano je do 5 grup na podstawie produkcji kwasów tłuszczowych. Wykazano, że blisko 44% szczepów zaliczono do grupy VFA-ujemnych, tj. nie wytwarzających kwasów tłuszczowych w ilości umożliwiających detekcję [23]. Metoda ta dość kosztowna i czasochłonna okazała się



Rys. 1. Widma uzyskane przez bezpośrednią analizę poszczególnych GPAC metodą MALDI-TOF MS w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej, WUM

nieprecyzyjna w rozpoznawaniu części bakterii beztlenowych, zwłaszcza GPAC.

4.3. Identyfikacja genotypowa

Technikę wykrywania sekwencji kwasów nukleinowych wprowadzono w latach 80-tych. Umożliwiła ona dokładniejszą klasyfikację drobnoustrojów. Oprócz przydatności taksonomicznej zyskała także znaczenie w laboratoriach klinicznych. Powszechnie stosowana jest łańcuchowa reakcja polimerazy PCR i jej modyfikacje (multiplex PCR, hybrydyzacja, hybrydyzacja *in situ* FISH), które skracają czas oczekiwania na wiarygodny wynik i redukują koszty analizy [29]. Niewątpliwie „złotym standardem” w identyfikowaniu gatunków GPAC

jest obecnie metoda oparta na podobieństwie w sekwencji genu kodującego 16S rRNA. Gen występuje u wszystkich bakterii i jest wysoce konserwatywny. W genie tym występują gatunkowo zmienne regiony, co warunkuje różnicę pomiędzy rodzajami i gatunkami drobnoustrojów. Metoda 16S rRNA pozwala na badanie różnorodności drobnoustrojów. 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 za pomocą oprogramowania ARB [28, 35, 38].

Tabela I

Porównanie metod identyfikacji Gram-dodatnich ziarenkowców beztlenowych: MALDI-TOF MS i Api 20A [16]

Rodzaj próbki	Identyfikacja				
	MALDI-TOF MS		Api20A		
	gatunek	wskaźnik	gatunek/grupa	profil numeryczny	%
Wymaz ze skóry prącia	<i>F. magna</i>	2,163	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Wymaz z owrzodzenia	<i>F. magna</i>	2,226	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Wymaz z rany	<i>F. magna</i>	1,863	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Błona maziowa	<i>P. harei</i>	1,953	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Fragment tkanki kostnej	<i>P. harei</i>	1,903	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Zeskrobiny z j.szpikowej	<i>P. harei</i>	2,106	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Wymaz z przetoki	<i>P. harei</i>	2,104	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Wymaz z kanału szyjki macicy	<i>P. harei</i>	1,985	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Wymaz z rany	<i>P. harei</i>	1,937	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Wymaz z rany	<i>P. harei</i>	2,044	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
fragment tkanki kostnej	<i>P. harei</i>	2,106	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Wymaz z rany	<i>P. anaerobius</i>	2,148	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Wymaz z rany	<i>P. anaerobius</i>	1,899	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Wymaz z owrzodzenia	<i>P. anaerobius</i>	1,834	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6
Wymaz z owrzodzenia	<i>P. anaerobius</i>	2,227	grupa <i>Peptostreptococcus</i>	00000006	89,6

5. Podsumowanie

Gram-dodatnie ziarenkowce kolonizują skórę i błony śluzowe. W piśmiennictwie coraz częściej prezentowane są doniesienia podkreślające udział GPAC w zakażeniach. Jednocześnie wzrasta częstość izolacji tych bakterii z materiałów klinicznych. Do najważniejszych GPAC, izolowanych z próbek materiałów klinicznych, należą rodzaje: *Peptostreptococcus*, *Finnegoldia*, *Parvimonas*, *Anaerococcus* i *Peptoniphilus*.

F. magna wydaje się być najbardziej zjadliwym gatunkiem. Posiada czynniki chorobotwórczości podobne do tych wytwarzanych przez chorobotwórcze, tlenowo rosnące gronkowce i paciorkowce. Istnieje więc potrzeba precyzyjnej identyfikacji izolowanych szczepów oraz poznanie ich czynników wirulencji. Na szczególną uwagę zasługuje możliwość identyfikacji drobnoustrojów do poziomu gatunku za pomocą spektrometru masowego MALDI-TOF MS w laboratoriach mikrobiologicznych. Metody genotypowe, w tym sekwencjonowanie genów są szczególnie przydatne do charakterystyki nowych gatunków. Wydzielenie nowych taksonów GPAC oparte jest na wykazaniu różnic w sekwencjach genomu. Stosując metodę 16S rRNA uporządkowano dotychczasową systematykę, wykluczając niepotrzebne powtórzenia, gdyż niektóre gatunki opisane były pod różnymi nazwami i należały do odrębnych taksonów.

Obecnie coraz szerzej dostępne stają się metody sekwencjonowania „nowej generacji”, które umożliwiają w krótkim czasie sekwencjonowanie całego genomu bakterii, w przyszłości być może z powodzeniem zastą-

pią inne metody molekularne. Niestety nawet najdoskonalsze techniki molekularne nie są w stanie uchronić nas przed błędami, które mogą pojawić się na każdym etapie badania, począwszy od pobrania materiału. Unikanie błędów w trakcie wykonywania badania, ściśle przestrzeganie procedur oraz właściwa interpretacja wyniku wydają się stanowić klucz do sukcesu w diagnostyce zakażeń, nie tylko beztlenowcami.

Piśmiennictwo

1. Björck L.: Protein L, a novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig chains. *J. Immunol.* **140**, 1194–1197 (1988)
2. Boyanova L., Djambazov V., Gergova G., Iotov D., Petrov D., Osmanliev D., Minchev Z., Mitov I.: Anaerobic microbiology in 198 cases of pleural empyema: a Bulgarian study. *Anaerobe*, **10**, 261–267 (2004)
3. Brazier J.S., Hall V., Morris T.E., Gal M., Duerden B.I.: Antibiotic susceptibilities of Gram-positive anaerobic cocci: results of a sentinel study in England and Wales. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 224–228 (2003)
4. de Château M., Björck L.: Protein PAB, a mosaic albumin-binding bacterial protein representing the first contemporary example of module shuffling. *J. Biol. Chem.* **269**, 12147–12151 (1994)
5. de Château M., Holst E., Björck L.: Protein PAB, an albumin-binding bacterial surface protein promoting growth and virulence. *J. Biol. Chem.* **271**, 26609–26615 (1996)
6. Donelli G., Vuotto C., Cardines R., Mastrantonio P.: Biofilm-growing intestinal anaerobic bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 318–325 (2012)
7. Ezaki T., Li N., Hashimoto Y., Miura H., Yamamoto H.: 16S ribosomal DNA sequences of anaerobic cocci and proposal *Ruminococcus hansenii* comb. nov. and *Ruminococcus productus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 130–136 (1994)

8. Ezaki T., Kawamura Y., Li N., Li Z.Y., Zhao L., Shu S.: Proposal of the genera *Anaerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Galicolla* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1521–1528 (2001)
9. Ezaki T., Yamamoto N., Ninomiya K., Suzuki S., Yabuuchi E.: Transfer of *Peptococcus indolicus*, *Peptococcus asaccharolyticus*, *Peptococcus prevotii*, and *Peptococcus magnus* to the genus *Peptostreptococcus* and proposal of *Peptostreptococcus tetradius* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 683–698 (1983)
10. Fournier P.E., La M.V., Casalta J.P., Richet H., Collart F., Raoult D.: *Finegoldia magna*, an early post-operative cause of infectious endocarditis: report of two cases and review of the literature. *Anaerobe*, **14**, 310–312 (2008)
11. Frick I.M., Karlsson C., Mörgelin M., Olin A.I., Janjusevic R., Hammarström C., Holst E., de Château M., Björck L.: Identification of a novel protein promoting the colonization and survival of *Finegoldia magna*, a bacterial commensal and opportunistic pathogen. *Mol. Microbiol.* **70**, 695–708 (2008)
12. Graille M., Stura E.A., Housden N.G., Beckingham J.A., Bottomley S.P., Beale D., Taussig M.J., Sutton B.J., Gore M.G., Charbonnier J.B.: Complex between *Peptostreptococcus magnus* protein L and a human antibody reveals structural convergence in the interaction modes of Fab binding proteins. *Structure*, **9**, 679–687 (2001)
13. 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)
14. Karlsson C., Eliasson M., Olin A.I., Mörgelin M., Karlsson A., Malmsten M., Egesten A., Frick I.M.: SufA of the opportunistic pathogen *Finegoldia magna* modulates actions of the antibacterial chemokine MIG/CXCL9, promoting bacterial survival during epithelial inflammation. *J. Biol. Chem.* **284**, 29499–29508 (2009)
15. Karlsson C., Mörgelin M., Collin M., Lood R., Andersson M., Schmidtchen A., Björck L., Frick I.M.: SufA – a bacterial enzyme that cleaves fibrinogen and blocks fibrin network formation. *Microbiology*, **155**, 238–248 (2009)
16. 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)
17. Kierzkowska M., Majewska A., Sawicka-Grzelak A., Młynarczyk A., Ładomirska-Pestkowska K., Młynarczyk G.: Specyfika zakażeń bakteriami beztlenowymi na oddziałach chirurgicznych i ortopedycznych. *Med. Dośw. Mikrobiol.* **64**, 29–34 (2012)
18. Krepel C.J., Gohr C.M., Edmiston C.E., Farmer S.G.: Anaerobic pathogenesis: collagenase production by *Peptostreptococcus magnus* and its relationship to site of infection. *J. Infect. Dis.* **163**, 1148–1150 (1991)
19. 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)
20. Liu C., Finegold S.M., Song Y., Lawson P.A.: Reclassification of *Clostridium coccoides*, *Ruminococcus hansenii*, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*, *Ruminococcus luti*, *Ruminococcus productus* and *Ruminococcus schinkii* as *Blautia coccoides* gen. nov., comb. nov., *Blautia hansenii* comb. nov., *Blautia hydrogenotrophica* comb. nov., *Blautia luti* comb. nov., *Blautia producta* comb. nov., *Blautia schinkii* comb. nov. and description of *Blautia wexlerae* sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**, 1896–1902 (2008)
21. Mikamo H., Yokoyama T. i wsp.: Chapter 1–1. Anaerobic infections (General): epidemiology of anaerobic infections. *J. Infect. Chemother.* **17**, Suppl. 1, 4–12 (2011)
22. Murdoch D.A.: Gram-positive anaerobic cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 81–120 (1998)
23. Murdoch A., Mitchelmore I.J.: The laboratory identification of gram-positive anaerobic cocci. *J. Med. Microbiol.* **34**, 295–308 (1991)
24. Murdoch D.A., Shah H.N.: Reclassification of *Peptostreptococcus magnus* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972 as *Finegoldia magna* comb. nov. and *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) Smith 1957 as *Micromonas micros* comb. nov. *Anaerobe*, **5**, 555–559 (1999)
25. Murphy E.C., Frick I.M.: Gram-positive anaerobic cocci – commensals and opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* doi: 10.1111/1574-6976.12005, 1–34 (2012)
26. Rosenthal M.E., Rojzman A.D., Frank E.: *Finegoldia magna* (formerly *Peptostreptococcus magnus*): an overlooked etiology for toxic shock syndrome? *Med. Hypotheses*, **79**, 138–140 (2012)
27. Sondag J.E., Ali M., Murray P.R.: Rapid presumptive identification of anaerobes in blood cultures by gas-liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **11**, 274–277 (1980)
28. Song Y., Liu C., McTeague M., Finegold S.M.: 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant Gram-positive anaerobic cocci. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1363–1369 (2003)
29. Song Y., Liu C., McTeague M., Vu A., Liu J.Y., Finegold S.M.: Rapid identification of Gram-positive anaerobic coccal species originally classified in the genus *Peptostreptococcus* by multiplex PCR assays using genus- and species-specific primers. *Microbiology*, **149**, 1719–1727 (2003)
30. Stephens P., Wall I.B., Wilson M.J., Hill K.E., Davies C.E., Hill C.M., Harding K.G., Thomas D.W.: Anaerobic cocci populating the deep tissues of chronic wounds impair cellular wound healing responses in vitro. *Br. J. Dermatol.* **148**, 456–466 (2003)
31. Tindall B.J., Euzéby J.P.: Proposal of *Parvimonas* gen. nov. and *Quatronicoccus* gen. nov. as replacements for the illegitimate, prokaryotic, generic names *Micromonas* Murdoch and Shah 2000 and *Quadricoccus* Maszenan et al. 2002, respectively. *Int. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 2711–2713 (2006)
32. Ueki A., Abe K., Suzuki D., Kaku N., Watanabe K., Ueki K.: *Anaerosphaera aminiphila* gen. nov., sp. nov., a glutamate-degrading, Gram-positive anaerobic coccus isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 3161–3167 (2009)
33. Ulger-Toprak N., Liu C., Summanen P.H., Finegold S.M.: *Murdochella asaccharolytica* gen. nov., sp. nov., a Gram-stain-positive, anaerobic coccus isolated from human wound specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1013–1016 (2010)
34. Veillon A.: Sur un microcococque anaérobie trouvé dans des suppurations fétide. *CR Soc. Seances Soc. Biol. Fil.* **45**, 807–809 (1893)
35. 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)
36. Veloo A.C.M., Welling G.W., Degener J.E.: Mistaken identity of *Peptoniphilus asaccharolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1189 (2011)
37. Wall I.B., Davies C.E., Hill K.E., Wilson M.J., Stephens P., Harding K.G., Thomas D.W.: Potential role of anaerobic cocci in impaired human wound healing. *Wound Repair Regen.* **10**, 346–353 (2002)
38. 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)
39. Żabicka D., Literacka E.: Nowoczesne metody wykrywania i identyfikacji bakterii. *Forum Zakażeń*, **4**, 65–72 (2013)