

MASARYKOVA UNIVERZITA

Lékařská fakulta



STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM U ANAEROBNĚ
ROSTOUCÍCH BAKTERIÍ, PROFIL CITLIVOSTI ANAEROBŮ
ZACHYCENÝCH VE FN BRNO V ROCE 2018

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Kateřina Zettlová

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Petra Kubáčková

FN Brno, Oddělení klinické mikrobiologie

Brno 2020

Bibliografický záznam

Jméno a příjmení autora: Kateřina Zettlová

Název bakalářské práce: Stanovení citlivosti k antibiotikům u anaerobně rostoucích bakterií, profil citlivosti anaerobů zachycených ve FN Brno v roce 2018

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Pracoviště: Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno

Vedoucí práce: MUDr. Petra Kubáčková

Rok obhajoby: 2020

Počet stran: 79

Klíčová slova: anaerobní bakterie, citlivost bakterií, ATB rezistence, MIC, E-test, antibiogram

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Bibliographic record

Author: Kateřina Zettlová

Title of Thesis: Antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, susceptibility profiles of anaerobes isolated in a University Hospital Brno in 2018.

Degree Programme: Laboratory diagnostic in healthcare

Department: Department of Clinical Microbiology, University Hospital Brno

Supervisor: MUDr. Petra Kubáčková

Year: 2020

Number of Pages: 79

Keywords: anaerobic bacteria, antimicrobial susceptibility testing, ATB resistance, MIC, E-test, antibiogram

Anotace

Anaerobní bakterie hrají významnou roli v mikrobiomu člověka. Jsou přirozenou součástí dutiny ústní, gastrointestinálního a urogenitálního traktu, ale mohou také způsobovat závažné infekce původu endogenního či exogenního. Společným rysem těchto bakterií je především anaerobní způsob života, tedy neschopnost bakterií růst za přístupu vzduchu. S tím souvisí i náročnost a odlišné postupy při odběru, zpracování či kultivaci vzorků. S kultivační náročností jsou též spjaty odlišné postupy stanovení citlivosti anaerobních mikroorganismů k antimikrobiálním látkám, které mají klíčovou roli v úspěšnosti ATB terapie. Vzhledem k tomu, že kultivace anaerobů je déletrvající a účinnost ATB je kvůli celosvětově rostoucí rezistenci čím dál více nepředvídatelná, je pro včasnou ATB terapii nutné znát profil citlivosti anaerobů v konkrétní oblasti a zdravotnickém zařízení.

Práce má za cíl představit anaerobní bakterie, nastínit odlišnosti v diagnostice, a především popsat různé metody stanovení citlivosti k antibiotikům a poukázat na důležitost těchto metod pro klinickou praxi. Cílem praktické části je vyhodnotit profil citlivosti anaerobů k antibiotikům ve FN Brno a poskytnout tak užitečné informace pro klinické pracovníky při volbě empirické terapie.

Annotation

Anaerobic bacteria play an important role in human microbiome. They are naturally present in the oral cavity, gastrointestinal and urogenital tracts but can cause serious infections of endogenous or exogenous origin. What is common to these bacteria is their primarily anaerobic way of life, i.e. the inability of the bacteria to grow in an environment where oxygen is present. This explains the difficulty and different procedures needed for sampling, processing or cultivation of samples. These demands also influence the procedures used for determining the susceptibility of anaerobic microorganisms to antimicrobials, which play a key role in the success of ATB therapy. Because anaerobic cultivation takes some time and the effectiveness of ATB is getting more unpredictable due to increasing global resistance, it is necessary to know the susceptibility profile of anaerobes in a specific area and hospitals for timely ATB therapy.

This Thesis aims to introduce anaerobic bacteria, outline the differences in diagnosis, but above all describe the methods for determining susceptibility to antibiotics and point out the importance of these methods for clinical practice. The aim of the practical part is to evaluate the sensitivity profiles of anaerobes to antibiotics at the University Hospital Brno and thus provide useful information for clinicians regarding their choice of empirical therapy.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Petry Kubáčkové a uvedla v seznamu literatury všechny použité informační zdroje.

V Brně dne 30. dubna 2020

.....
Autor práce

Poděkování autora

Ráda bych poděkovala MUDr. Kubáčkové za odborné vedení práce, ochotu, cenné rady a podnětné připomínky, které pro mě byly přínosem. Mé poděkování patří též MUDr. Hansliánové, primářce Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno.

Seznam pojmů a zkratek

AMC	Amoxicilin + klavulanová kyselina
ATB	Antimikrobiální látka, antibiotikum
BP	Break Point – hraniční hodnota hladiny antibiotika, které lze dosáhnout v séru
CFU	Colony Forming Unit – jednotka tvořící kolonii
CIP	Ciprofloxacin
CLI	Klindamycin
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute
CMP	Chloramfenikol
CNS	Centrální nervový systém
CTX	Cefotaxim
DD	Diagnostické disky
DDT	Diskový difúzní test
EUCAST	The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
IZ	Inhibiční zóna
MER	Meropenem
MIC	Minimální inhibiční koncentrace antibiotika
MTR	Metronidazol
PEN	Penicilin
TET	Tetracyklin
VAN	Vankomycin

Obsah

Seznam pojmů a zkratk.....	- 8 -
1. ÚVOD	- 11 -
2. ANAEROBNÍ BAKTERIE.....	- 12 -
2.1. Gramnegativní anaerobní tyčinky a vlákna	- 13 -
2.1.1. Rod <i>Bacteroides</i>	- 13 -
2.1.2. Rod <i>Prevotella</i>	- 13 -
2.1.3. Rod <i>Fusobacterium</i>	- 14 -
2.2. Gramnegativní anaerobní koky.....	- 14 -
2.2.1. Rod <i>Veillonella</i>	- 14 -
2.3. Grampozitivní nesporulující anaerobní tyčinky a vlákna	- 14 -
2.3.1. Rod <i>Actinomyces</i>	- 14 -
2.3.2. Rod <i>Propionibacterium</i>	- 15 -
2.3.3. Rody <i>Bifidobacterium</i> a <i>Eubacterium</i>	- 15 -
2.4. Grampozitivní nesporulující anaerobní koky	- 16 -
2.4.1. Rody <i>Peptostreptococcus</i> a <i>Peptococcus</i>	- 16 -
2.5. Grampozitivní sporulující anaerobní tyčinky	- 16 -
2.5.1. Rod <i>Clostridium</i>	- 16 -
3. DIAGNOSTIKA ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ.....	- 19 -
3.1. Odběr a transport materiálu	- 19 -
3.2. Mikroskopie.....	- 20 -
3.3. Kultivace.....	- 22 -
3.3.1. Metody dosažení anaerobiózy.....	- 22 -
3.3.2. Kultivační půdy.....	- 23 -
3.4. Identifikace	- 24 -
3.4.1. Identifikace pomocí ATB diagnostických disků.....	- 24 -
3.4.2. Biochemická identifikace.....	- 24 -
3.4.3. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	- 25 -
4. STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM.....	- 26 -
4.1. Kvantitativní metody	- 27 -
4.1.1. Mikrodiluční metoda.....	- 27 -
4.1.2. Agarová diluční metoda.....	- 28 -
4.2. Kvalitativní metody	- 29 -
4.3. Kombinované metody.....	- 30 -
4.3.1. E-test.....	- 30 -

5. MONITORING VZRŮSTAJÍCÍ REZISTENCE, PŘÍNOS V ATB TERAPII	- 32 -
5.1. Monitoring citlivosti ve zdravotnickém zařízení	- 33 -
6. PRAKTICKÁ ČÁST – PROFIL CITLIVOST ANAEROBŮ ZACHYCENÝCH VE FN BRNO V ROCE 2018	- 34 -
6.1. Cíl práce.....	- 34 -
6.2. Metodika.....	- 34 -
6.3. Zpracování výsledků.....	- 34 -
6.3.1. Anaerobní bakterie rodu <i>Bacteroides</i> , profil citlivosti k ATB.....	- 35 -
6.3.2. Anaerobní bakterie rodu <i>Prevotella</i> , profil citlivosti k ATB	- 39 -
6.3.3. Anaerobní bakterie rodu <i>Fusobacterium</i> , profil citlivosti k ATB.....	- 43 -
6.3.4. Anaerobní bakterie rodu <i>Veillonella</i> , profil citlivosti k ATB	- 47 -
6.3.5. Anaerobní bakterie rodu <i>Peptostreptococcus</i> , profil citlivosti k ATB	- 50 -
6.3.6. Anaerobní bakterie rodu <i>Peptococcus</i> , profil citlivosti k ATB.....	- 54 -
6.3.7. Anaerobní bakterie rodu <i>Propionibacterium</i> , profil citlivosti k ATB	- 56 -
6.3.8. Anaerobní bakterie rodu <i>Actinomyces</i> , profil citlivosti k ATB.....	- 60 -
6.3.9. Anaerobní bakterie rodu <i>Clostridium</i> , profil citlivosti k ATB.....	- 64 -
7. ZÁVĚR.....	- 68 -
8. DISKUZE.....	- 71 -
Seznam obrázků, tabulek a grafů.....	- 73 -
Přílohy	- 75 -
Seznam použité literatury	- 76 -
Zdroje obrázků.....	- 79 -

1. ÚVOD

Anaerobní bakterie tvoří významnou část lidského mikrobiomu. Jsou přirozenou součástí dutiny ústní, gastrointestinálního a urogenitálního traktu, ale mohou také způsobovat závažné infekce původu endogenního či exogenního. Společným rysem těchto bakterií je především anaerobní způsob života, tedy neschopnost bakterií růst za přístupu vzduchu. S tím souvisí i náročnost a odlišné postupy při odběru, zpracování či kultivaci vzorků. Správný odběr biologického materiálu a adekvátní manipulace se vzorky během diagnostického procesu jsou prvním předpokladem k odhalení anaerobů ve vzorku a následné úspěšnosti ATB terapie. V úspěšnosti ATB terapie má klíčovou roli také stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám. Tyto metody jsou neoddělitelně spjaté s kultivací, při které je nezbytné anaerobům zajistit přirozené podmínky pro růst, tedy anaerobní prostředí (anaerobní box, anaerostat) či nízký redoxní potenciál kultivačních půd. Testování citlivosti je prováděno různými metodami – kvantitativními (agarová diluční metoda, mikrodiluční metoda), kvalitativními (diskový difúzní test) či kombinovanými (E-test). Cílem těchto metod je stanovit tzv. minimální inhibiční koncentraci antibiotika, tedy koncentraci, která je schopna inhibovat růst bakterií. Výsledky jsou následně porovnány s tzv. break pointy, které mají odhalit, zda je daný mikrob na ATB citlivý či rezistentní. Break pointy (stanovované různými společnostmi – CLSI, EUCAST) se mohou lišit a metody provedení testů v různých laboratořích se mohou lišit také. Interpretace a porovnávání výsledků může být tedy mnohdy obtížné.

Výsledky poskytované metodami stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám mají velký význam nejen při cílené antibiotické terapii u konkrétního pacienta, ale také mohou poskytovat cenné informace pro zvolení nejvhodnější empirické léčby. Vzhledem k tomu, že kultivace anaerobů je déletrvající a účinnost ATB je kvůli celosvětově rostoucí rezistenci čím dál více nepředvídatelná, je pro včasnou ATB terapii nutné znát profil citlivosti anaerobů v konkrétní oblasti a zdravotnickém zařízení.

Práce má za cíl představit anaerobní bakterie, nastínit odlišnosti v diagnostice, a především popsat různé metody stanovení citlivosti k antibiotikům a poukázat na důležitost těchto metod pro klinickou praxi. Cílem praktické části je vyhodnotit profil citlivosti anaerobů k antibiotikům ve FN Brno a poskytnout tak užitečné informace pro klinické pracovníky při volbě empirické terapie.

2. ANAEROBNÍ BAKTERIE

Anaeroby jsou bakterie, které se vyznačují anoxibiotickým metabolismem a výraznou citlivostí ke kyslíku. Míra citlivosti se může lišit, ovšem růst bakterií v kontaktu se vzdušným kyslíkem za normálního atmosférického tlaku není umožněn [4]. Dle intenzity citlivosti ke kyslíku rozdělujeme anaeroby na striktní (<0,5 % kyslíku) či aerotolerantní (2–8 % kyslíku) [6]. Za příčinu citlivosti ke kyslíku je považována nepřítomnost enzymů oxidativního metabolismu (peroxidázy, katalázy, superoxiddismutasy aj.). Bakterie nejsou schopny neutralizovat vznikající kyslíkové radikály, a tudíž kontakt se vzdušným kyslíkem je pro ně letální [4]. Hlavním zdrojem energie anaerobů je anaerobní glykolýza neboli fermentace, jako akceptory elektronů bakterie využívají malé anorganické molekuly, např. nitráty [16].

Anaerobní bakterie můžeme dělit, kromě vztahu ke kyslíku, dle mnoha dalších parametrů – složení buněčné stěny (barvení dle Grama), morfologie či schopnosti vytvářet spory.

Nesporulující anaeroby jsou součástí běžné bakteriální mikroflóry lidského těla (dutiny ústní, gastrointestinálního či urogenitálního traktu), mohou se ovšem podílet i na vzniku endogenních infekcí. Tyto infekce nemusí být vyvolané pouze jedním původcem, ale i směsí nesporulujících anaerobů, která bývá někdy označována termínem „Veillonova flóra“. Podmínkou vzniku infekce je snížení oxidoredukčního potenciálu tkáně, které může být způsobeno např. poraněním, chirurgickým zákrokem, nádorem či poruchou krevního zásobení. Specifikem těchto infekcí je tvorba abscesů se zápachajícím hnisem, ovšem na základě klinického obrazu nedokážeme určit primárního původce infekce (kromě rodu *Actinomyces*). Mezi nesporulující anaeroby řadíme např. rody *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* aj. [4].

Naopak je tomu u sporulujících anaerobů, kde nám klinický obraz odhadnout původce infekce umožňuje. V klinickém materiálu nacházíme konkrétního původce infekce či jeho toxiny, o jeho roli v infekci není pochyb. Infekce jsou především exogenního původu. Mezi sporulující anaerobní bakterie řadíme zejména zástupce rodu *Clostridium* [4].

2.1. Gramnegativní anaerobní tyčinky a vlákna

2.1.1. Rod *Bacteroides*

Rod *Bacteroides* patří mezi striktně anaerobní, nesporulující gramnegativní bakterie. Jsou pleomorfního tvaru, nepohyblivé, často opouzdřené. Bakteroidy jsou součástí běžné mikroflóry sliznic horních dýchacích cest (v zubním plaku, kryptách tonzil), trávicího traktu (ve střevech) či vaginy [4]. Mohou se uplatňovat jako potenciální patogeny a způsobovat infekce endogenního původu, především v dutině břišní, malé pánvi, mediastinu, vagině a dutině ústní [23].

Rozeznáváme řadu druhů. Mezi nejvýznamnější zástupce patří *Bacteroides fragilis*, dále pak skupina jemu příbuzných druhů označována jako *Bacteroides fragilis group* – *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*, *B. ovatus*, *B. caccae* aj. [22].

Bakteroidy se kromě odolnosti vůči žlučovým kyselinám také vyznačují tvorbou beta-laktamáz, což může značně komplikovat léčbu. Tvorba β -laktamáz jim poskytuje přirozenou rezistenci vůči penicilinu či ampicilinu. Bohužel vzrůstá i rezistence k linkosamidům. Lékem volby může být např. metronidazol [5].

2.1.2. Rod *Prevotella*

Rod *Prevotella* je blízkým příbuzným rodu *Bacteroides*. Zahrnuje gramnegativní anaerobní nepohyblivé tyčky, které se vyznačují schopností fermentovat glukózu a vytvářet nápadně černě pigmentové kolonie bez fluorescence (na rozdíl od rodu *Porphyromonas*) [23]. Prevotely jsou běžnou součástí mikroflóry dutiny ústní, můžeme je též nalézt ve flóře vaginální či střevní. Řadíme je mezi oportunní patogeny, v rámci Veillonovy flóry se podílejí na infekcích horních cest dýchacích a způsobují např. angíny, sinusitidy či onemocnění paradontu. Rovněž produkují β -laktamázy. K léčbě se využívá např. linkomycin či klindamycin.

Klinicky významným druhem je především *Prevotella melaninogenica*, k dalším zástupcům patří např. *P. intermedia*, *P. bivia* či *P. denticola* [24].

2.1.3. Rod *Fusobacterium*

Fusobacteria řadíme k anaerobním gramnegativním bakteriím, rovněž velmi pleomorfním. Nejčastěji mají podobu vláken, na konci zašpičatělých, někdy uprostřed zduřelých [24]. Jsou součástí fyziologické bakteriální flóry sliznic orofaryngu, v menší míře se vyskytují i ve střevech a vagíně [5]. *Fusobacteria* se s dalšími bakteriemi spolupodílejí na řadě hnisavých infekcích. Mohou způsobovat aspirační a nekrotizující pneumonie, plicní abscesy, abscesy mediastina, sinusitidy, septické artritidy či vzácně osteomyelitidy. Charakteristickým znakem fusobacterií je produkce kyseliny máselné a jiných vesměs páchnoucích látek [22].

Nejčastěji zachyceným druhem je *Fusobacterium nucleatum*, mezi další zástupce řadíme např. *F. necrophorum*, *F. mortiferum*, *F. varium* aj. [23].

2.2. Gramnegativní anaerobní koky

2.2.1. Rod *Veillonella*

Rod *Veillonella* zahrnuje několik druhů drobných anaerobních gramnegativních koků, zpravidla uspořádaných do dvojic nebo menších shluků [23]. Díky svému vzhledu a uspořádání mohou imitovat gonokoky. Většina druhů náleží k běžné slizniční flóře dutiny ústní, nosohltanu, trávicího traktu či vaginy. Do tohoto rodu řadíme druhy *Veillonella alcalescens*, *V. parvula*, *V. atypica*, *V. criceti*, *V. dispar* aj. [24].

Veillonely se pravděpodobně mohou účastnit endogenních anaerobních infekcí způsobených smíšenou Veillonovou flórou v oblasti břicha, malé pánve, mediastina, vaginy či dutiny ústní. Prokázaným patogenem je *Veillonella parvula*, která bývá izolována jako samostatné agens z hemokultur při sepsích a endokarditidách [23, 24].

2.3. Grampozitivní nespořadující anaerobní tyčinky a vlákna

2.3.1. Rod *Actinomyces*

Rod *Actinomyces* zahrnuje grampozitivní pleomorfní bakterie, vytvářející charakteristická větvená vlákna ve tvaru písmene Y nebo V, připomínající mycelium hub. Aktinomycety jsou součástí fyziologické mikroflóry dutiny ústní, urogenitálního

či gastrointestinálního traktu. Rostou za anaerobních nebo mikroaerobních podmínek se zvýšeným obsahem oxidu uhličitého. Kultivace je dlouhá (5–14 dní) a náročná [23].

Bylo popsáno více než 30 druhů aktinomycet. Nejčastějším izolovaným druhem je *Actinomyces israelii*, kterého nacházíme u většiny klinických forem aktinomykózy [9]. Aktinomykóza je chronické infekční onemocnění projevující se tvorbou abscesů a píštělí, z nichž může vytékat hustý hnis s drúzami. Postihnout může v podstatě jakoukoliv část těla, nejčastěji rozlišujeme formu cervikofaciální, thorakální, abdominální či gynekologickou [4]. Aktinomykózu mohou kromě *A. israelii* vyvolat i jiné druhy, např. *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. meyeri* aj. Pro úspěšnou léčbu aktinomykóz je nezbytný chirurgický zákrok a následné podávání vysokých dávek penicilinu. Při dlouhodobé léčbě bývá penicilin nahrazován doxycyklinem, linkomycinem či klindamycinem [23].

2.3.2. Rod *Propionibacterium*

Propionibakterie jsou rod anaerobních grampozitivních tyčinek kyjovitého tvaru. Vyskytují se především v běžné mikroflóře kůže, můžeme je ovšem nalézt i v klinickém materiálu z dutiny ústní a nosohltanu, gastrointestinálního či urogenitálního traktu [23].

Klinicky nejvýznamnějším zástupcem je *Propionibacterium acnes*. Díky své schopnosti produkovat lipázy a štěpit triglyceridy produkované kožními žlázami, je jednou z příčin *acne vulgaris* (iuvenilis). K léčbě akné můžeme přispět, kromě čištění pleti, také lokálním podáním klindamycinu či využitím autovakcín [4].

Další zástupci jako např. *P. granulosum*, *P. avidum* se mohou účastnit polybakteriálních endogenních infekcí různého typu [23].

2.3.3. Rody *Bifidobacterium* a *Eubacterium*

Oba rody řadíme mezi anaerobní grampozitivní nesporelující tyčinky. Bifidobacteria se mohou na koncích větvit. Stejně jako většina anaerobů, jsou součástí běžné slizniční flóry dutiny ústní, zažívacího traktu a vaginy. Významnou roli hrají ve střevě, kde se podílejí na udržování mikrobiální homeostázy. Produkují látky, které zabraňují dalším potenciálně patogenním bakteriím se navázat na střevní sliznici či se pomnožit. Mikrobiální rovnováha bývá často narušena v důsledku antibiotické léčby, což může způsobovat nepříjemné průjemy [24]. Bifidobakterie a další prospěšné bakterie lze nalézt ve fermentovaných mléčných potravinách,

zejména jogurtech. Konzumací těchto produktů si tak můžeme střevní mikrobiom opět obnovit [3].

K rodu *Bifidobacterium* náleží *Bifidobacterium dentinum*, který se podílí převážně na tvorbě zubního kazu, dále pak endokarditidách. Mezi další zástupce tohoto rodu řadíme např. *B. longum*, *B. breve*. K eubakteriím řadíme *Eubacterium lentum*, *E. donatum* aj. [24].

2.4. Grampozitivní nesporulující anaerobní koky

2.4.1. Rody *Peptostreptococcus* a *Peptococcus*

Rody *Peptostreptococcus* a *Peptococcus* náleží mezi grampozitivní anaerobní koky, které mohou být uspořádány do shluku, dvojic, tetrad či krátkých řetízků. Hlavním zdrojem energie jsou pro ně peptidy. Vyskytují se jako komenzálové v dutině ústní, trávicím traktu či vagíně. Řadíme je mezi oportunní patogeny, infekci vyvolají mimo místo svého běžného výskytu. Součástí tzv. Veillonovy mikroflóry se spolupodílí na smíšených endogenních infekcích, samostatně vyvolávají infekci jen výjimečně [24]. V dutině břišní se podílejí na rozvoji peritonitidy a vzniku abscesů, v dutině ústní mohou způsobit periodontitidu či peritonsilární abscesy. Peptostreptokoky rovněž mohou vyvolávat poporodní endometritidy a další infekce v malé pánvi nebo infekce ran a kloubů [23].

Mezi zástupce rodu *Peptostreptococcus* patří *Peptostreptococcus anaerobius*, *P. magnus*, *P. micros*, *P. vaginalis*. Klinicky významným zástupcem rodu *Peptococcus* je např. *Peptococcus niger*. K léčbě se u anaerobních grampozitivních koků využívají β -laktamová antibiotika, klindamycin či metronidazol. Důležité je ovšem nejprve vyřešit primární příčinu infekce a ložisko chirurgicky vyčistit. [24].

2.5. Grampozitivní sporulující anaerobní tyčinky

2.5.1. Rod *Clostridium*

Rod *Clostridium* zahrnuje velké množství převážně anaerobních grampozitivních tyčinek. Některé druhy však mohou být, díky produkci enzymů neutralizujících kyslíkové radikály, tzv. aerotolerantní (např. *Clostridium tertium*, *Clostridium histolyticum*). Klostridie se vyskytují ve fyziologické mikroflóře gastrointestinálního traktu zvířat i lidí [17]. Jsou charakteristické schopností vytvářet klidová stádia, tzv. spory, které jim umožňují odolávat nepříznivým podmínkám prostředí a kontaminovat tak půdu, vodu či potraviny. Endospora

může být umístěna uvnitř vegetativní formy terminálně (*C. tetani*), subterminálně (*C. botulinum*) nebo centrálně (*C. novyi*). Umístění je druhově specifické [23]. V přírodě se vyskytují převážně jako saprofyty, ovšem některé druhy jsou významnými lidskými patogeny. Mezi klinicky významné zástupce řadíme *Clostridium tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. difficile*, jejichž společným znakem je produkce toxinů [17].

Clostridium tetani je grampozitivní pohyblivá tyčka, produkující ve svém vegetativním stádiu dva typy toxinů – tetanolyzin a tetanospasmin. Neurotoxin tetanospasmin je příčinou klinických příznaků onemocnění zvaného tetanus, především tedy tonicko-klonických křečí kosterního svalstva. Nákaza probíhá zanesením spor do rány, nejčastěji cizím tělesem. Branou infekce mohou být také rány operační, bércové vředy či pouze drobné ranky. Spory v ráně následně za anaerobních podmínek vyklíčí a začnou produkovat toxiny, které mohou ireverzibilně narušit funkci CNS. Prevencí onemocnění je očkování, které je v České republice povinné. Léčba tetanu je velice komplexní. Co se týče antibiotické terapie, lékem volby je metronidazol či penicilin [5].

Clostridium botulinum je bakterie známá jako původce botulismu. Klostridie jsou součástí běžné mikroflóry gastrointestinálního traktu zvířat, odkud se mohou dostávat do vnějšího prostředí a svými sporami kontaminovat např. půdu a na ní pěstované plodiny. Spory jsou vysoce odolné. Při nesprávném zpracování kontaminovaných plodin, zvířecích střívek nebo masa (uzenářství) či nedostatečné sterilizaci konzerv, může za anaerobních podmínek dojít k uvolnění neurotoxinu tzv. botulotoxinu. Rozlišujeme 7 typů botulotoxinu (A–G), které se liší svou antigenní strukturou a místem výskytu. Toxiny zabraňují přenosu nervových vzruchů, což vede k postupnému ochrnutí veškerého svalstva a následné smrti. I když botulotoxiny patří mezi nejtoxičtější přírodní látky na světě, své využití získaly např. v estetické medicíně [5].

Z klinického materiálu je nejčastěji izolován druh *Clostridium perfringens*. Klostridie jsou komenzálové trávicího traktu zvířat a lidí, mohou ovšem též způsobovat infekce měkkých tkání či otravy z potravin tzv. enterotoxikózy. K rozvoji infekce dochází především po kontaminaci ran půdou, prachem, cizími předměty či stolicí obsahující klostridiové spory. Spory za anaerobních podmínek vyklíčí a začnou produkovat celou řadu toxinů (typ A–E). Nejvýznamnějším toxinem je toxin alfa (fosfolipasa C), který způsobuje lýzu eukaryotických buněk. Dále dochází k produkci toxických enzymů (proteasy, hyaluronidasy aj.), které se podílí na tvorbě plynu a klostridiím umožňují snáze pronikat tkání. Nejzávažnější infekcí je tzv. klostridiová myonekróza neboli plynatá sněť [24].

C. difficile můžeme nalézt ve střevech přibližně u 5 % zdravé populace (častěji u dětí). Patogenita bakterií je spojena především s podáváním antibiotik (klindamycin, amoxicilin, cefoxitin aj.), které potlačí běžnou bakteriální flóru střev a umožní tak přemnožení klostridií. Klostridie též produkují toxiny. Toxin A (enterotoxin), poškozující buňky střevního epitelu a způsobující hromadění tekutiny ve střevech, a toxin B (cytotoxin), který vede k nekróze postižených tkání. Mezi klinické projevy patří především vodnaté až krvácivé průjmy. U vážných případů může dojít k rozvoji tzv. pseudomembranózní kolitidy nebo enterokolitidy. Díky schopnosti spor odolávat vlivům vnějšího prostředí i dezinfekčním prostředkům a snadno se šířit, patří *C. difficile* mezi významné nosokomiální patogeny. V antibiotické terapii volíme metronidazol či perorálně podávaný vankomycin [24].

3. DIAGNOSTIKA ANAEROBNÍCH BAKTERIÍ

3.1. Odběr a transport materiálu

Správný odběr biologického materiálu a jeho adekvátní transport do laboratoře je prvním a velmi důležitým krokem k vydání spolehlivého výsledku bakteriologického vyšetření. Pro úspěšnost záchytu patogenů je zapotřebí dodržovat určitá pravidla pro odběr vzorků. Důležité je např. dbát na vhodnost místa odběru, metody odběru (sterilně), načasování odběru (před podáním ATB) či na dostatečné množství vzorku. Mezi vyšetřovaný materiál na přítomnost anaerobů řadíme výpotek, hnis, punktát, exsudát, nekrotickou tkáň, výtěry a stěry ran aj. Největší význam pro vyšetření anaerobů má tekutý vzorek, odebraný sterilně (kontaminace okolní bakteriální flórou by mohla ovlivnit kultivaci anaerobů) a z hloubi infekčního ložiska. Nutností je především zamezit přístupu vzduchu k odebranému materiálu. Tekutý materiál je odebírán do stříkačky, ze které je pístem vytlačěn vzduch, jehla zapíchnuta do gumové zátky/kombizátky, a tím zajištěno zamezení přístupu vzduchu a možné znehodnocení bakterií. Výtěry a stěry z ran jsou prováděny pomocí sterilního tamponu a následně uloženy do transportního média (např. AMIES) či zkumavky s CO₂. Dobu transportu do laboratoře je potřeba zkrátit na minimum. Pokud transport není možný ihned, uchováváme vzorky při pokojové teplotě, nejdéle však do 24 hod. Poněkud odlišný postup odběru a uchovávání má např. *Clostridium difficile* při požadavku na průkaz toxinů. Odebírána je stolice velikosti lískového ořechu do zkumavky s lopatkou. Při odběru není nutné dbát na sterilitu, do transportu však musí být vzorek uchováván v lednici. Společně s odebraným materiálem je též nutné zaslat i správně vyplněnou žádanku/průvodní list [13, 14, 15].

3.2. Mikroskopie

Nejrychlejší a nejjednodušší metodou přímého průkazu je mikroskopie. Tato rychlá metoda rozlišení bakterií umožňuje alespoň nasazení empirické léčby u vážných infekcí. V běžné praxi je k předběžné diagnostice využíván světelný mikroskop. Vzhledem k morfologické různorodosti má mikroskopie u anaerobů větší význam než u aerobů. Z tekutého klinického materiálu je zhotoven barevný preparát, nejčastěji dle Grama. Gramovo barvení je základní barvení v bakteriologii, které dle složení a barvitelnosti buněčné stěny rozděluje bakterie na dvě základní taxonomické skupiny: bakterie grampozitivní (modré) a gramnegativní (červené). Můžeme se však setkat i s útvary, které se barví špatně či vůbec. Metoda též umožňuje vizualizovat jejich tvar, velikost a uspořádání. Anatomická i chemická odlišnost má na vlastnosti bakterií velký vliv, včetně jejich citlivosti na antibiotika.

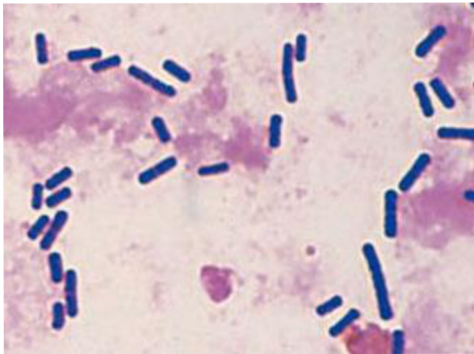
Postup barvení dle Grama:

Gram I	20 sekund
Lugolův roztok	20 sekund
Oplach vodou	
Odbarvení alkoholem	20 sekund
Safranin	60 sekund
Oplach vodou a osušení	

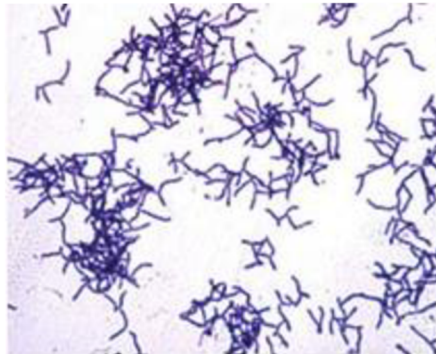
Před barvením preparátu je nejprve potřeba provést fixaci naneseného biologického materiálu na sklíčko, a to fyzikálně (teplem) či chemicky (metanolem). Principem barvení dle Grama je obarvení buňky Gramovým roztokem I (směsí krystalové violeti se šťavelanem amonným) modře a následné moření Lugolovým roztokem. V bakteriálních buňkách tak vzniká komplex krystalové violeti a jódu, který u G⁺ bakterií díky silné vrstvě peptidoglykanu přetrvává i po promytí alkoholem. Grampozitivní bakterie tak zůstávají zbarveny do modra. U gramnegativních bakterií se naopak tento komplex působením alkoholu snadno vyplaví, následně jsou bakterie dobarveny červeným safraninem [13, 14].

Mikroskopické preparáty vybraných anaerobů

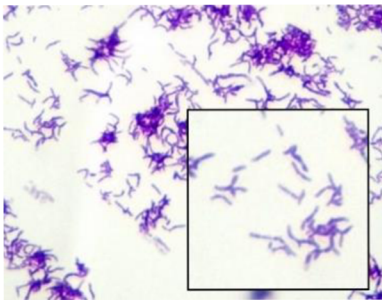
Grampozitivní bakterie



Obrázek 1: *Clostridium perfringens* [31]

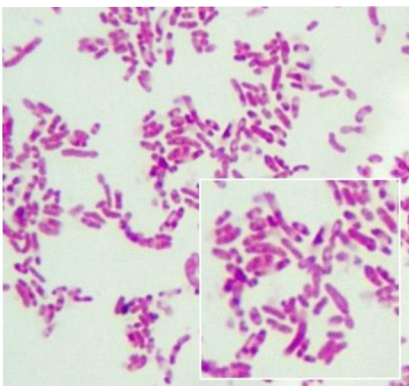


Obrázek 2: *Actinomyces israelii* [27]

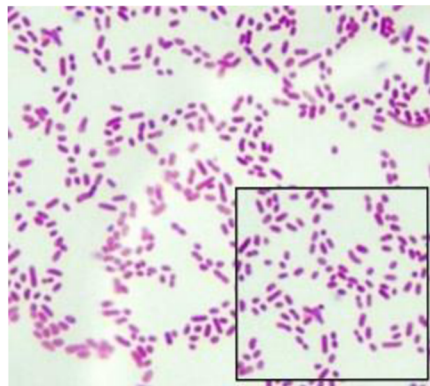


Obrázek 3: *Propionibacterium acnes* [35]

Gramnegativní bakterie



Obrázek 4: *Bacteroides fragilis* [30]



Obrázek 5: *Prevotella intermedia* [34]

3.3. Kultivace

Kultivace je metodou přímého průkazu bakterií v klinickém materiálu a je stále považována za „zlatý standard“ mikrobiologických metod. Jedná se o cílené, umělé pomnožování bakteriálních agens na živných médiích (in vitro). Cílem je získat tzv. čisté kultury, které je možné následně využít k bližší identifikaci bakterií. V diagnostice bakterií se využívají tzv. kultivace statické. Bakterie rostou v ohraničeném množství kultivační půdy, tedy ve zkumavce či Petriho misce. Jejich růst probíhá podle růstové křivky, po vyčerpání živin nebo nahromadění metabolitů se růst zastavuje. Pro správný průběh kultivace je bakteriím nutné simulovat jejich přirozené podmínky pro život (vlhkost, pH, teplota, živiny, atmosféra aj.). U anaerobních bakterií je především nezbytné zajistit anaerobní prostředí či nízký redoxní potenciál Eh kultivačních půd. Obecně anaerobní kultivace je z hlediska provedení, financí i času značně náročná metoda. Doba kultivace anaerobních bakterií může trvat 2–5 dnů (obvykle však 48 h) [14, 23, 26].

3.3.1. Metody dosažení anaerobiózy

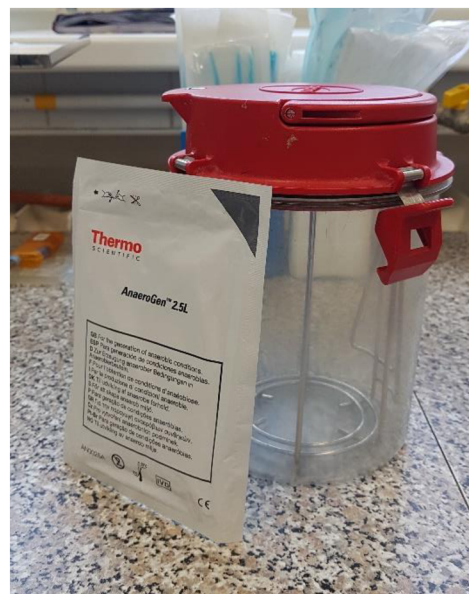
Mezi metody, kterými lze dosáhnout anaerobního prostředí, tedy bez přístupu vzduchu, se řadí metody mechanické (přelití půd parafinovým olejem), fyzikální, chemické či metody kombinované.

Mezi fyzikální metody patří kultivace v anaerobních boxech, kde je vzduch odsán a nahrazen umělou atmosférou bez kyslíku. Směs plynů, převážně tvořena z 85 % dusíkem, 10 % CO₂ a 5 % vodíkem, je do boxu vháněna z příslušných bomb. Další fyzikální metodou jsou např. speciální jednorázové kapsy/sáčky, které jsou též vyplněny umělou atmosférou. Výhodou této metody je, díky malé velikosti sáčku, rychlé vytvoření anaerobního prostředí.

Optimální prostředí pro anaerobní kultivaci se dá rovněž vytvořit chemickou reakcí vhodných reagentů s vodou (i bez). Tento typ kultivace probíhá v tzv. anaerobních hrncích (anaerostatech). Anaerobní prostředí je vytvářeno pomocí tzv. gaspaků – reagenčních sáčků, směsi speciálních chemikálií, které absorbují kyslík a vytvářejí potřebné množství vodíku a CO₂ pro růst anaerobních bakterií. Tímto způsobem je anaerobióza vytvořena do 30 minut. Metodu lze doplnit též metodou katalytickou. Při této metodě dochází pomocí palidiového katalyzátoru k reakci mezi vodíkem a zbylým kyslíkem v aerostatu. Vzniklá voda stéká po stěnách aerostatu, vsakuje se do filtračního papíru, a tak se vhodným způsobem podílí na zvlhčování prostředí [14, 23, 26].



Obrázek 6: Anaerobní box [vlastní zdroj]



Obrázek 7: Anaerostat [vlastní zdroj]

3.3.2. Kultivační půdy

Růst anaerobních bakterií závisí nejen na nepřítomnosti kyslíku, ale též na redoxních podmínkách kultivačního média. Pro anaerobní kultivaci jsou využívány půdy se sníženým redox-potenciálem. Aerobní a fakultativně anaerobní bakterie vyžadují kladný oxidoredukční potenciál, kdežto u anaerobních bakterií je nutné v kultivačních médiích dosáhnout hodnot záporných (okolo -200 mV). Toho lze dosáhnout přidávkem redukujících látek (cystein, glukóza, thiosloučeniny aj.). Mezi kultivační média vhodná pro anaerobní kultivaci se řadí např. VL bujón, VL krevní agar, Wilkins-Chalgrenův agar, Schaedlerův či Veillonův agar [14, 23].

VL bujón (viande-levure bujon) je nejdůležitější tekuté kultivační médium, složené z masopeptonového bujónu, NaCl (0,5 %), kvasnicového extraktu (0,5 %) a cysteinu (0,03 %). Před použitím je nutno půdu regenerovat, tj. povařením z ní odstranit kyslík. Nutné je půdu též přelít parafinovým olejem. VL agar je pevná půda podobného složení, obsahující plnou ovčí krev.

Wilkins-Chalgrenův agar je pevné kultivační médium využívané pro kultivaci anaerobů či pro testování citlivosti na ATB. Půda je tvořena agarem, peptony (zdroj dusíku a aminokyselin), kvasničným extraktem (zdroj vitamínů), glukózou (zdroj uhlíku), chloridem sodným (osmotická rovnováha média), heminem a vitamínem K1 (růstové faktory) či L-argininem a pyruvát sodným [14, 23, 26].

3.4. Identifikace

Identifikace bakterií se obecně skládá z identifikace makroskopické, mikroskopické (viz podkapitola 3.2) a výsledků různých testů. Úroveň či hloubka identifikace bakteriálních agens by měla vždy odpovídat klinické závažnosti odebraného vzorku, počtu a typu izolovaných kmenů či stavu pacienta.

3.4.1. Identifikace pomocí ATB diagnostických disků

Jednou z metod orientační identifikace anaerobních bakterií je identifikace pomocí ATB diagnostických disků. Tato metoda využívá rezistenci bakterií ke kanamycinu 1000 µg, vankomycinu 5 µg, kolistinu 10 µg a SPS (sodium polyanethol sulfonate) 1000 µg. Těž umožní odhalit skutečnou barvitelnost bakterií dle Grama. Diagnostické disky se umístí na půdu s inokulem daných bakterií, ATB začne difundovat do půdy. V případě pozitivity se kolem disku vytvoří zóna inhibice, velikost zóny je následně porovnána s referenčními hodnotami.

K SPS je např. citlivý grampozitivní *Peptostreptococcus anaerobius*, rezistentním druhem je kupříkladu *Peptostreptococcus micros*. Gramnegativní bakterie skupiny *Bacteroides fragilis* bývají obvykle rezistentní vůči všem čtyřem DD, *Bacteroides ureolyticus group* je rezistentní jen k vankomycinu. Bakterie rodu *Prevotella* jsou rezistentní na kanamycin a vankomycin, na colistin mohou být citlivé [2].

3.4.2. Biochemická identifikace

Tato metoda využívá odlišného metabolismu bakterií. K identifikaci je možné využít komerční biochemické soustavy, např. ANAEROtestu 23 (úspěšnost identifikace je dána databází systému) či jednoduché testy. Mezi sledované parametry patří např. tvorba ureázy, indolu, lecitinázy, lipázy, katalázy, štěpení urey, eskulinu, redukce nitrátů, rezistence k 20% žluči aj.

Například pozitivní lipáza a indol umožní identifikaci *Prevotella intermedia*. Dvě zóny hemolýzy, pozitivní lecitináza a reverzní CAMP test odhalí *Clostridium perfringens*, pozitivní lecitináza a lipáza zas *C. novyi*. Pro *Propionibacterium acnes* je typická pozitivní kataláza a indol. Rezistence k 20% žluči, štěpení eskulinu či pozitivní kataláza charakterizuje příslušníky *Bacteroides fragilis group* [2].

3.4.3. Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Metoda MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) v kombinaci s detektorem doby letu TOF (Time Of Flight) způsobila v diagnostice bakterií revoluci. Jedná se o spektrofotometrickou metodu, která pomocí ionizace vzorku a specifické hmotnosti iontů dokáže analyzovat primární strukturu látky. Tato metoda umožňuje analyzovat např. proteinové struktury bakterií, které jsou pro konkrétní bakterie specifické. Analýzou získaná hmotnostní spektra jsou následně porovnána se spektry v referenční databázi kontrolních kmenů. Jelikož každá bakterie tvoří unikátní spektrum, je bakterie možné identifikovat na úrovni rodu i druhu. Mezi přednosti této metody patří rychlost, přesnost, malá náročnost a nízké náklady na analýzu či možnost analyzovat velký počet vzorků najednou [25].

4. STANOVENÍ CITLIVOSTI K ANTIBIOTIKŮM

Jednou z nejdůležitějších činností mikrobiologické laboratoře je stanovení citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám. Znalost citlivosti mikrobů k antibiotikům hraje významnou roli v úspěšnosti antimikrobiální terapie [13].

Testování citlivosti je prováděno různými metodami – kvantitativními (agarová diluční metoda, mikrodiluční metoda), kvalitativními (diskový difúzní test) či kombinovanými (E-test). Testy (s výjimkou DDT) umožňují stanovit hodnotu minimální inhibiční koncentraci (MIC) antibiotik pro vyšetřovaný bakteriální kmen [23]. MIC je definována jako nejnižší koncentrace antibiotika, která je ještě schopna inhibovat růst testovaných mikrobů. Její hodnota je udávána v mg/l nebo µg/ml [24].

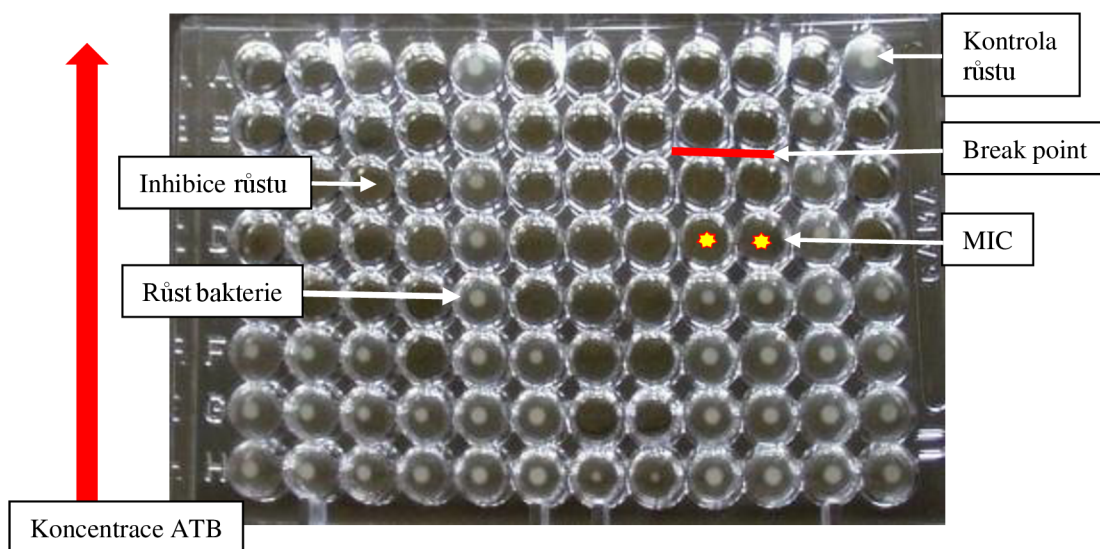
Pro testování citlivosti anaerobů jsou v současné době využívána tato antibiotika: penicilin (PNC), metronidazol (MTR), klindamycin (CLI), amoxicilin/kyselina klavulanová (AMC) či jiné peniciliny s inhibitory beta-laktamáz (ampicilin/sulbaktam, amoxicilin/kyselina klavulanová, tikarcilin/kyselina klavulanová, piperacilin/tazobaktam), chloramfenikol (CMP), meropenem (MER), imipenem (IMP), cefoxitin (CXT) aj. [7].

Standardy a postupy pro stanovení citlivostí zveřejňují a upravují různé odborné organizace – The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), The European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) aj. Tyto organizace, mimo jiné, stanovují hodnoty tzv. break pointů (hraniční hodnota hladiny daného antibiotika, kterou lze dosáhnout v séru), které při porovnání s MIC laboratořím umožňují vyhodnotit citlivost či rezistenci bakterií ke konkrétnímu antibiotiku. Hodnoty break pointů stanovené CLSI a EUCAST se ne vždy shodují, proto interpretace výsledků testů citlivosti může být mnohdy obtížná a výsledky různých laboratoří se mohou lišit [10]. Laboratoře ovšem v mnoha případech dávají přednost CLSI, která má pro testování citlivosti anaerobních bakterií nejlépe vypracovanou metodiku (M11-A8) [7].

4.1. Kvantitativní metody

4.1.1. Mikrodiluční metoda

V této metodě je využívána plastová mikrotitrační destička s 96 jamkami. Všechny jamky jsou naplněny růstovým médiem, jehož typ a složení se mění dle charakteru testovaného kmene. Pro anaeroby můžeme využít např. VL bujon, Wilkins-Chalgrenovu půdu, Brucella bujon či Brain Heart Infusion bujon. 95 jamek dále obsahuje 12 antibiotik (ve sloupcích). Každý sloupec obsahuje jedno antibiotikum ve stoupající koncentraci. Koncentrace antibiotik vzrůstá od dolních důlků k horním s koeficientem 2, tedy v řadě 0,25–0,5–1–2–4–8–16–32 mg/l. V pravém horním rohu bývá umístěna kontrola růstu, tato jamka antibiotikum neobsahuje. Z čerstvých kultur (nejvýše 24 hod. starých) vyšetřovaného kmene, narostlých na neselektivních pevných půdách, se připraví standardní inokulum – suspenze o hustotě 0,5 McFarlandovy stupnice optické denzity (10^5 – 10^6 CFU/ml). Pomocí jehlového inokulátoru se inokulum naočkuje do všech jamek mikrotitrační desky. Dalším krokem je 48hodinová kultivace za anaerobních podmínek při teplotě 37 °C. Po uplynutí inkubační doby se destička umístí nad zrcátko nebo tmavou podložku (růst bakterií se projevuje zkalením média) a stanoví se minimální inhibiční koncentrace. Hodnota MIC se následně srovná s tzv. break pointem – hraniční hodnotou hladiny daného antibiotika, které lze dosáhnout v séru. Je-li $MIC \leq BP$, je mikrob na antibiotikum citlivý. Je-li ovšem $MIC > BP$, je mikrob k antibiotiku rezistentní [23, 24].



Mikrodiluční metoda je díky své dostupnosti a přesnosti nejvyužívanější kvantitativní metodou stanovení citlivostí v rutinních laboratorních provozech [23].

4.1.2. Agarová diluční metoda

Agarová diluční metoda se provádí na 12–15 agarových půdách vhodných pro anaerobní kultivaci. Každá půda obsahuje též určitou koncentraci antimikrobiální látky, koncentrace antibiotika stoupá s koeficientem 2. Následně je na plotny naočkováno standardní inokulum. Oproti předešlé metodě lze hodnotit více vyšetřovaných kmenů naráz. Na jednu plotnu (průměr 90 mm) můžeme naočkovat 16–20 kmenů. Inkubace probíhá za anaerobních podmínek 48 hodin, poté se plotny hodnotí. Nejnižší koncentrace ATB, ve které došlo k zástavě růstu daného mikroba, odpovídá hodnotě MIC [23].



Obrázek 9: Agarová diluční metoda [28]

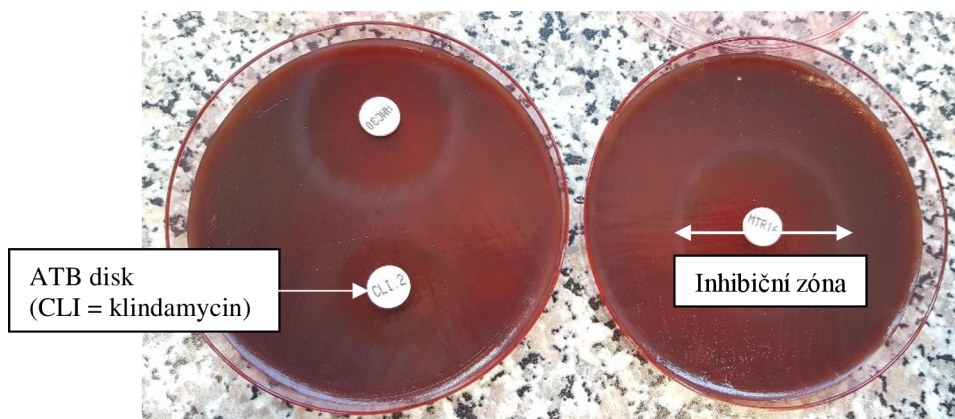
Tato metoda je metodou referenční. Je vysoce standardizovaná, díky nízké pravděpodobnosti výskytu chyb se využívá k ověření spolehlivosti ostatních metod či hodnocení nových antibiotik. Hlavní nevýhodou této metody je její ekonomická náročnost a pracnost provedení [23].

4.2. Kvalitativní metody

Mezi kvalitativní metody řadíme tzv. diskový difúzní test. Tato metoda využívá papírové disky nebo tablety, nasycené přesně daným množstvím antimikrobiální látky, které umožňují rozlišit citlivost a rezistenci bakterií k danému ATB [23].

Na pevné kultivační médium (VL agar) je sterilním vatovým tamponem rovnoměrně nanese inokulum testovaného kmene, které odpovídá hustotě 0,5 zákalového standardu dle McFarlanda. Po zaschnutí jsou na naočkovanou plotnu pomocí dispenzoru či bodla kladeny diagnostické disky s předepsaným množstvím antibiotika (např. klindamycinu, metronidazolu či amoxicilin-klavulanátu). Následně je provedena kultivace (48 h při 37 °C za anaerobních podmínek), během které antibiotikum plně difunduje do okolí. Pozornost je zaměřena na vznik tzv. inhibiční zóny (IZ) kolem disku, jejíž průměr je měřen (v mm) a srovnáván s hraničním průměrem zóny referenčního kmene stejného druhu. Při průměru IZ větším nebo stejném se zónou referenční je mikrob k danému antibiotiku citlivý. V případě, že není žádná zóna inhibice pozorována či je její průměr menší, než udává výrobce, bakterie je vůči danému ATB rezistentní [23, 24].

Jelikož test nevyžaduje zvláštní přístrojové vybavení ani vysoké materiální náklady, stal se v mnoha laboratorních provozech oblíbenou a často využívanou metodou [23]. V návaznosti na doporučení EUCAST se ovšem od testování citlivosti anaerobních bakterií (za účelem nasazení ATB terapie) pomocí diskového difúzního testu v rutinních laboratořích postupem času upouští, jelikož bylo prokázáno, že tento test není z důvodů nedostatečné standardizace pro anaeroby spolehlivý [8, 18]. Metoda diskové difúze se u anaerobů též využívá k předběžné identifikaci bakterií.

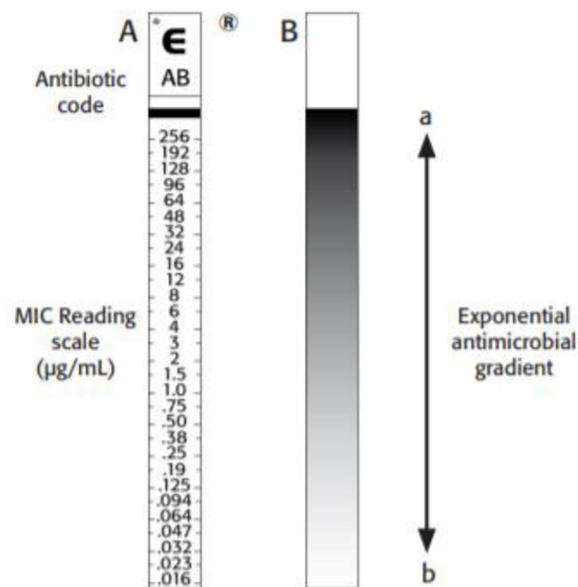


Obrázek 10: Diskový difúzní test [vlastní zdroj]

4.3. Kombinované metody

4.3.1. E-test

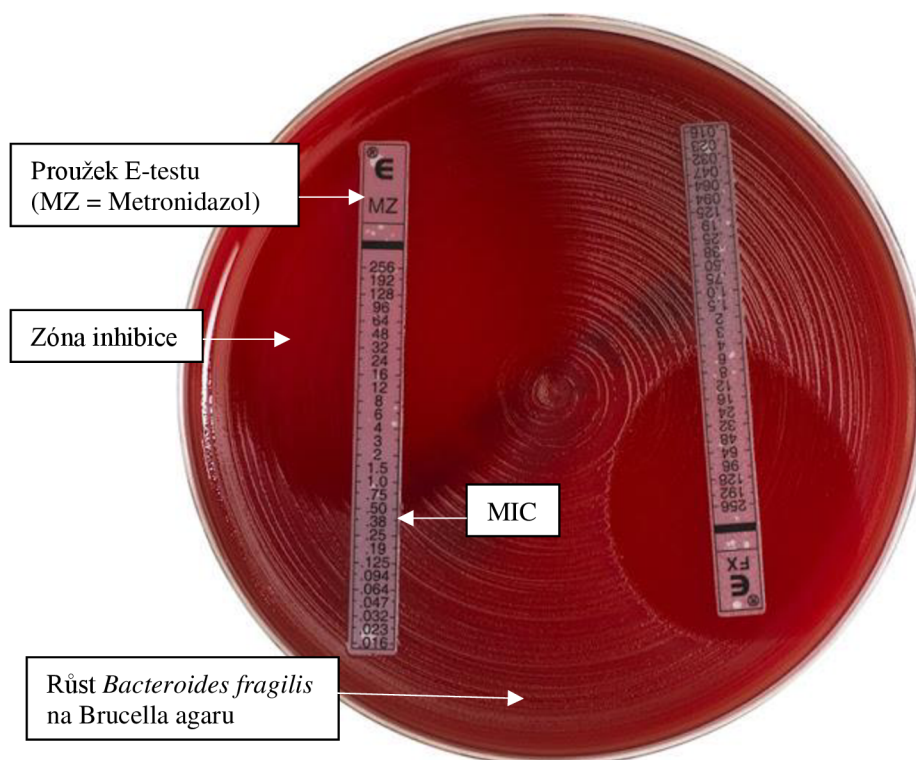
Příkladem metody vyšetření citlivosti, která v sobě kombinuje principy diskového difúzního testu a diluční metody, je tzv. E-test. Jedná se o plastický chemicky inertní proužek, cca. 5 mm široký a 50 mm dlouhý. Na jedné straně obsahuje exponenciální gradient koncentrací daného ATB (obr. 11B), na druhé straně proužku je vyznačen kód použitého antibiotika a stupnice ředění ATB dvojnásobnou geometrickou řadou (obr. 11A), která slouží k odečítání MIC [13, 23].



Obrázek 11: Proužek E-testu [36]

Na povrch agaru vhodného pro anaerobní kultivaci je nejprve potřeba nanést inokulum vyšetřovaného mikroba. Jedná se o suspenzi bakterií ve fyziologickém roztoku či živném bujónu o správné hustotě (0,5–1 zákalového standardu dle McFarlanda). Nesprávná hustota inokula může významným způsobem ovlivnit stanovení citlivosti, bakterie může být chybně označena za citlivou či rezistentní k danému antibiotiku. Správnou hustotu inokula reprezentuje splývavý růst kmene.

Po zaschnutí inokula je aplikován na agar proužek E-testu stranou obsahující antibiotikum. ATB difunduje do půdy a po uplynutí doby inkubace se hodnotí zóna inhibice v okolí proužku. Inhibiční zóna má tvar elipsy či obrácené kapky. V místě s nejvyšší koncentrací ATB je zóna nejširší, s klesající koncentrací ATB se zóna zužuje. Hodnota MIC je odečítána v místě, kde elipsa inhibice protíná okraj proužku. Hodnota MIC je následně porovnávána s hraničními koncentracemi (break pointy) pro citlivé kmeny. Je-li $MIC \leq BP$, je mikrob na antibiotikum citlivý, v opačném případě je mikrob k ATB rezistentní.



Obrázek 12: Detekce MIC pomocí E-testu [32]

Hlavní výhodou E-testu je jednoduchost provedení a nenáročnost přístrojového vybavení. Test lze provést na různých půdách, tudíž je vhodný pro mikroby s různými růstovými nároky. Nevýhodou testu je jeho vyšší cena [13, 14, 23].

5. MONITORING VZRŮSTAJÍCÍ REZISTENCE, PŘÍNOS V ATB TERAPII

Výsledky získané metodami stanovení citlivosti k antimikrobiálním látkám mají velký význam jednak při cílené antibiotické terapii u konkrétního pacienta, avšak mohou také poskytovat cenné informace pro zvolení nejvhodnější empirické léčby. Jelikož je diagnostika anaerobních bakterií náročná a déletrvající, cílená ATB terapie není ihned možná a pacientům je mnohdy nutné podat ATB ještě před průkazem etiologického agens. Ovšem je nutné brát v potaz, že nevhodná terapie může vést k zhoršení klinického stavu či podporovat vznik rezistence. Právě vznik nových rezistencí zpětně značně komplikuje léčbu. Zatímco před třiceti lety bylo možné profil citlivosti anaerobů poměrně snadno odhadnout, dnes už tomu tak není a lékaři se již nemohou jednoznačně spoléhat na dříve osvědčená ATB využívaná v boji s anaerobními infekcemi. Jedním z těchto ATB je např. klindamycin, který byl před čtyřiceti lety považován za zlatý standard, ale s vysokým nárůstem rezistence u *C. difficile* (~ 70%), *B. fragilis group* (30–40%), *Prevotella* spp. (10–40%) a dalších příbuzných anaerobních bakterií (~ 10%) či *Peptostreptococcus* spp. (~ 10%), ztratil tento lék svou pozici mezi ATB první linie [7, 10, 21].

I přesto, že data o míře a vývoji rezistence nejsou systematicky shromažďována (celosvětově či celonárodně) a informace jsou veřejně poskytovány pouze některými anaerobními referenčními laboratořemi či v rámci nadnárodních studií, lze tento trend v nárůstu rezistencí zachytit. Míra rezistence anaerobů k ATB roste nejen v čase, ale odlišuje se též v různých geografických oblastech [10].

5.1. Monitoring citlivosti ve zdravotnickém zařízení

Bez správného průkazu etiologické agens a stanovení citlivosti k antibiotikům zůstává ATB terapie často bez klinického efektu. Pro včasnou a cílenou antibiotickou léčbu je též nutné znát profil citlivosti anaerobů v konkrétní oblasti a zdravotnickém zařízení. Výběr vhodného antibiotika umožní tzv. antibiogram, vzniklý z výsledků stanovení citlivosti alespoň 50 vzorků (dle doporučení CLSI). Počet a výběr druhů pro testování by měl odpovídat frekvenci nálezu v klinických vzorcích. Kvůli celosvětovému nárůstu rezistencí k ATB se bohužel antibiogramy anaerobních bakterií stále více stávají nepředvídatelnými [7]. Pro snazší predikci účinnosti zvolené empirické léčby a zajištění vysoké úspěšnosti celkové léčby CLSI doporučuje, aby si nemocnice průběžně vytvářely antibiogramy samy, a tak si ověřovaly aktuální profil citlivosti ve své oblasti [7, 10].

6. PRAKTICKÁ ČÁST – PROFIL CITLIVOST ANAEROBŮ ZACHYCENÝCH VE FN BRNO V ROCE 2018

6.1. Cíl práce

Cílem praktické části bakalářské práce je vyhodnocení profilu citlivosti anaerobních bakterií k antimikrobiálním látkám v konkrétní oblasti/zdravotnickém zařízení a poskytnout tak užitečné informace pro klinické pracovníky při volbě empirické léčby.

6.2. Metodika

Praktická část bakalářské práce byla provedena na základě statistických dat nasbíraných Fakultní nemocnicí Brno za rok 2018. Poskytnuté výsledky vyšetření citlivosti anaerobů k ATB jsem shrnula, zpracovala pomocí tabulek/grafů a vyhodnotila.

6.3. Zpracování výsledků

Poskytnutá data byla získána z laboratoře anaerobních infekcí (ANA), chirurgických oborů (CHIR), interních oborů (INT), hemokultur či laboratoře močové. Anaerobní kmeny byly izolovány po kultivaci v anaerobním boxu, identifikovány pomocí DD, případně Maldi-TOF a byla stanovena jejich citlivost na antibiotika. Vyšetření citlivosti anaerobních bakterií bylo v laboratořích OKM FN Brno nejčastěji prováděno metodou diskového difúzního testu, dále pak pomocí E-testu. Výsledky byly interpretovány pomocí break pointů stanovených CLSI (disky)/EUSACT (E-test). Za rok 2018 bylo na citlivost k ATB vyšetřeno celkem 769 pacientů s pozitivním nálezem anaerobních bakterií v klinickém vzorku (viz tabulka 10). Bakterie byly testovány především na citlivost k AMC, CLI a MTR, na srovnání účinnosti těchto antibiotik je tudíž práce zaměřena.

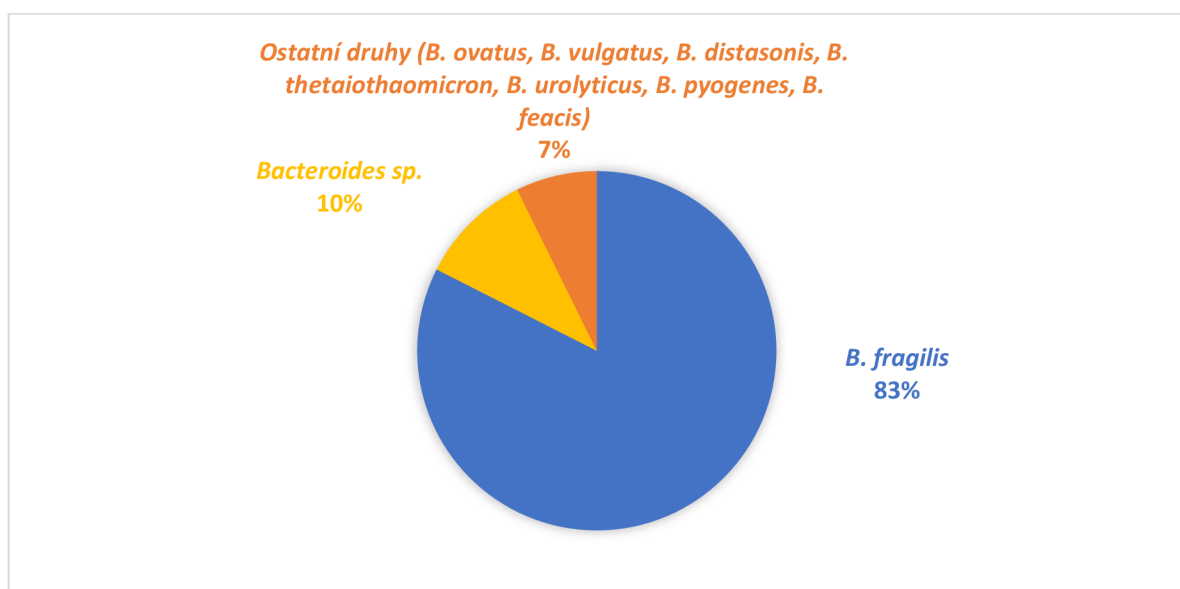
6.3.1. Anaerobní bakterie rodu *Bacteroides*, profil citlivosti k ATB

Metodami stanovení citlivosti k ATB bylo testováno celkem 274 kmenů anaerobní bakterie rodu *Bacteroides* v klinickém materiálu. Nejčastějším izolovaným druhem byl *Bacteroides fragilis* (226, 83 %).

Tabulka 1: Anaerobní bakterie rodu *Bacteroides* zachycené ve FN Brno v roce 2018

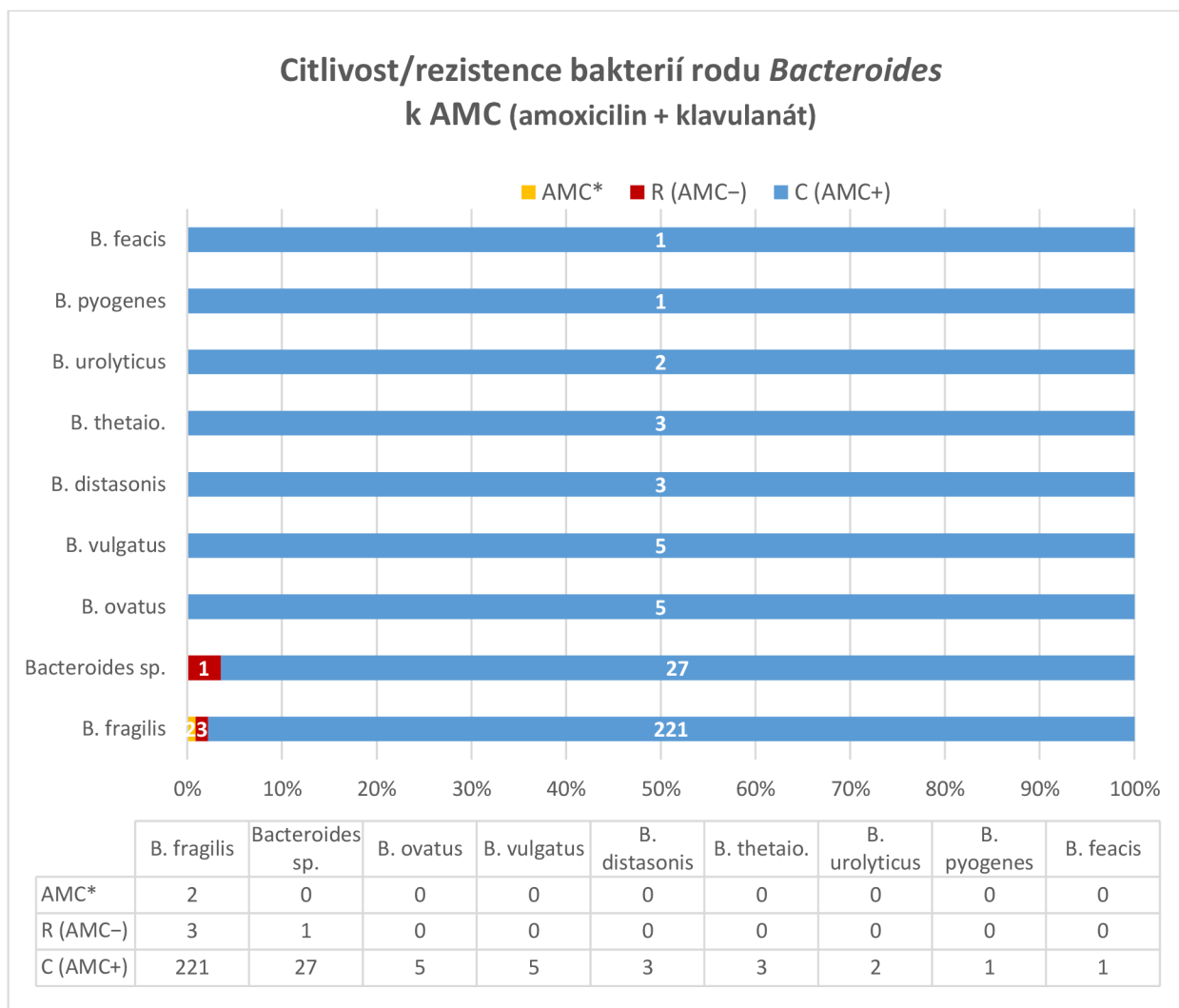
BAKTERIE	POČET IZOLÁTŮ
<i>Bacteroides fragilis</i>	226
<i>Bacteroides sp.</i>	28
<i>B. ovatus</i>	5
<i>B. vulgatus</i>	5
<i>B. distasonis</i>	3
<i>B. thetaiotaomicron</i>	3
<i>B. urolyticus</i>	2
<i>B. pyogenes</i>	1
<i>B. feacis</i>	1
Celkem	274

Graf 1: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Bacteroides*



Převážná většina bakteriálních kultur byla testována na citlivost k AMC (graf 2), CLI (graf 3) a MTR (graf 4). Některé byly též testovány na citlivost k CMP a MER, jednalo se však jen o minimální množství (příloha 1).

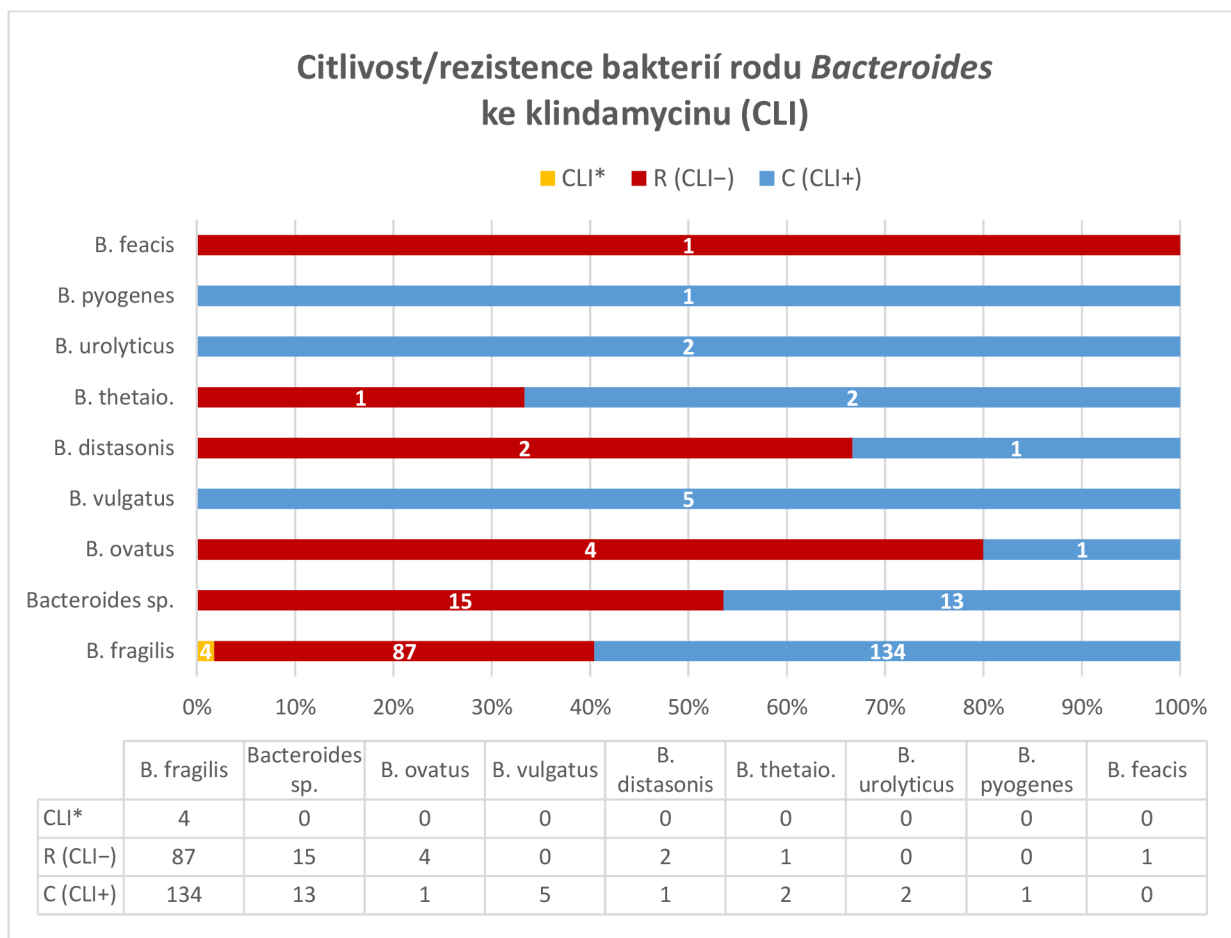
Graf 2: Profil citlivosti bakterií rodu *Bacteroides* k AMC (FN Brno, 2018)



Na citlivost k AMC bylo testováno 274/274 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Bacteroides*. Celkem **97,8 %** izolátů (n = 268) bylo na AMC citlivých (C), **1,5 %** (n = 4) bylo rezistentních (R) a **0,7 %** mělo mezní výsledek (n = 2).

Rezistence k AMC byla zaznamenána u druhů *B. fragilis* a *Bacteroides sp.* Z celkového počtu *B. fragilis* bylo k AMC rezistentních **1,3 %** izolátů (3/226), u *Bacteroides sp.* byla prokázána odolnost vůči AMC u **3,6 %** izolátů (1/28).

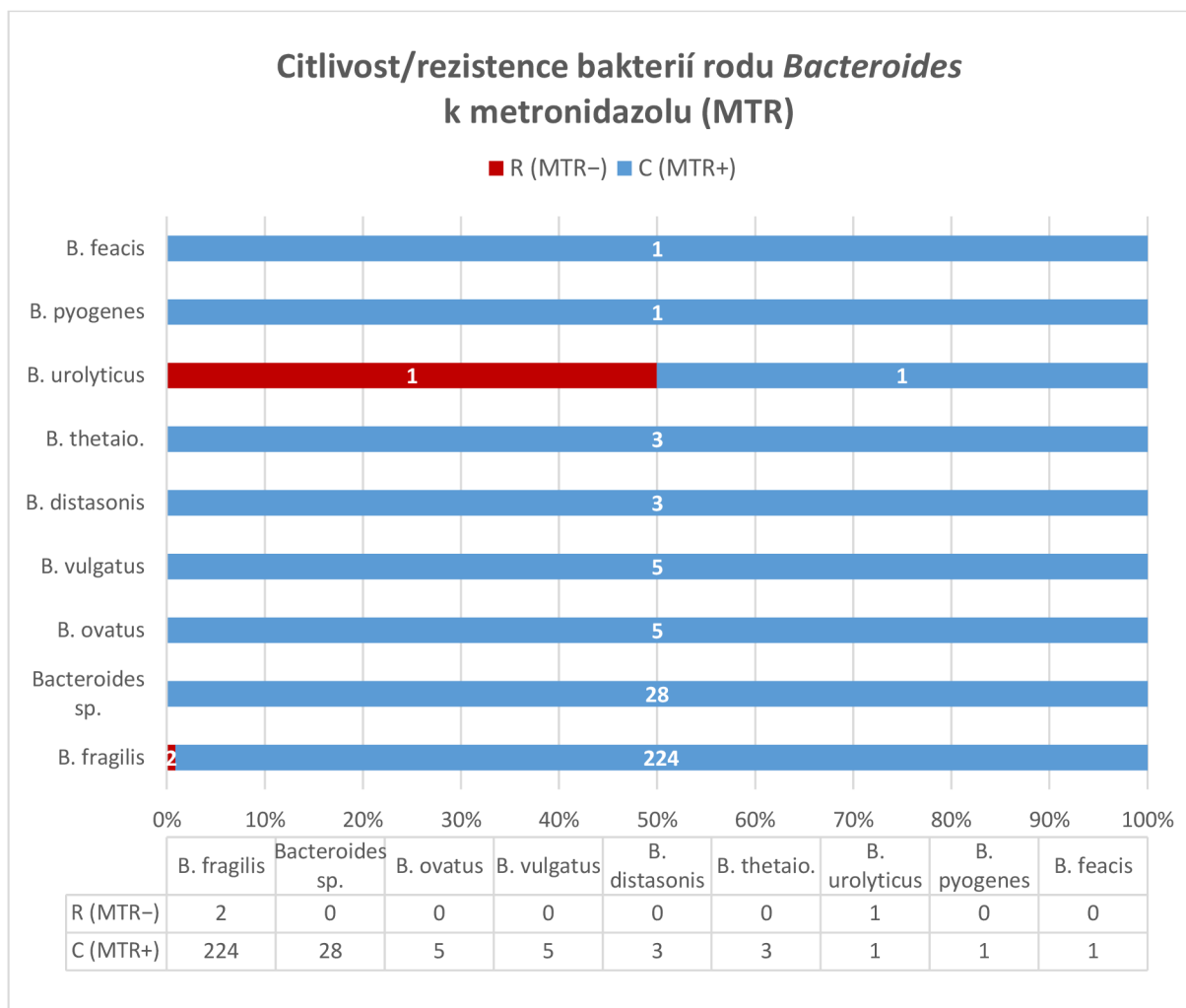
Graf 3: Profil citlivosti bakterií rodu *Bacteroides* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)



Na citlivost ke CLI bylo testováno 273/274 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Bacteroides*. Celkem **58,2 %** izolátů (n = 159) bylo na CLI citlivých (C), **40,3 %** (n = 110) bylo rezistentních (R) a **1,5 %** mělo mezní výsledek (n = 4).

Rezistence ke CLI byla zaznamenána u téměř všech druhů, výjimku tvořily druhy *B. vulgatus*, *B. urolyticus* a *B. pyogenes*. Z celkového počtu *B. fragilis* bylo ke CLI rezistentních **38,7 %** izolátů (87/225), u *Bacteroides sp.* byla prokázána odolnost vůči CLI u **53,6 %** izolátů (15/28). Rezistence u *B. ovatus* tvořila **80 %** (4/5), u *B. distasonis* **66,7 %** (2/3), u *B. thetaiothaomicron* **33,3 %** (1/3).

Graf 4: Profil citlivosti bakterií rodu *Bacteroides* k metronidazolu (FN Brno, 2018)



Na citlivost k MTR bylo testováno 274/274 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Bacteroides*. Celkem **98,9 %** izolátů (n = 271) bylo na MTR citlivých (C), **1,1 %** (n = 3) bylo rezistentních (R).

Rezistence k MTR byla zaznamenána pouze u *B. fragilis* a *B. urolyticus*. Z celkového počtu *B. fragilis* bylo k MTR rezistentních **0,9 %** izolátů (2/226), u *B. urolyticus* byla prokázána odolnost vůči MTR u **50 %** izolátů (1/2).

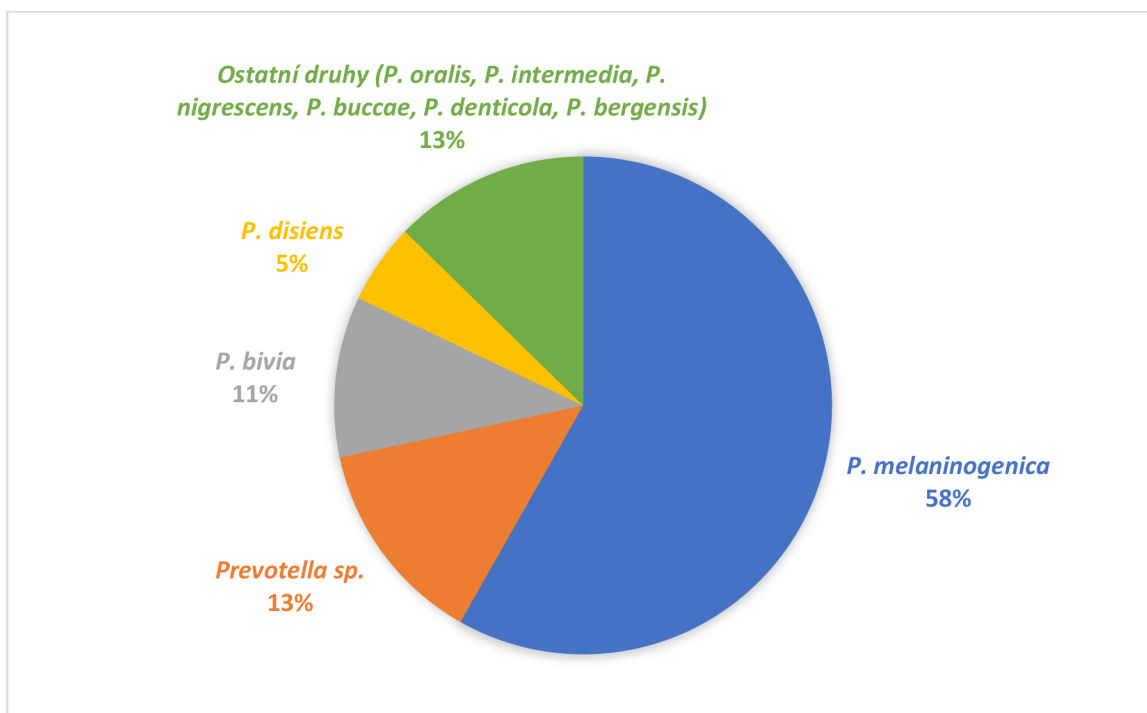
6.3.2. Anaerobní bakterie rodu *Prevotella*, profil citlivosti k ATB

Metodami stanovení citlivosti k ATB bylo testováno celkem 134 kmenů anaerobní bakterie rodu *Prevotella* v klinickém materiálu. Nejčastějším izolovaným druhem byla *Prevotella melaninogenica* (78, 58 %).

Tabulka 2: Anaerobní bakterie rodu *Prevotella* zachycené ve FN Brno v roce 2018

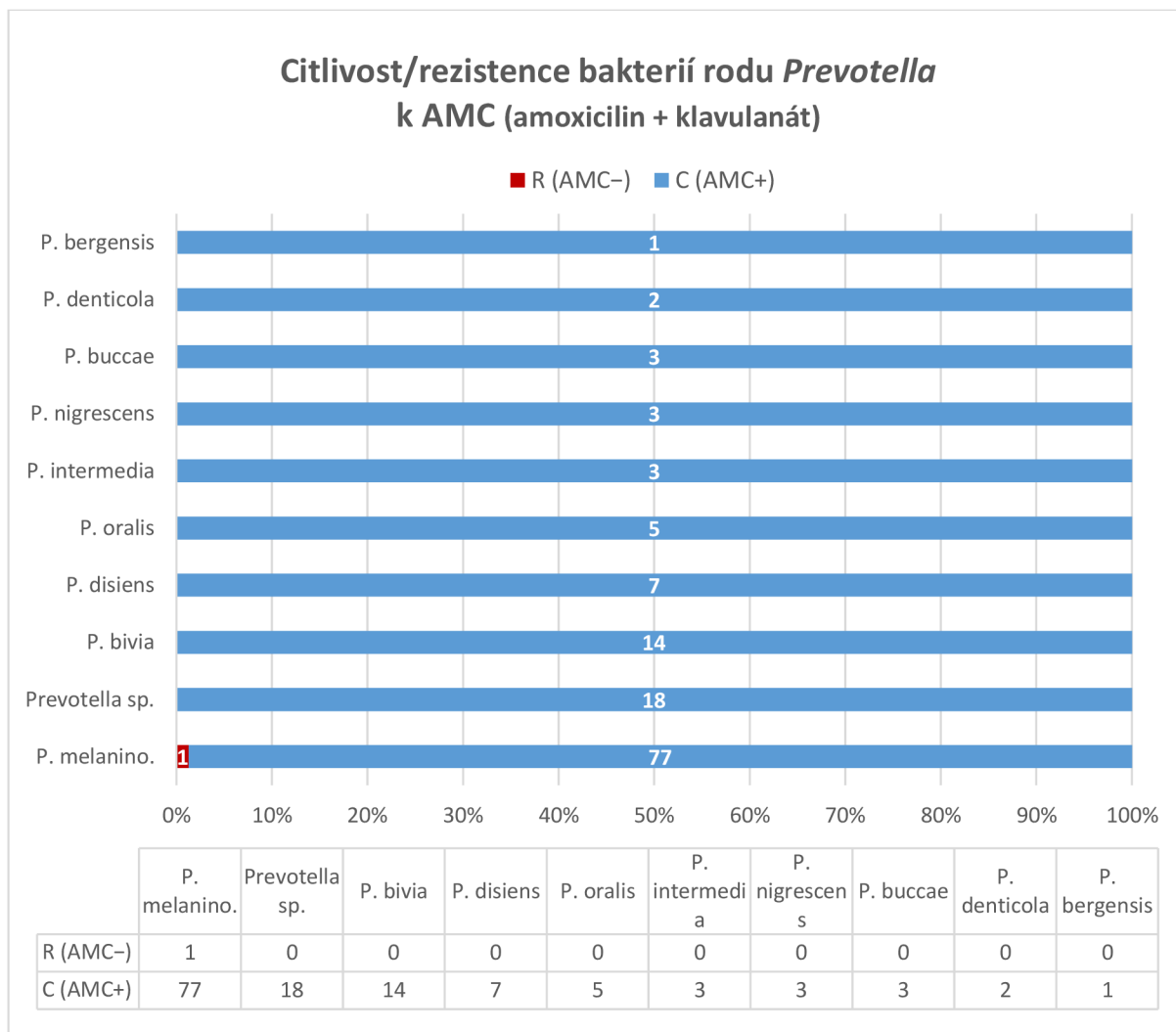
BAKTERIE	POČET IZOLÁTŮ
<i>Prevotella melaninogenica</i>	78
<i>Prevotella sp.</i>	18
<i>P. bivia</i>	14
<i>P. disiens</i>	7
<i>P. oralis</i>	5
<i>P. intermedia</i>	3
<i>P. nigrescens</i>	3
<i>P. buccae</i>	3
<i>P. denticola</i>	2
<i>P. bergensis</i>	1
Celkem	134

Graf 5: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Prevotella*



Převážná většina bakteriálních kultur byla testována na citlivost k AMC (graf 6), CLI (graf 7) a MTR (graf 8). Některé byly též testovány na citlivost k CMP a MER, jednalo se však jen o minimální množství (příloha 1).

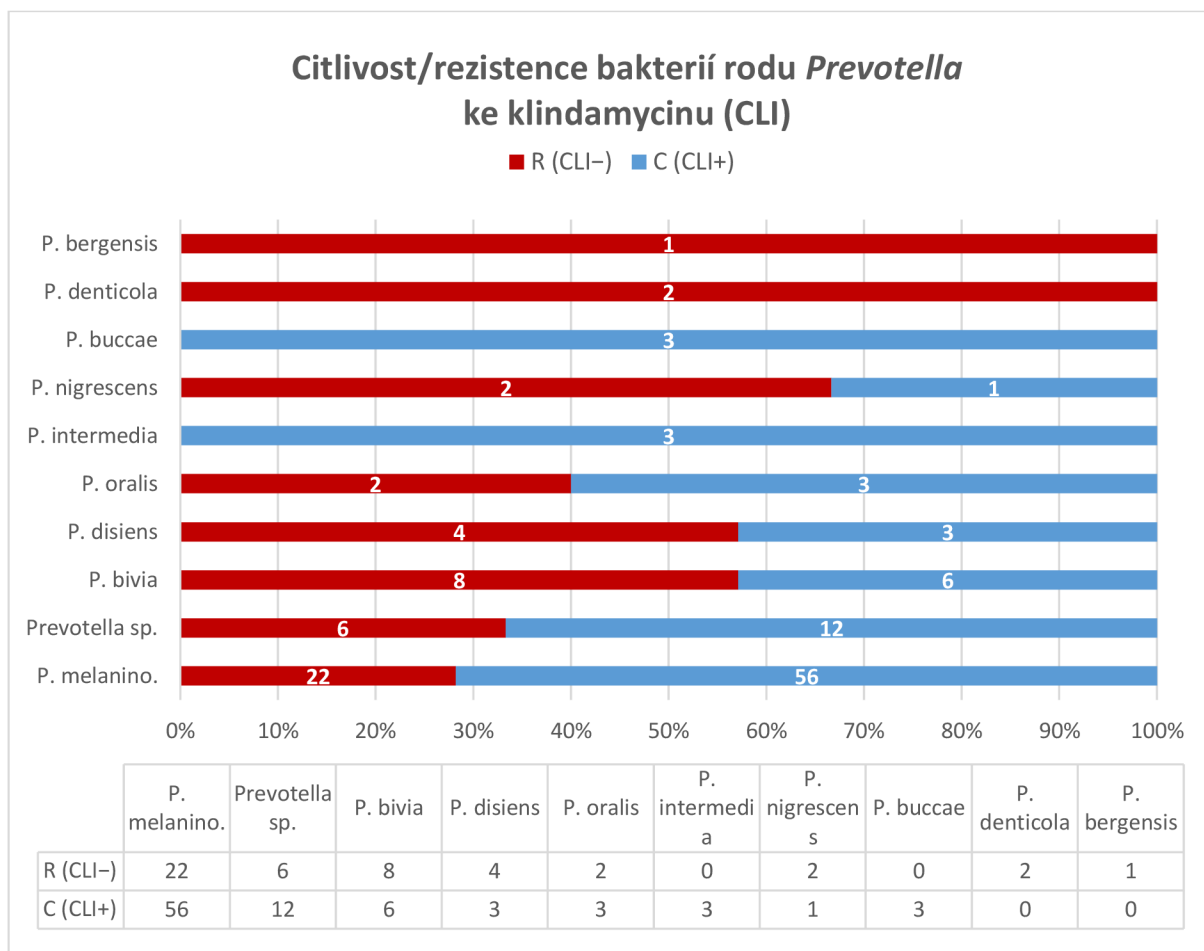
Graf 6: Profil citlivosti bakterií rodu *Prevotella* k AMC (FN Brno, 2018)



Na citlivost k AMC bylo testováno 134/134 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Prevotella*. Celkem **99,3 %** izolátů (n = 133) bylo na AMC citlivých (C), **0,7 %** (n = 1) bylo rezistentních (R).

Rezistence k AMC byla zaznamenána u druhu *Prevotella melaninogenica*. Z celkového počtu *P. melaninogenica* bylo k AMC rezistentních **1,3 %** izolátů (1/78).

Graf 7: Profil citlivosti bakterií rodu *Prevotella* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)

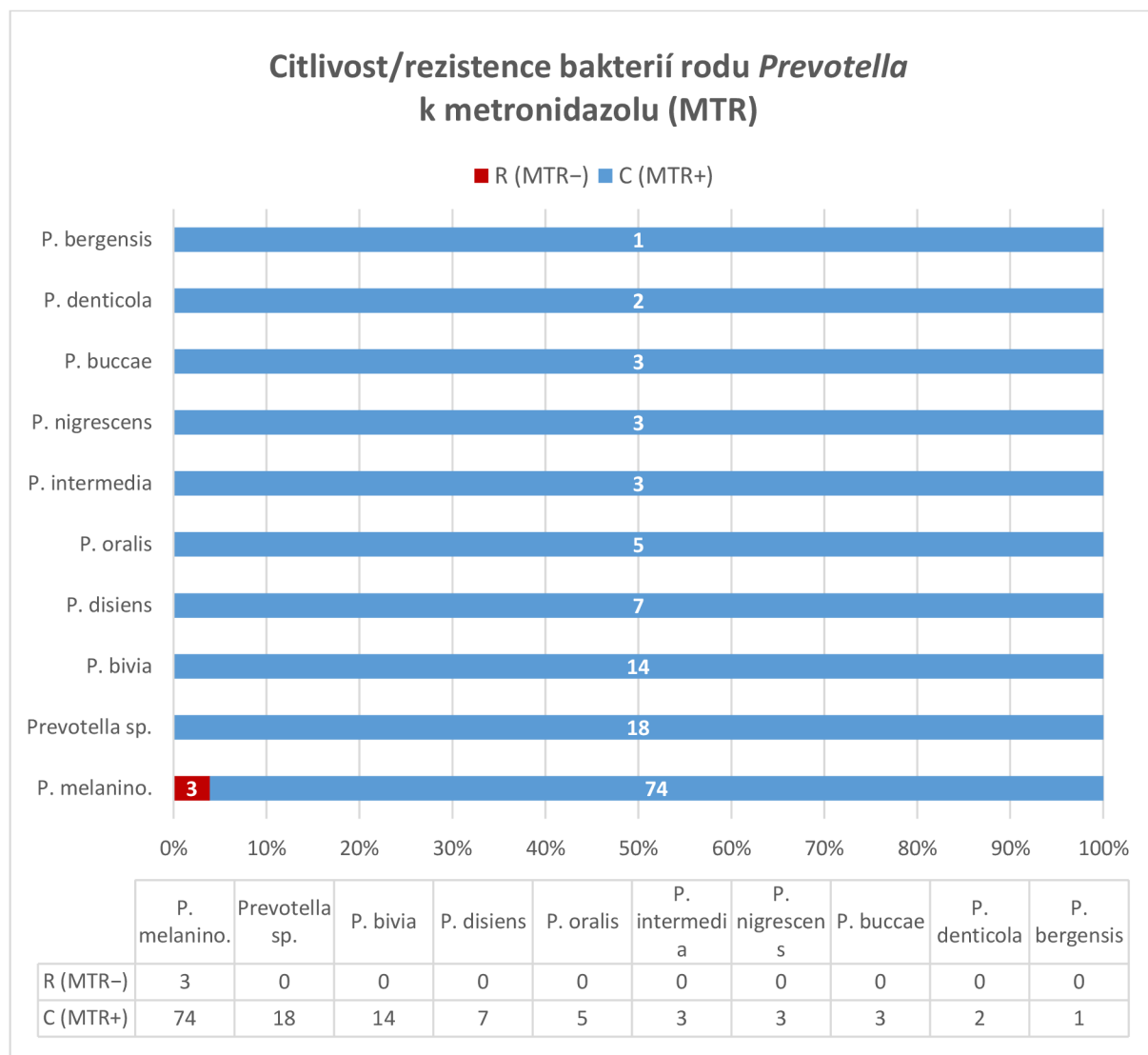


Na citlivost ke CLI bylo testováno 134/134 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Prevotella*. Celkem **64,9 %** izolátů (n = 87) bylo na CLI citlivých (C), **35,1 %** (n = 47) bylo rezistentních (R).

Určitá míra rezistence ke CLI byla zaznamenána u téměř všech zachycených druhů rodu *Prevotella*. Výjimkou byly *P. buccae* a *P. intermedia*, které vykazovaly **100%** citlivost. Naopak **100%** odolnost vůči CLI byla prokázána u *P. denticola* (2/2).

Z celkového počtu *P. melaninogenica* bylo ke CLI rezistentních **28,2 %** izolátů (22/78), u *Prevotella sp.* dosahovala odolnost vůči CLI k **33,3 %** (6/18), u *P. bivia* k **57,1 %** (8/14). *P. oralis* byla rezistentní z **40 %** (2/5), *P. disiens* z **57,1 %** (4/7), *P. nigrescens* z **66,7 %** (2/3).

Graf 8: Profil citlivosti bakterií rodu *Prevotella* k metronidazolu (FN Brno, 2018)



Na citlivost k MTR bylo testováno 133/134 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Prevotella*. Celkem **97,7 %** izolátů (n = 130) bylo na CLI citlivých (C), **2,3 %** (n = 3) bylo rezistentních (R).

Rezistence k MTR byla zjištěna pouze u *P. melaninogenica*. Z celkového počtu *P. melaninogenica* bylo k MTR rezistentních **3,9 %** izolátů (3/78).

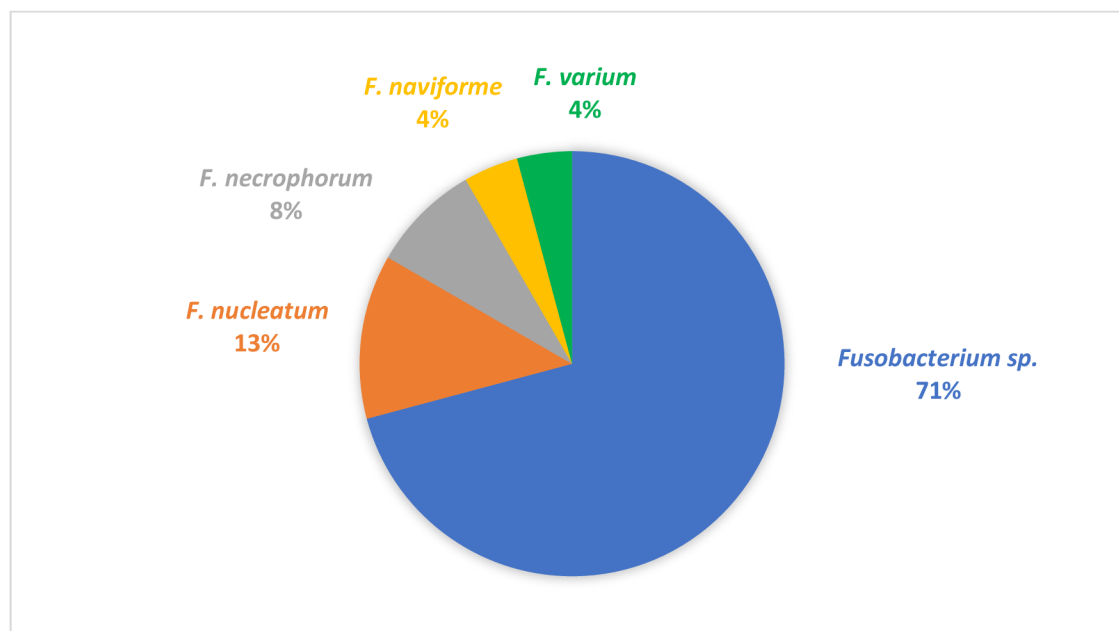
6.3.3. Anaerobní bakterie rodu *Fusobacterium*, profil citlivosti k ATB

Metodami stanovení citlivosti k ATB bylo testováno celkem 24 kmenů anaerobní bakterie rodu *Fusobacterium* v klinickém materiálu. Nejvíce izolovaných bakterií bylo zařazeno mezi *Fusobacterium sp.* (17, 71 %).

Tabulka 3: Anaerobní bakterie rodu *Fusobacterium* zachycené ve FN Brno v roce 2018

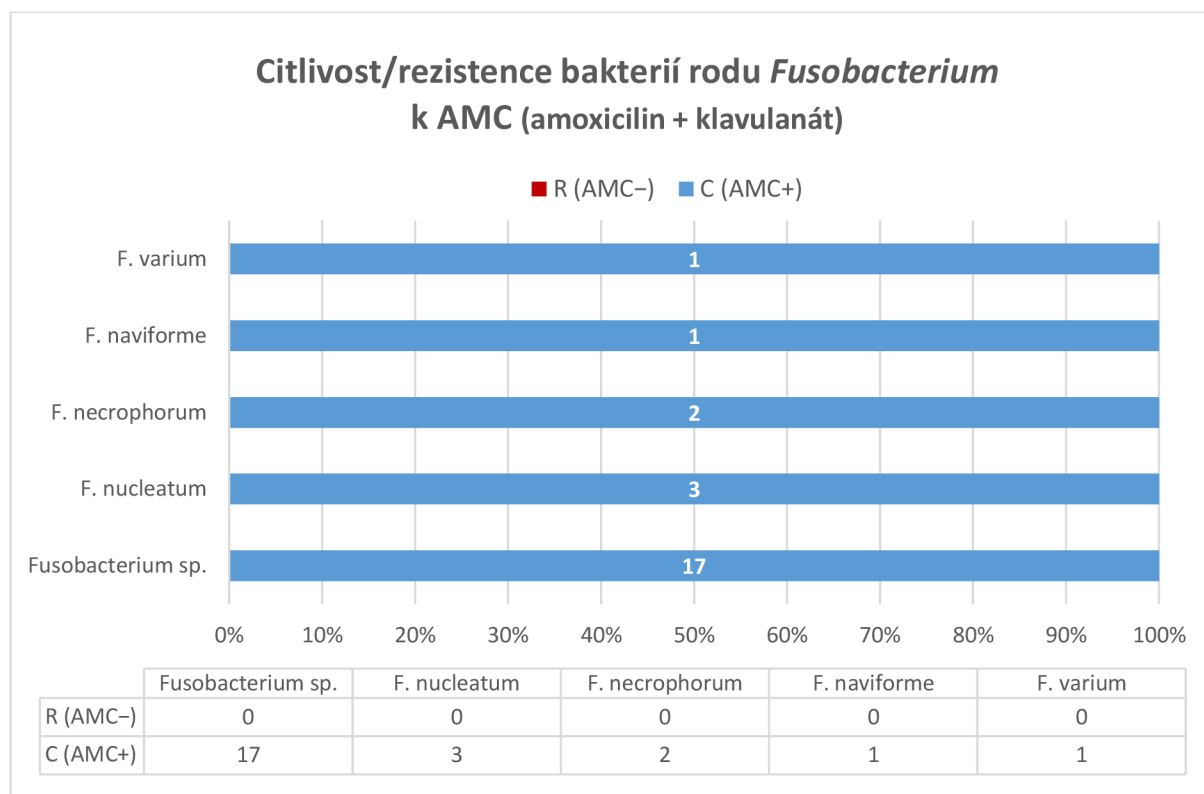
BAKTERIE	POČET IZOLÁTŮ
<i>Fusobacterium sp.</i>	17
<i>F. nucleatum</i>	3
<i>F. necrophorum</i>	2
<i>F. naviforme</i>	1
<i>F. varium</i>	1
Celkem	24

Graf 9: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Fusobacterium*



Všechny bakteriální kultury byly testovány na citlivost k AMC (graf 10), CLI (graf 11) a MTR (graf 12). Některé byly též testovány na citlivost k CMP a MER, jednalo se však jen o minimální množství (příloha 1).

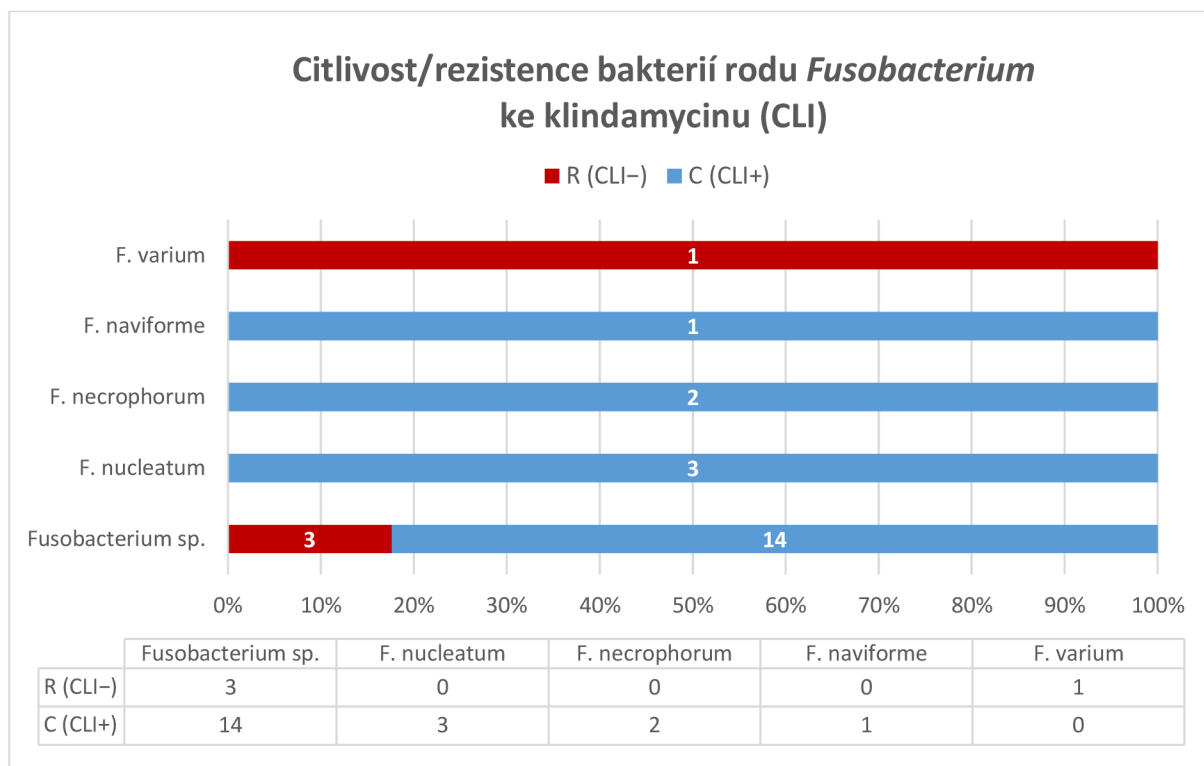
Graf 10: Profil citlivosti bakterií rodu *Fusobacterium* k AMC (FN Brno, 2018)



Na citlivost k AMC bylo testováno 24/24 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Fusobacterium*. Všechny izoláty¹ vykazovaly k AMC **100%** citlivost.

¹ Statistické hodnocení se nevztahuje na druhy s pouze jedním zástupcem

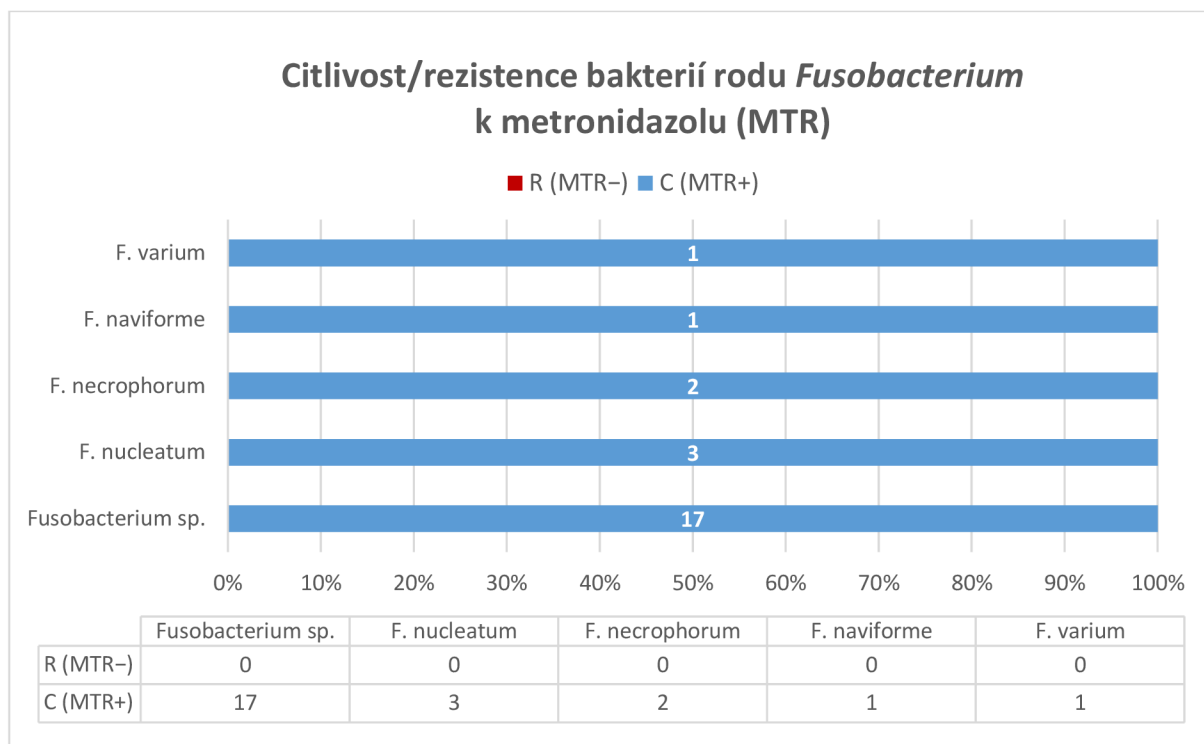
Graf 11: Profil citlivosti bakterií rodu *Fusobacterium* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)



Na citlivost ke CLI bylo testováno 24/24 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Fusobacterium*. Celkem **83,3 %** izolátů (n = 20) bylo na CLI citlivých (C), **16,7 %** (n = 4) bylo rezistentních (R).

Určitá míra rezistence byla detekována u *F. varium* a *Fusobacterium sp.* Z celkového počtu *Fusobacterium sp.* bylo ke CLI rezistentních **17,6 %** izolátů (3/17).

Graf 12: Profil citlivosti bakterií rodu *Fusobacterium* k metronidazolu (FN Brno, 2018)



Na citlivost k MTR bylo testováno 24/24 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Fusobacterium*. Všechny izoláty² vykazovaly k MTR **100%** citlivost.

² Statistické hodnocení se nevztahuje na druhy s pouze jedním zástupcem

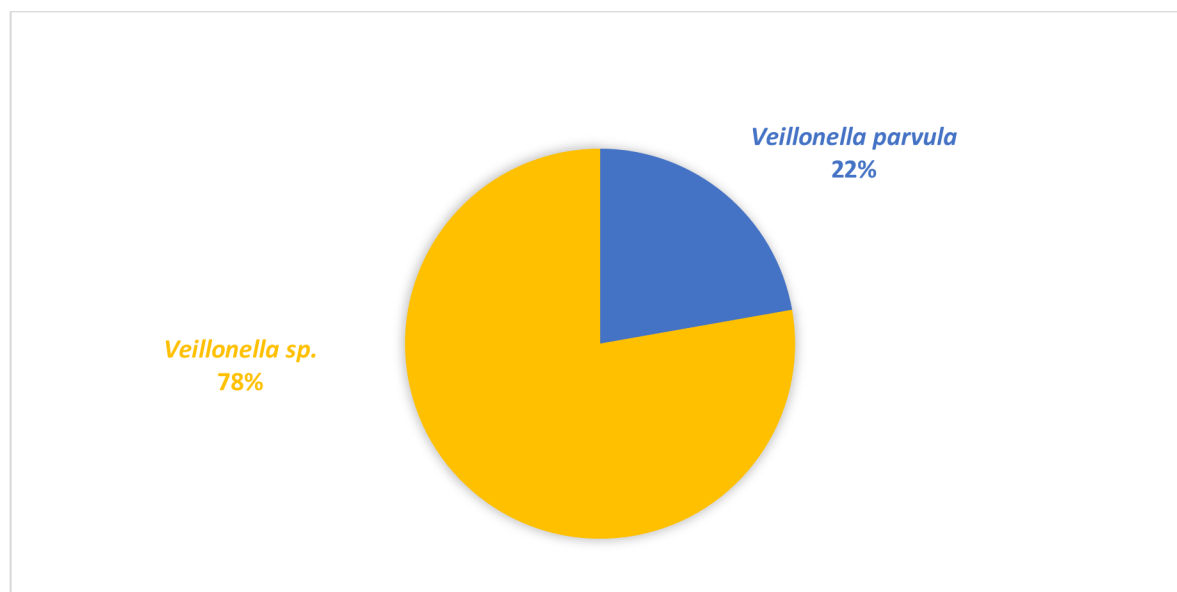
6.3.4. Anaerobní bakterie rodu *Veillonella*, profil citlivosti k ATB

Metodami stanovení citlivosti k ATB bylo testováno celkem 9 kmenů anaerobní bakterie rodu *Veillonella* v klinickém materiálu. Nejvíce izolovaných bakterií bylo zařazeno mezi *Veillonella sp.* (7, 78 %). Všechny bakteriální kultury byly testovány na citlivost k AMC (graf 14), CLI (graf 15) a MTR (graf 16).

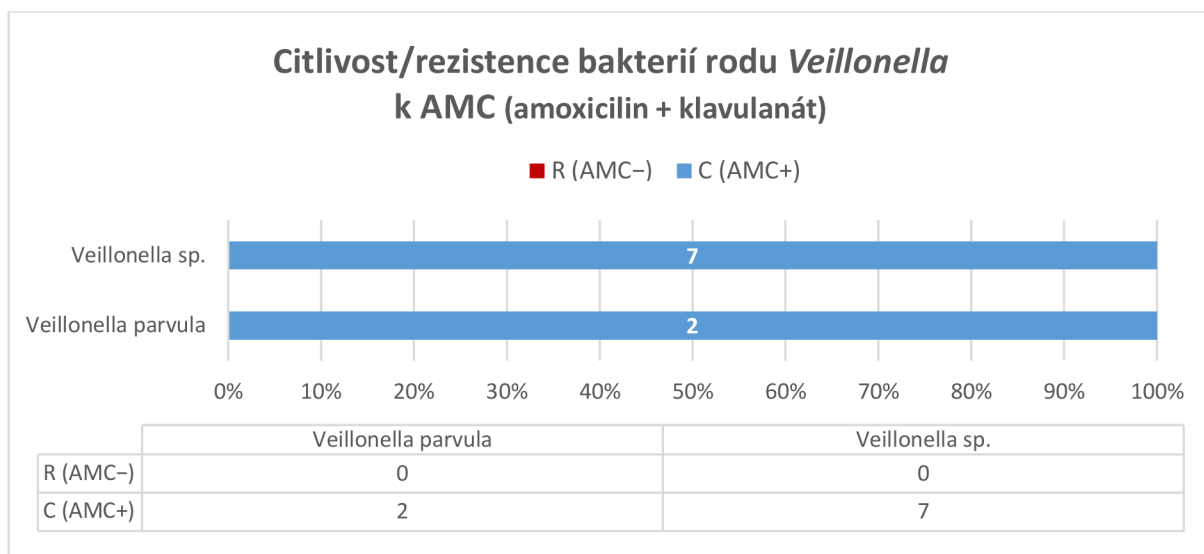
Tabulka 4: Anaerobní bakterie rodu *Veillonella* zachycené ve FN Brno v roce 2018

BAKTERIE	POČET IZOLÁTŮ
<i>Veillonella parvula</i>	2
<i>Veillonella sp.</i>	7
Celkem	9

Graf 13: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Veillonella*

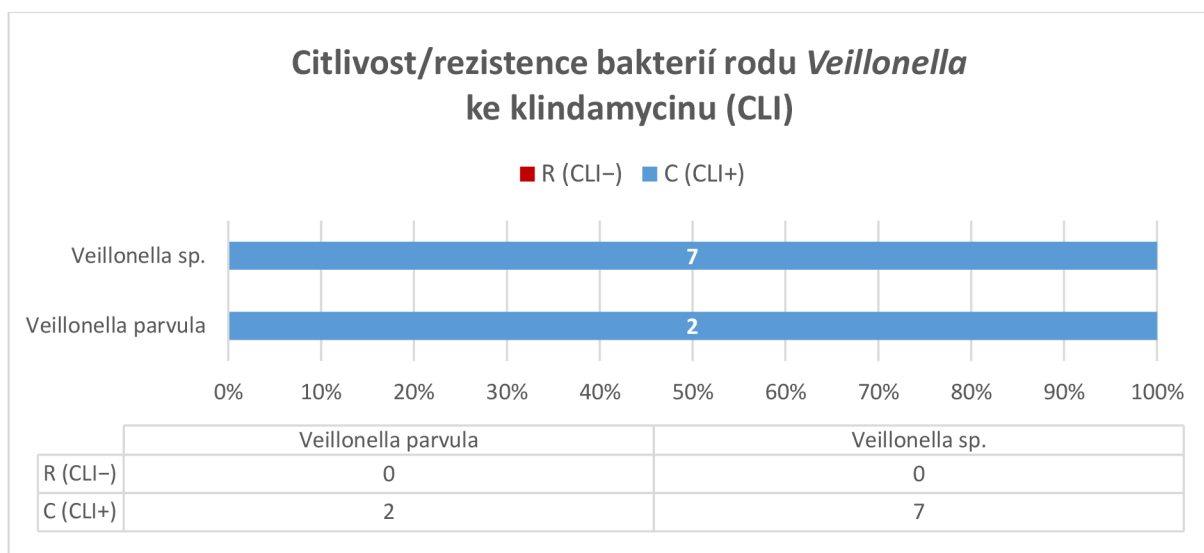


Graf 14: Profil citlivosti bakterií rodu *Veillonella* k AMC (FN Brno, 2018)



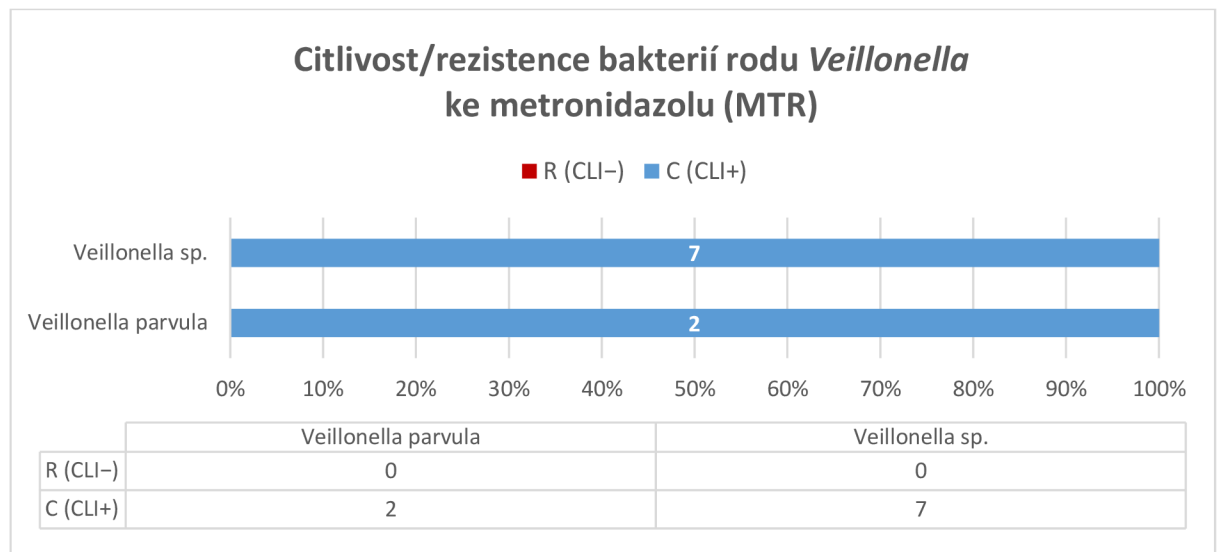
Na citlivost k AMC bylo testováno 9/9 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Veillonella*. Všechny izoláty vykazovaly k AMC **100%** citlivost.

Graf 15: Profil citlivosti bakterií rodu *Veillonella* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)



Na citlivost ke CLI bylo testováno 9/9 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Veillonella*. Všechny izoláty vykazovaly ke CLI **100%** citlivost.

Graf 16: Profil citlivosti bakterií rodu *Veillonella* k metronidazolu (FN Brno, 2018)



Na citlivost k MTR bylo testováno 9/9 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Veillonella*. Všechny izoláty vykazovaly k MTR **100%** citlivost.

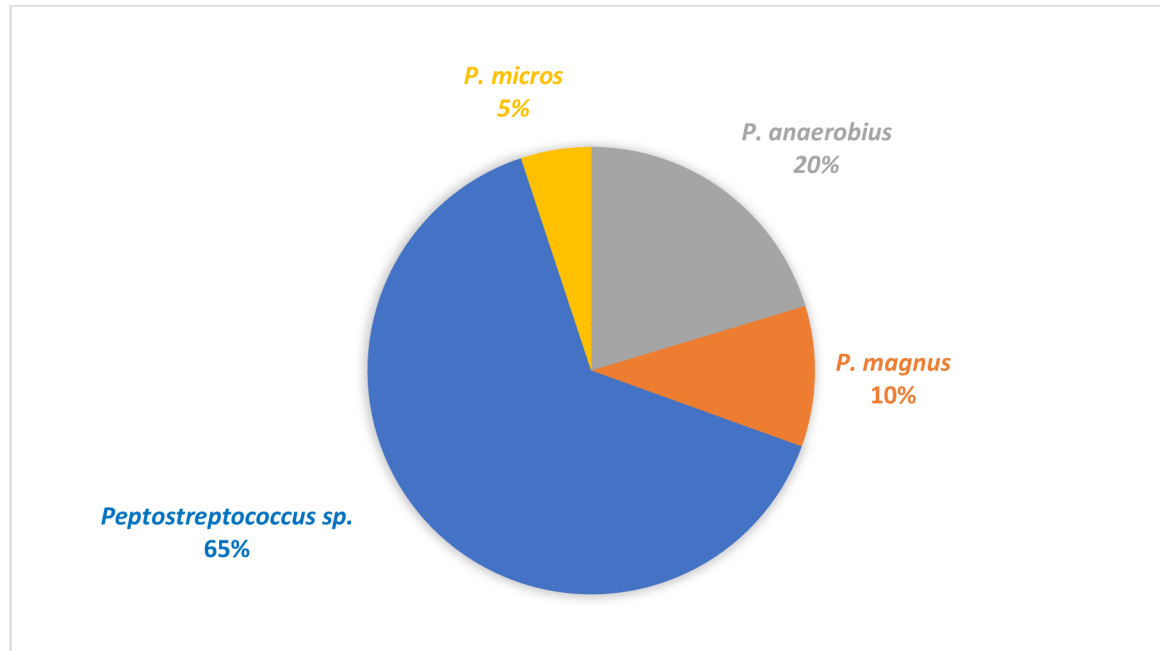
6.3.5. Anaerobní bakterie rodu *Peptostreptococcus*, profil citlivosti k ATB

Metodami stanovení citlivosti k ATB bylo testováno celkem 59 kmenů anaerobní bakterie rodu *Peptostreptococcus* v klinickém materiálu. Nejvíce izolovaných bakterií bylo zařazeno mezi *Peptococcus sp.* (38, 65 %). Nejčastěji izolovanou (konkrétní) bakterií byl *Peptostreptococcus anaerobius* (12, 20 %).

Tabulka 5: Anaerobní bakterie rodu *Peptostreptococcus* zachycené ve FN Brno v roce 2018

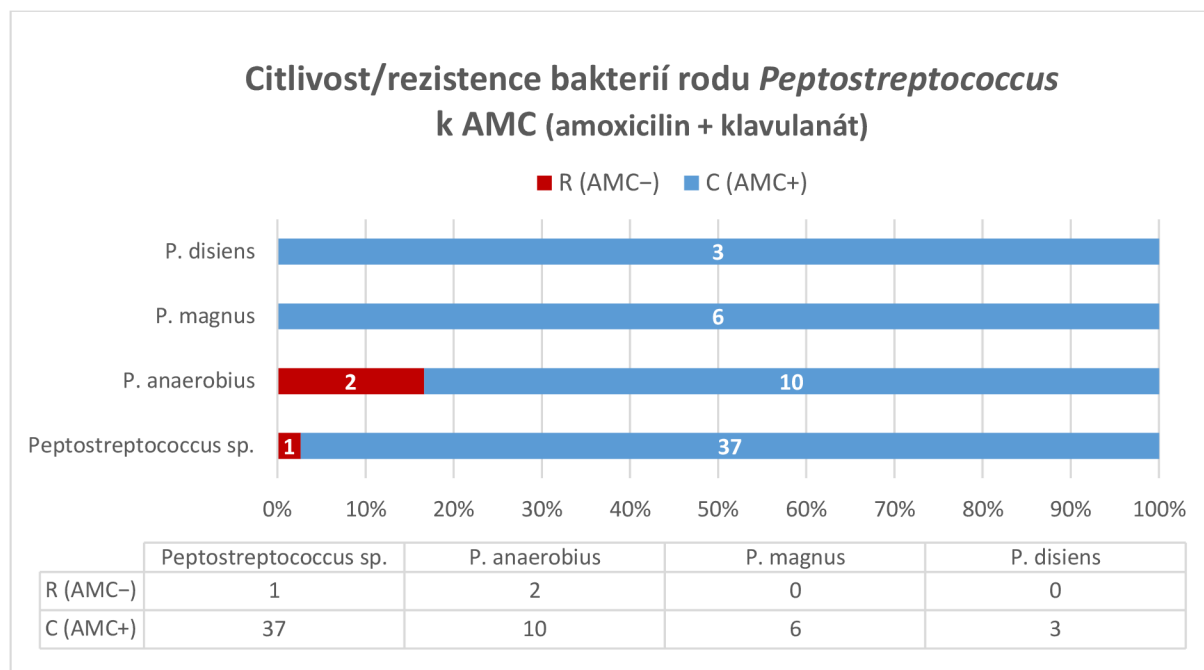
BAKTERIE	POČETI ZOLÁTŮ
<i>Peptostreptococcus sp.</i>	38
<i>P. anaerobius</i>	12
<i>P. magnus</i>	6
<i>P. micros</i>	3
Celkem	59

Graf 17: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Peptostreptococcus*



Převážná většina bakteriálních kultur byla testována na citlivost k AMC (graf 18), CLI (graf 19) a MTR (graf 20).

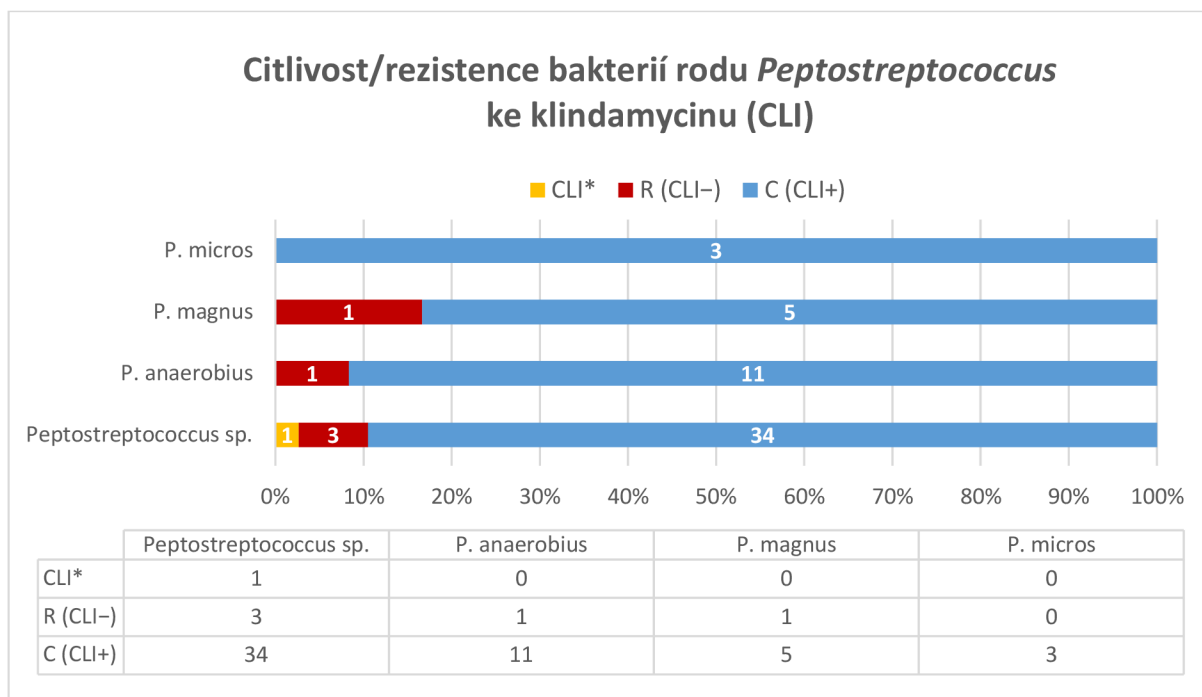
Graf 18: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptostreptococcus* k AMC (FN Brno, 2018)



Na citlivost k AMC bylo testováno 59/59 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Peptostreptococcus*. Celkem **94,9 %** izolátů (n = 56) bylo na AMC citlivých (C), **5,1 %** (n = 3) bylo rezistentních (R).

Rezistence k AMC byla zaznamenána u druhů *P. anaerobius* a *Peptostreptococcus sp.* Z celkového počtu *Peptostreptococcus sp.* bylo k AMC rezistentních **2,6 %** izolátů (1/38), u *P. anaerobius* dosahovala rezistence **16,7 %** (2/12).

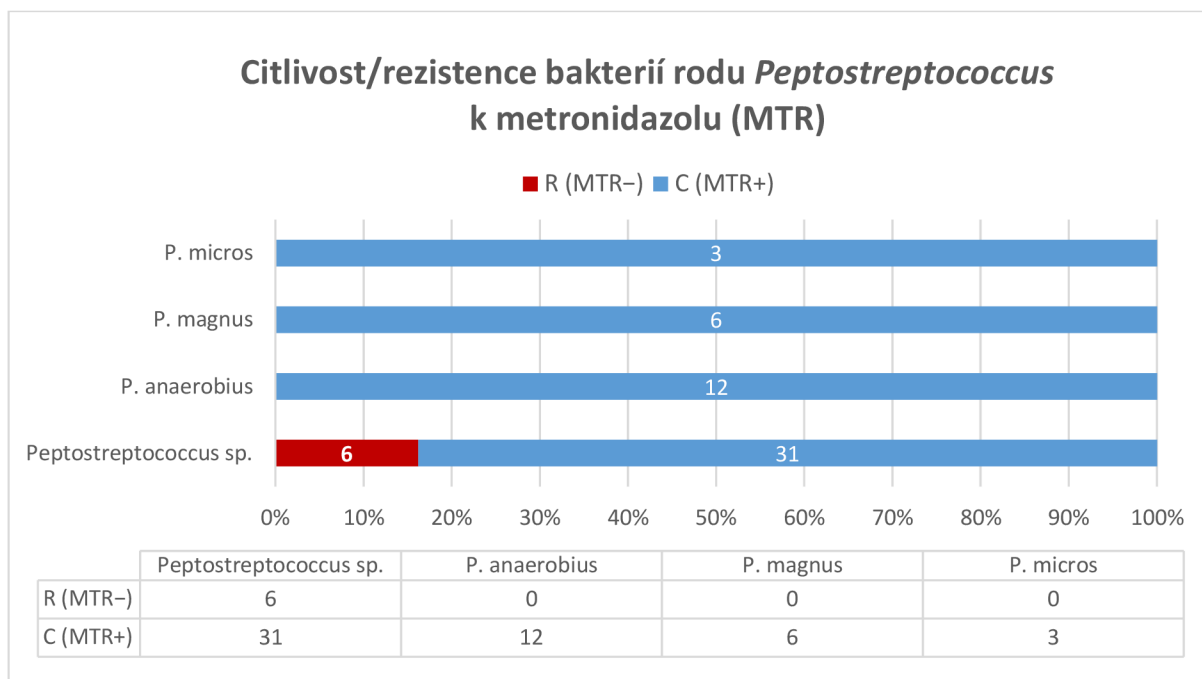
Graf 19: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptostreptococcus* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)



Na citlivost ke CLI bylo testováno 59/59 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Peptostreptococcus*. Celkem **89,8 %** izolátů (n = 53) bylo na CLI citlivých (C), **8,5 %** (n = 5) bylo rezistentních (R) a **1,7 %** mělo mezní výsledek (n = 1).

Rezistence ke CLI byla zaznamenána u téměř všech izolovaných druhů, výjimkou byl *P. micros*, který ke CLI vykazoval **100%** citlivost. Z celkového počtu *Peptostreptococcus sp.* bylo ke CLI rezistentních **7,9 %** izolátů (3/38), u *P. anaerobius* byla prokázána odolnost vůči CLI u **8,3 %** izolátů (1/12). Odolnost *P. magnus* dosahovala **16,7 %** (1/6).

Graf 20: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptostreptococcus* k metronidazolu (FN Brno, 2018)



Na citlivost k MTR bylo testováno 58/59 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Peptostreptococcus*. Celkem **89,7 %** izolátů (n = 52) bylo na MTR citlivých (C), **10,3 %** (n = 6) bylo rezistentních (R).

Rezistence k MTR byla zaznamenána pouze u *Peptostreptococcus sp.*, ostatní izolované druhy (*P. anaerobius*, *P. magnus*, *P. micros*) vykazovaly **100%** citlivost. Z celkového počtu *Peptostreptococcus sp.* bylo k MTR rezistentních **16,2 %** izolátů (6/37).

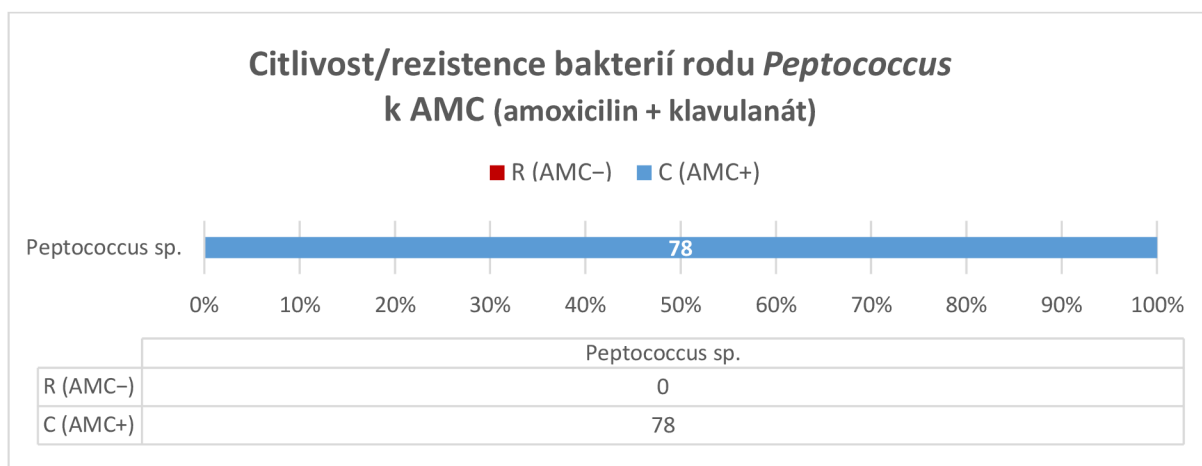
6.3.6. Anaerobní bakterie rodu *Peptococcus*, profil citlivosti k ATB

Metodami stanovení citlivosti k ATB bylo testováno celkem 79 kmenů anaerobní bakterie rodu *Peptococcus* v klinickém materiálu. Většina bakteriálních kultur byla testována na citlivost k AMC (graf 21), CLI (graf 22) a MTR (graf 23). Některé byly též testovány na citlivost k CMP a MER, jednalo se však jen o minimální množství (příloha 1).

Tabulka 6: Anaerobní bakterie rodu *Peptococcus* zachycené ve FN Brno v roce 2018

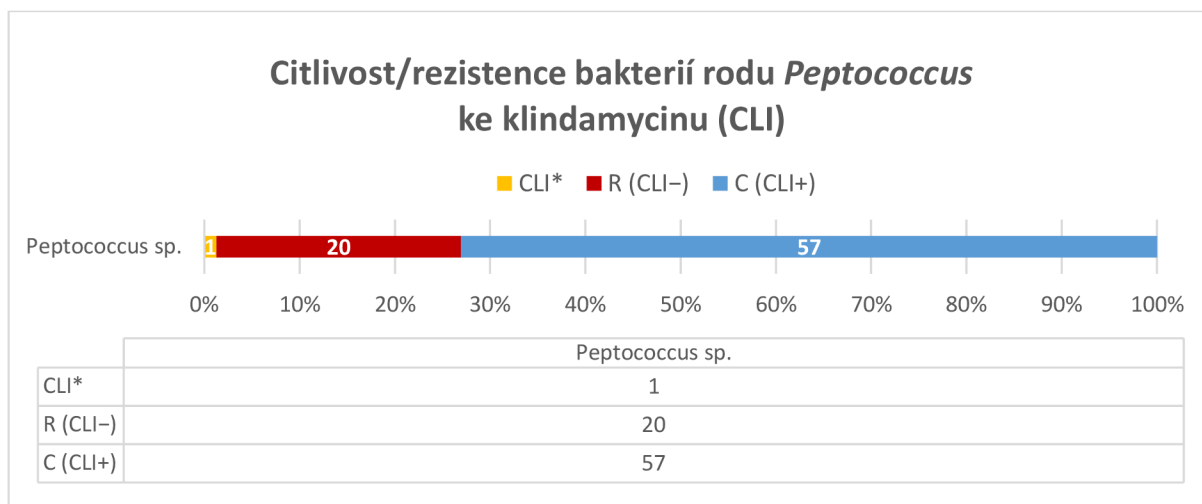
BAKTERIE	POČET IZOLÁTŮ
<i>Peptococcus sp.</i>	79
Celkem	79

Graf 21: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptococcus* k AMC (FN Brno, 2018)



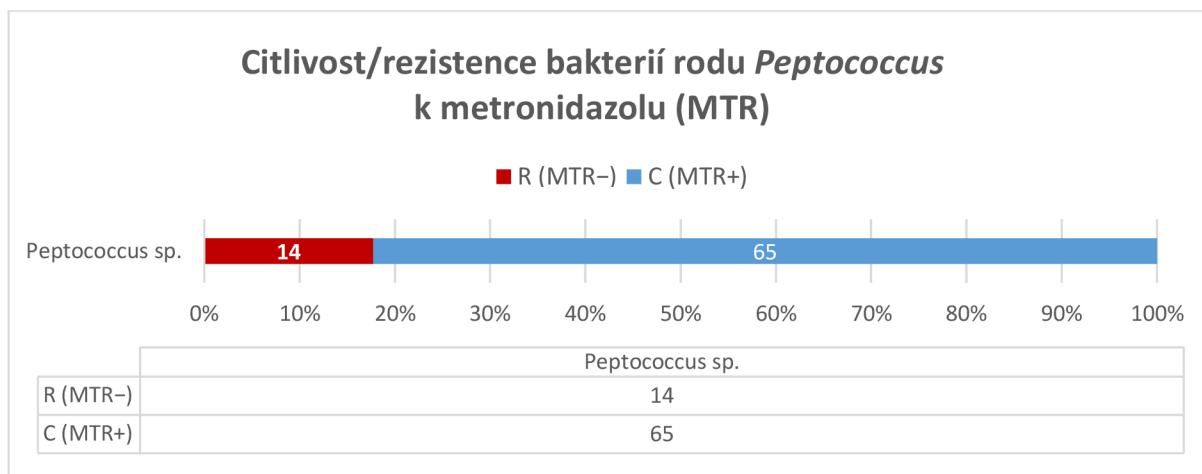
Na citlivost k AMC bylo testováno 78/79 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Peptococcus*. Všechny izoláty vykazovaly k AMC **100%** citlivost.

Graf 22: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptococcus* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)



Na citlivost ke CLI bylo testováno 78/79 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Peptococcus*. Celkem **73,1 %** izolátů (n = 57) bylo na CLI citlivých (C), **25,6 %** (n = 20) bylo rezistentních (R) a **1,3 %** mělo mezní výsledek (n = 1).

Graf 23: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptococcus* k metronidazolu (FN Brno, 2018)



Na citlivost k MTR bylo testováno 79/79 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Peptococcus*. Celkem **82,3 %** izolátů (n = 65) bylo na CLI citlivých (C), **17,7 %** (n = 14) bylo rezistentních (R).

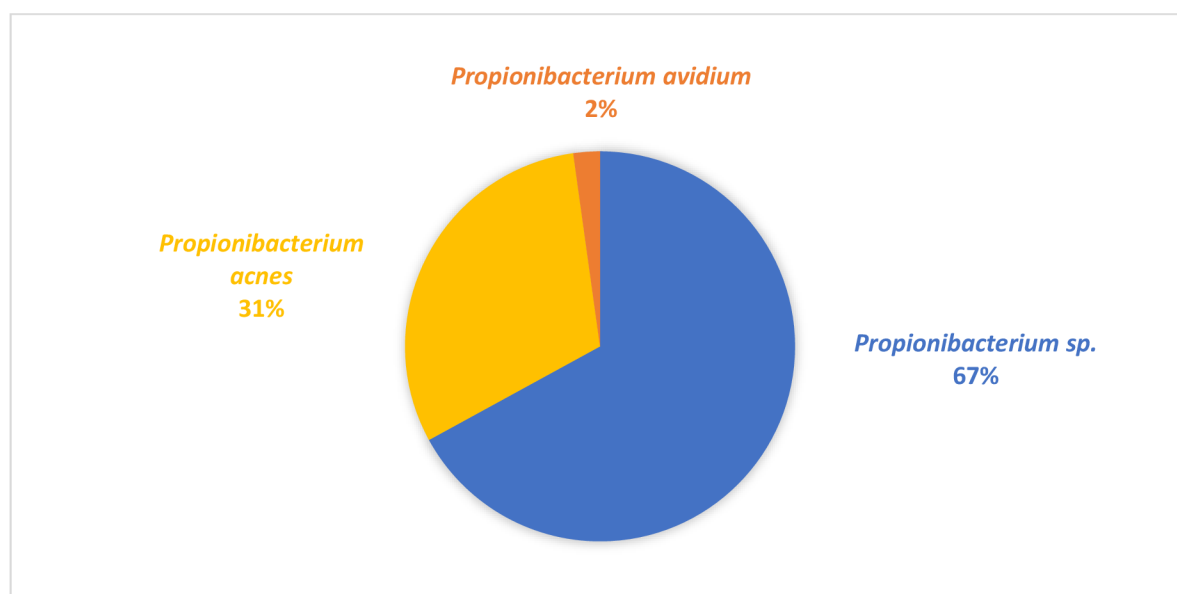
6.3.7. Anaerobní bakterie rodu *Propionibacterium*, profil citlivosti k ATB

Metodami stanovení citlivosti k ATB bylo testováno celkem 91 kmenů anaerobní bakterie rodu *Propionibacterium* v klinickém materiálu. Nejvíce izolátů bylo zařazeno mezi *Propionibacterium sp.* (61, 67 %). Nejčastěji izolovanou (konkrétní) bakterií bylo *Propionibacterium acnes* (28, 31 %).

Tabulka 7: Anaerobní bakterie rodu *Propionibacterium* zachycené ve FN Brno v roce 2018

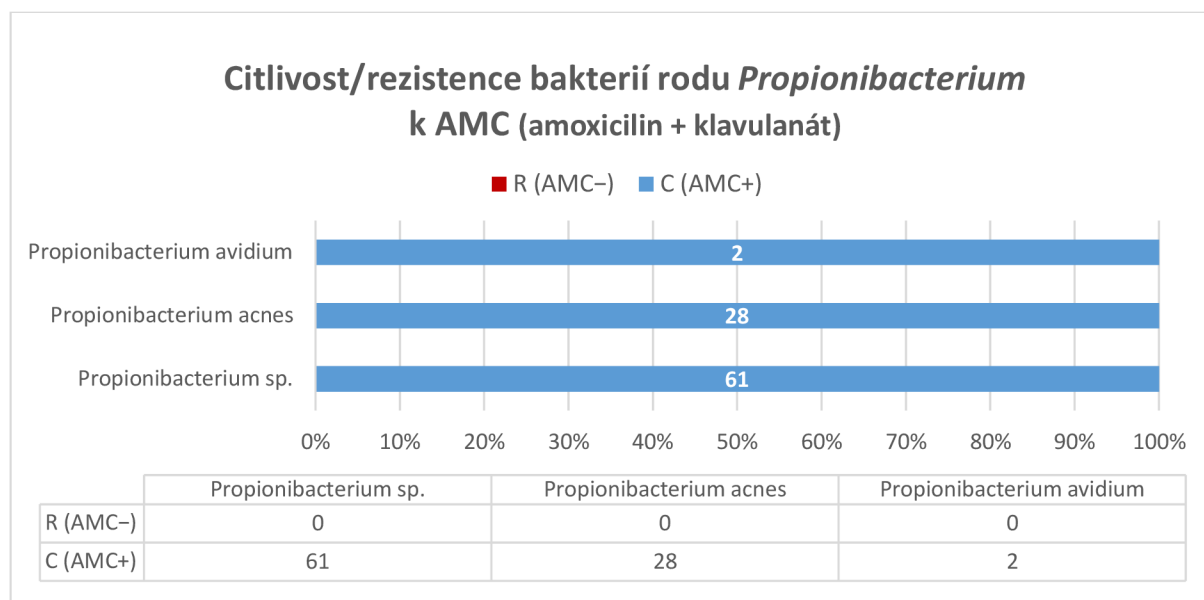
BAKTERIE	POČET IZOLÁTŮ
<i>Propionibacterium sp.</i>	61
<i>P. acnes</i>	28
<i>P. avidum</i>	2
Celkem	91

Graf 24: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Propionibacterium*



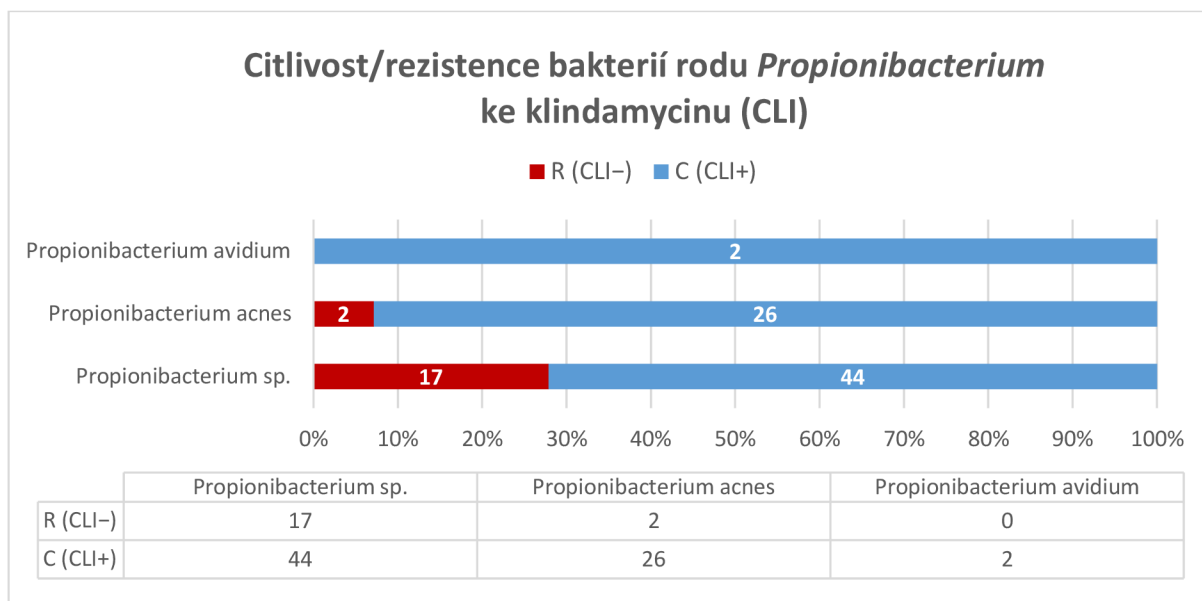
Převážná většina bakteriálních kultur byla testována na citlivost k AMC (graf 25), CLI (graf 26) a MTR (graf 27). Některé byly též testovány na citlivost k CMP a MER, jednalo se však jen o minimální množství (příloha 1).

Graf 25: Profil citlivosti bakterií rodu *Propionibacterium* k AMC (FN Brno, 2018)



Na citlivost k AMC bylo testováno 91/91 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Propionibacterium*. Všechny izoláty (*P. avidium*, *P. acnes*, *Propionibacterium sp.*) vykazovaly k AMC **100%** citlivost.

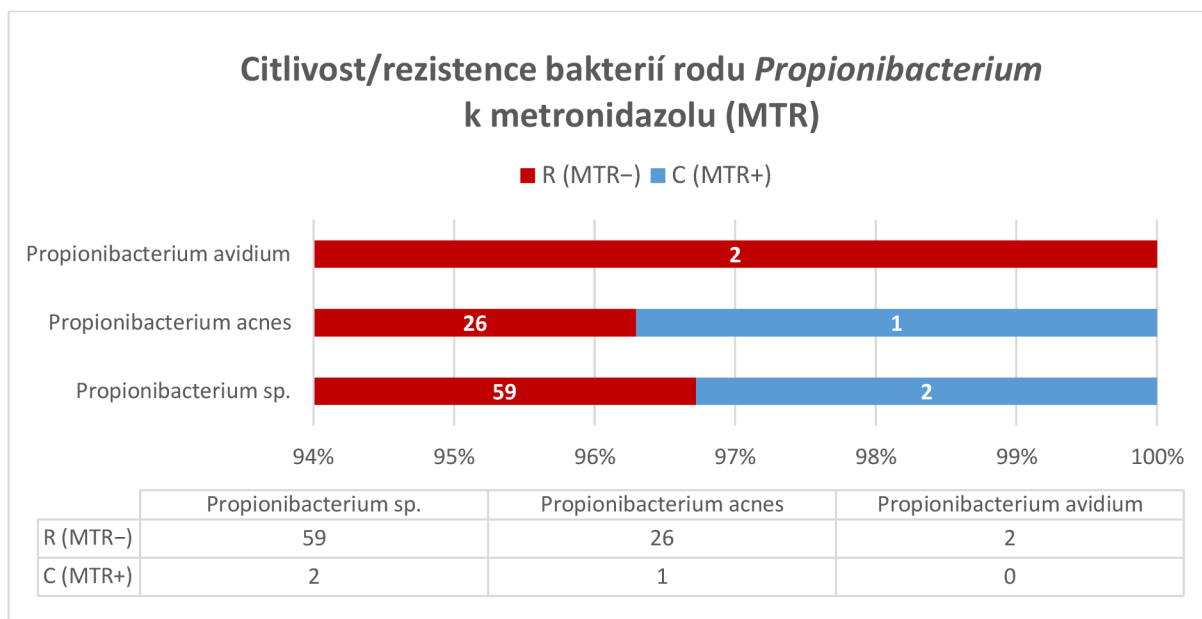
Graf 26: Profil citlivosti bakterií rodu *Propionibacterium* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)



Na citlivost ke CLI bylo testováno 91/91 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Propionibacterium*. Celkem **79,1 %** izolátů (n = 72) bylo na CLI citlivých (C), **20,9 %** (n = 19) bylo rezistentních (R).

Rezistence ke CLI byla zaznamenána u druhů *P. acnes* a *Propionibacterium sp.* Z celkového počtu *P. acnes* bylo ke CLI rezistentních **7,1 %** izolátů (2/28), u *Propionibacterium sp.* byla prokázána odolnost vůči CLI u **27,9 %** izolátů (17/61).

Graf 27: Profil citlivosti bakterií rodu *Propionibacterium* k metronidazolu (FN Brno, 2018)



Na citlivost k MTR bylo testováno 90/91 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Propionibacterium*. Celkem **3,3 %** izolátů (n = 3) bylo na MTR citlivých (C), **96,7 %** (n = 87) bylo rezistentních (R).

Rezistence k MTR byla zaznamenána u všech izolovaných druhů. Z celkového počtu *P. acnes* bylo k MTR rezistentních **96,3 %** izolátů (26/27), odolnost *Propionibacterium sp.* činila **96,7 %** (59/61). Rezistence *P. avidium* k MTR dosahovala **100 %**.

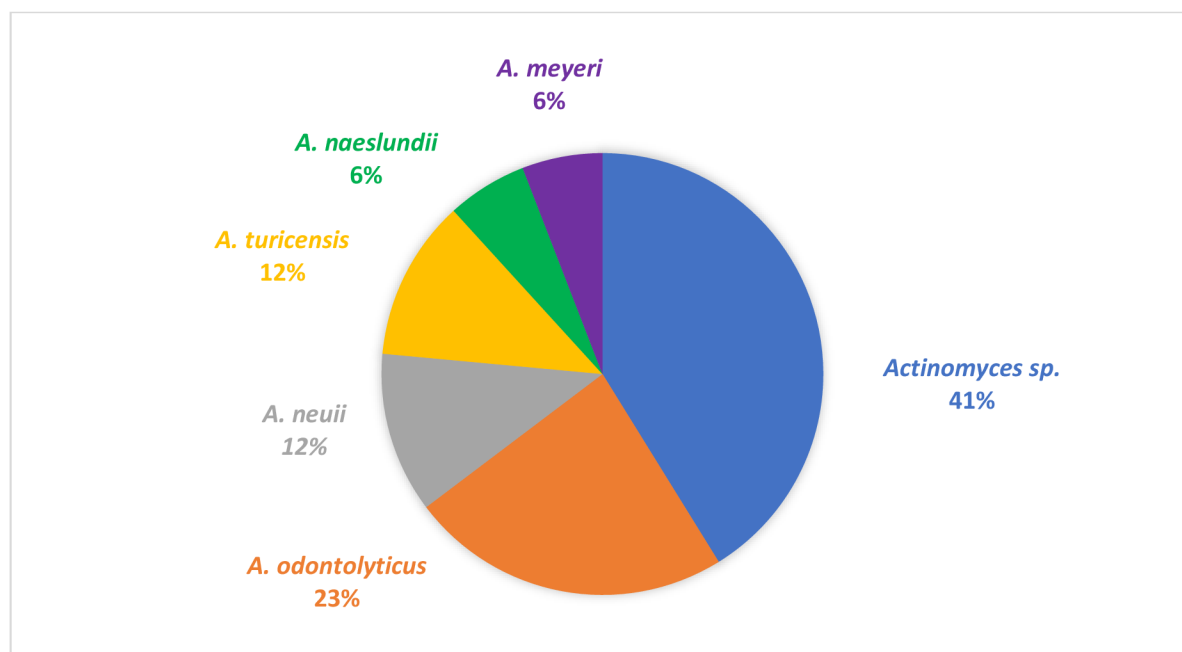
6.3.8. Anaerobní bakterie rodu *Actinomyces*, profil citlivosti k ATB

Metodami stanovení citlivosti k ATB bylo testováno celkem 17 kmenů anaerobní bakterie rodu *Actinomyces* v klinickém materiálu. Nejvíce izolátů bylo zařazeno mezi *Actinomyces sp.* (7, 41 %). Nejčastěji izolovanou (konkrétní) bakterií byl *Actinomyces odontolyticus* (4, 23 %).

Tabulka 8: Anaerobní bakterie rodu *Actinomyces* zachycené ve FN Brno v roce 2018

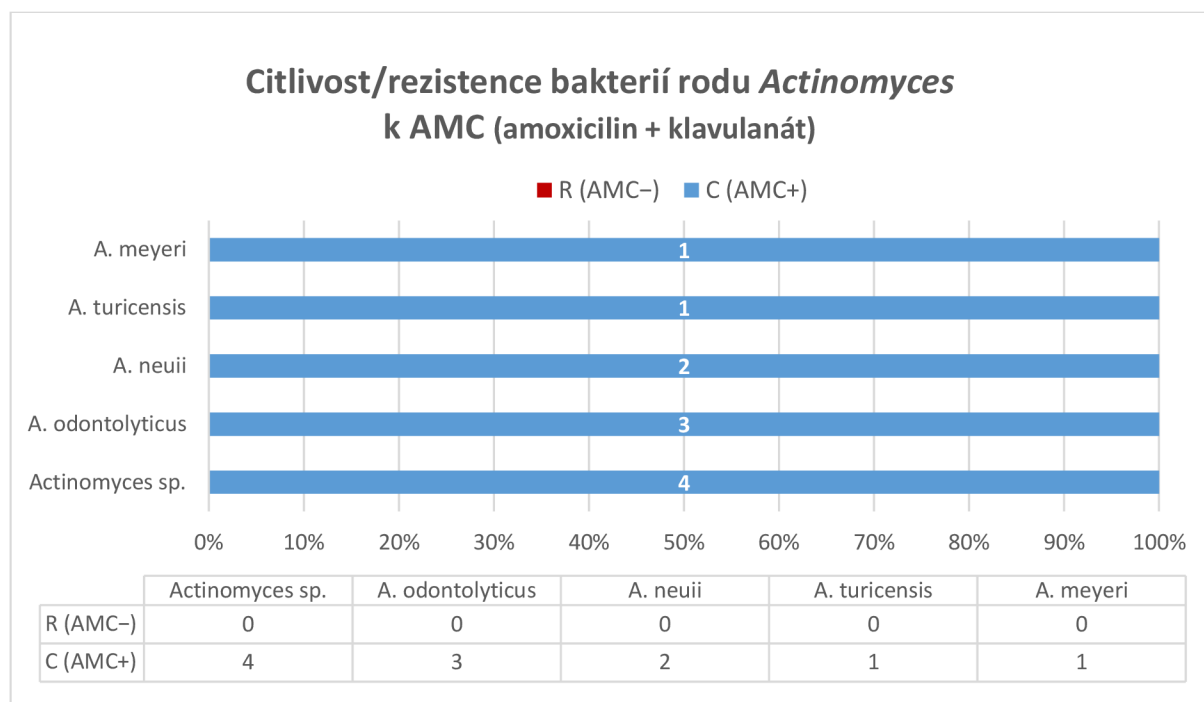
BAKTERIE	POČET IZOLÁTŮ
<i>Actinomyces sp.</i>	7
<i>A. odontolyticus</i>	4
<i>A. neuii</i>	2
<i>A. turicensis</i>	2
<i>A. naeslundii</i>	1
<i>A. meyeri</i>	1
Celkem	17

Graf 28: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Actinomyces*



Převážná většina bakteriálních kultur byla testována na citlivost k AMC (graf 29), CLI (graf 30) a MTR (graf 31). Některé byly též testovány na citlivost k CMP, VAN, CTX, PEN, CIP, TET aj., jednalo se však jen o malé množství.

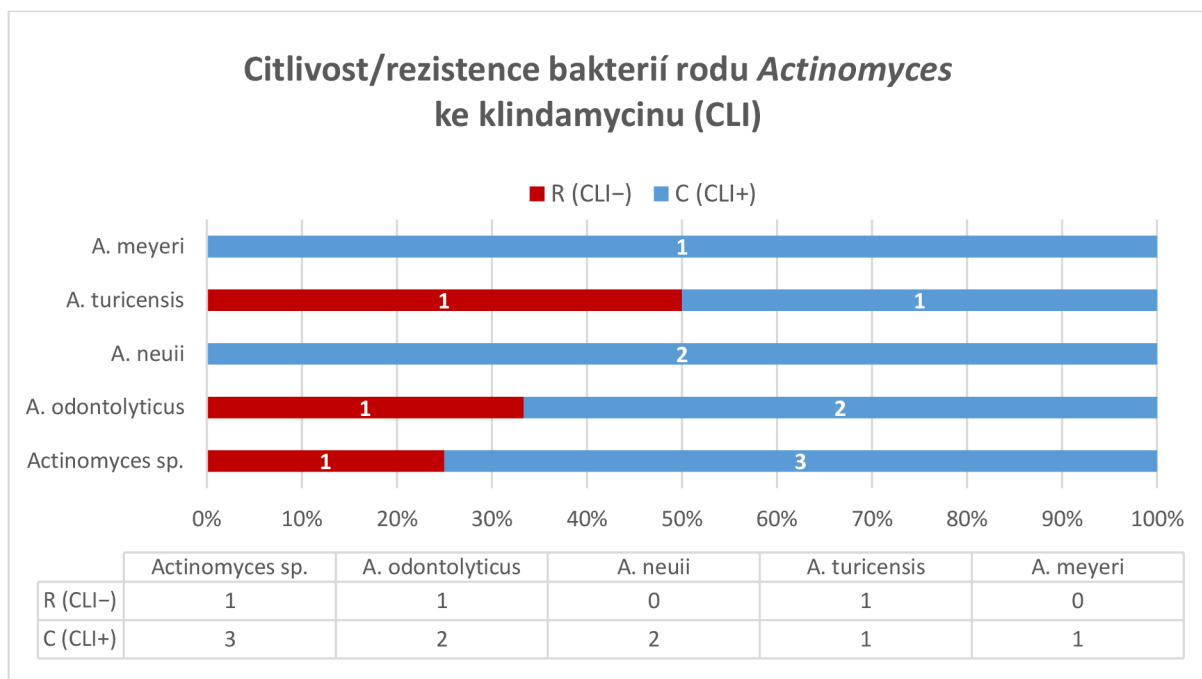
Graf 29: Profil citlivosti bakterií rodu *Actinomyces* k AMC (FN Brno, 2018)



Na citlivost k AMC bylo testováno 11/17 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Actinomyces*. Všechny testované izoláty³ vykazovaly k AMC **100%** citlivost.

³ Statistické hodnocení se nevztahuje na druhy s pouze jedním zástupcem

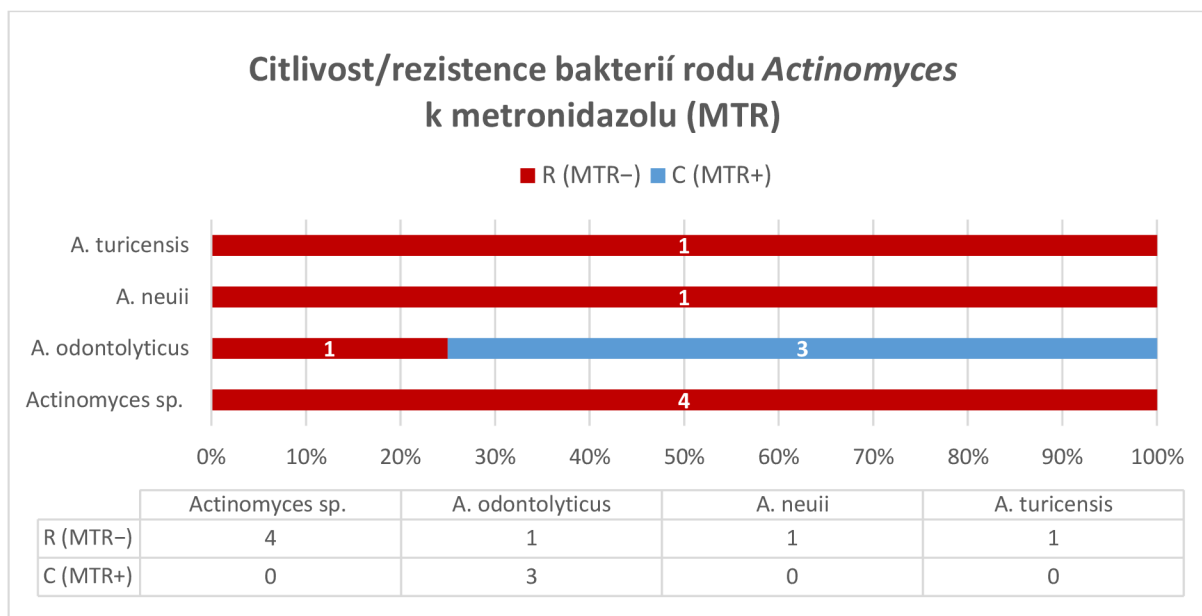
Graf 30: Profil citlivosti bakterií rodu *Actinomyces* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)



Na citlivost ke CLI bylo testováno 12/17 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Actinomyces*. Celkem **75 %** izolátů (n = 9) bylo na CLI citlivých (C), **25 %** (n = 3) bylo rezistentních (R).

Rezistence ke CLI byla zaznamenána u druhů *A. turicensis*, *A. odontolyticus* a *Actinomyces sp.* Naopak **100%** citlivost byla stanovena u *A. neuii* (2/2). Z celkového počtu *Actinomyces sp.* bylo ke CLI rezistentních **25 %** izolátů (1/4), odolnost *A. odontolyticus* činila **33,3 %** (1/3), u *A. turicensis* rezistence dosahovala **50 %** (1/2).

Graf 31: Profil citlivosti bakterií rodu *Actinomyces* k metronidazolu (FN Brno, 2018)



Na citlivost k MTR bylo testováno 11/17 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Actinomyces*. Celkem **27,3 %** izolátů (n = 3) bylo na MTR citlivých (C), **63,6 %** (n = 7) bylo rezistentních (R) a **9,1 %** mělo mezní výsledek (n = 1).

Rezistence k MTR byla zaznamenána u všech testovaných druhů. Z celkového počtu *A. odontolyticus* bylo k MTR rezistentních **25 %** izolátů (1/4). Druh *Actinomyces sp.* vykazoval k MTR **100 %** rezistenci (4/4).

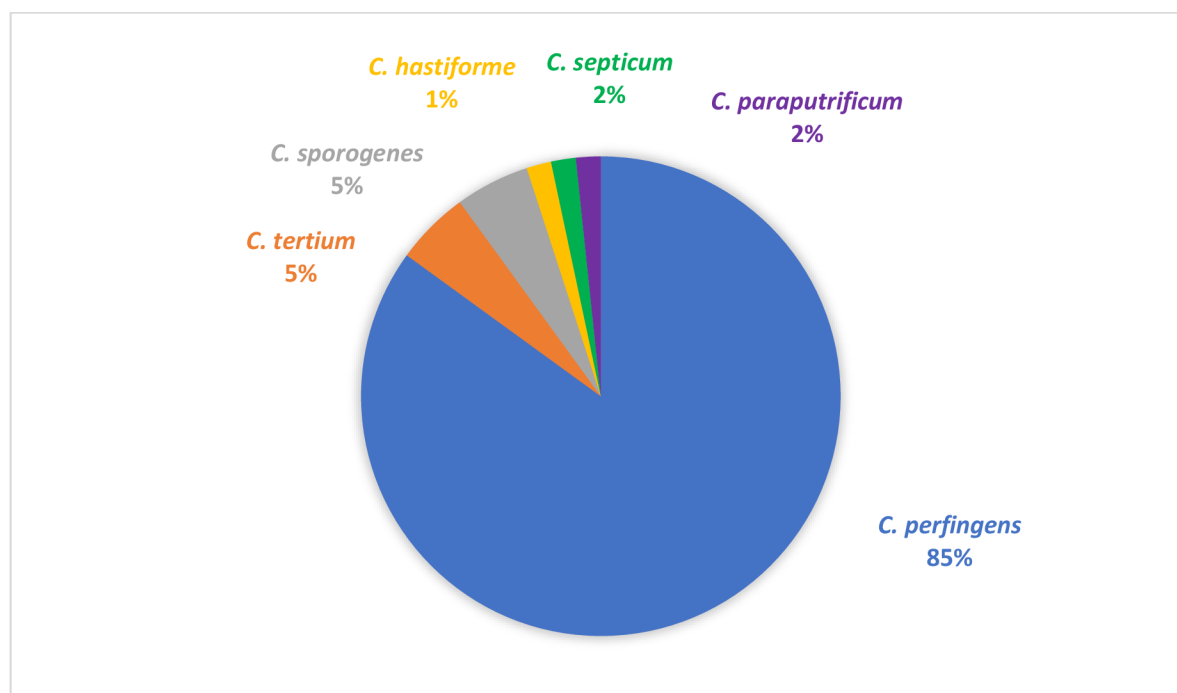
6.3.9. Anaerobní bakterie rodu *Clostridium*, profil citlivosti k ATB

Metodami stanovení citlivosti k ATB bylo testováno celkem 62 kmenů anaerobní bakterie rodu *Clostridium* v klinickém materiálu. Nejčastějším izolovaným druhem bylo *Clostridium perfringens* (51, 85 %).

Tabulka 9: Anaerobní bakterie rodu *Clostridium* zachycené ve FN Brno v roce 2018

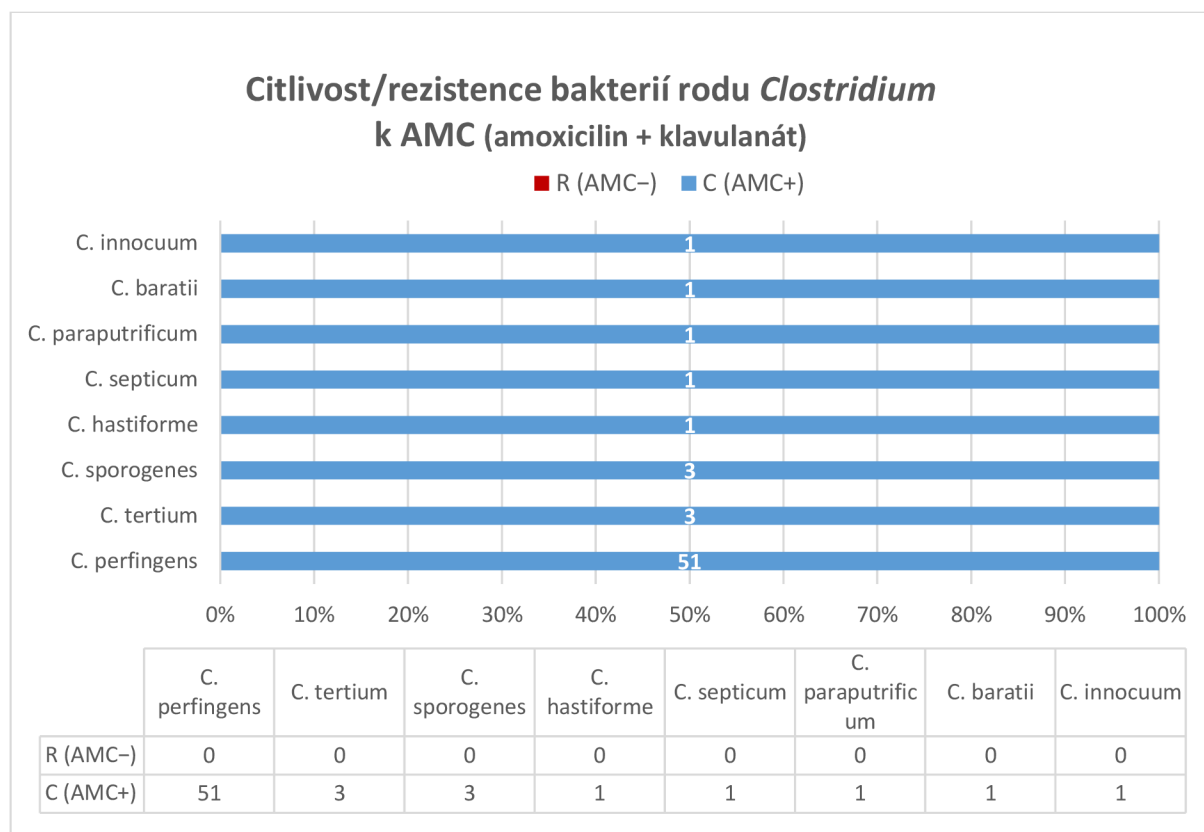
BAKTERIE	POČET IZOLÁTŮ
<i>Clostridium perfringens</i>	51
<i>C. tertium</i>	3
<i>C. sporogenes</i>	3
<i>C. hastiforme</i>	1
<i>C. septicum</i>	1
<i>C. paraputrificum</i>	1
<i>C. baratii</i>	1
<i>C. innocuum</i>	1
Celkem	62

Graf 32: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Clostridium*



Převážná většina bakteriálních kultur byla testována na citlivost k AMC (graf 33), CLI (graf 34) a MTR (graf 35). Některé byly též testovány na citlivost k CMP a MER, jednalo se však jen o minimální množství (příloha 1).

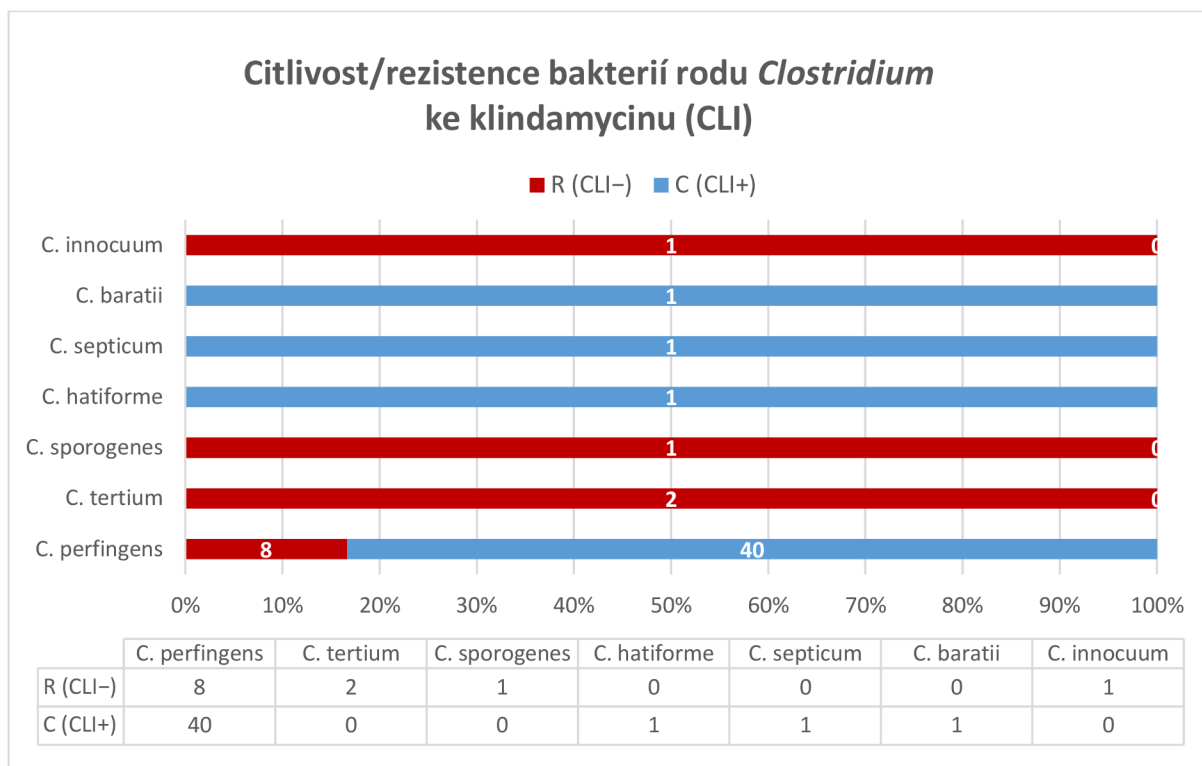
Graf 33: Profil citlivosti bakterií rodu *Clostridium* k AMC (FN Brno, 2018)



Na citlivost k AMC bylo testováno 62/62 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Clostridium*. Všechny testované izoláty⁴ vykazovaly k AMC **100%** citlivost.

⁴ Statistické hodnocení se nevztahuje na druhy s pouze jedním zástupcem

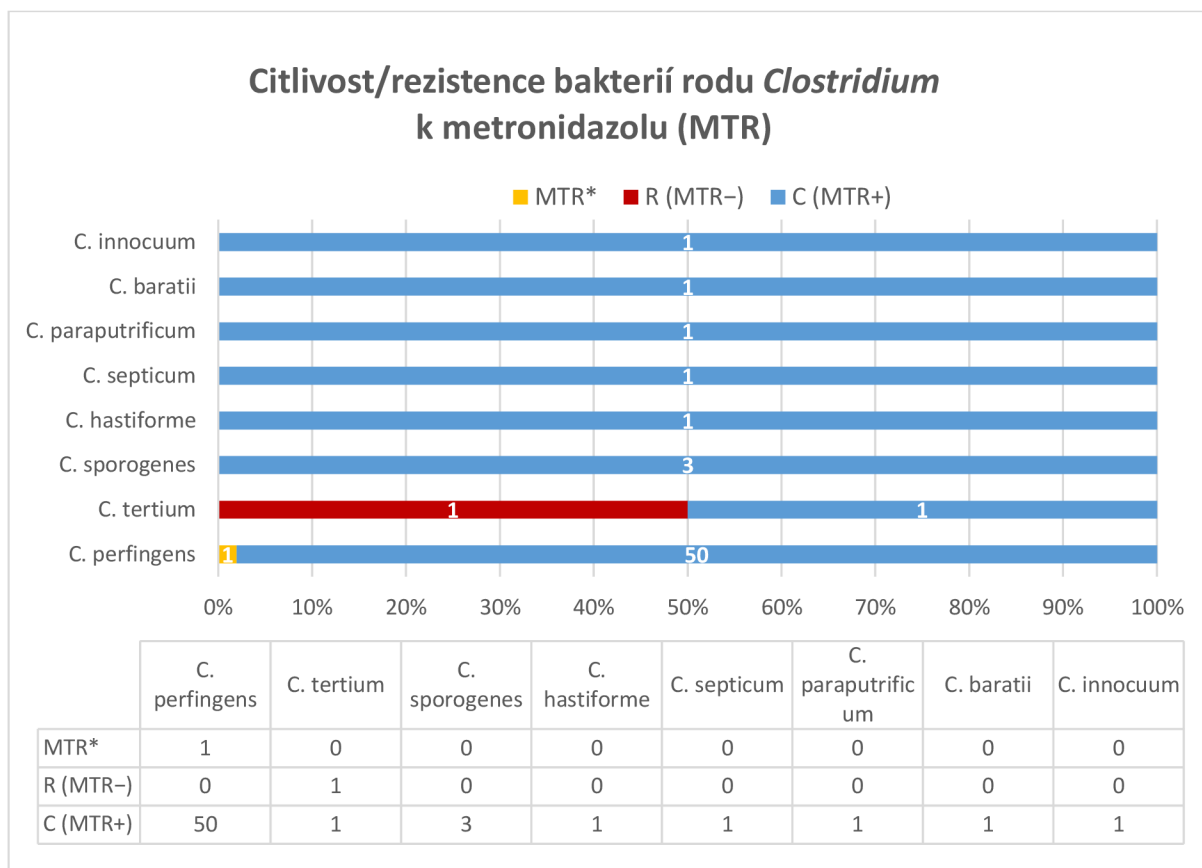
Graf 34: Profil citlivosti bakterií rodu *Clostridium* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)



Na citlivost ke CLI bylo testováno 61/62 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Clostridium*. Celkem **73,8 %** izolátů (n = 45) bylo na CLI citlivých (C), **21,3 %** (n = 13) bylo rezistentních (R) a **4,9 %** mělo mezní výsledek (n = 3).

Rezistence ke CLI byla zaznamenána u druhů *C. tertium*, *C. sporogenes*, *C. innocuum*, *C. perfringens*. Z celkového počtu *C. perfringens* bylo ke CLI rezistentních **16,7 %** izolátů (8/48). **100%** rezistenci k CLI vykazoval druh *C. tertium* (2/2).

Graf 35: Profil citlivosti bakterií rodu *Clostridium* k metronidazolu (FN Brno, 2018)



Na citlivost k MTR bylo testováno 61/62 patientských vzorků, pozitivních na nález bakterií rodu *Clostridium*. Celkem **96,7 %** izolátů (n = 59) bylo na MTR citlivých (C), **1,65 %** (n = 1) bylo rezistentních (R) a **1,65 %** mělo mezní výsledek (n = 1).

Rezistence k MTR byla zaznamenána pouze u *C. tertium*. Z celkového počtu *C. tertium* bylo k MTR rezistentních **50 %** izolátů (1/2).

7. ZÁVĚR

Práce měla za cíl představit anaerobní bakterie, nastínit odlišnosti v diagnostice, a především popsat různé metody stanovení citlivosti k antibiotikům a zároveň poukázat na důležitost těchto metod pro klinickou praxi. Cílem praktické části bylo vyhodnotit profil citlivosti anaerobů k antibiotikům ve FN Brno.

V úvodu teoretické části jsem se zabývala charakteristikou a rozdělením anaerobních bakterií. Anaerobní bakterie tvoří rozmanitou skupinu bakterií, jejichž společným rysem je anaerobní způsob života. S tím souvisí i náročnost a odlišné postupy v diagnostickém procesu, na které jsem se zaměřila v následující kapitole. Celý proces musí proběhnout za striktně anaerobních podmínek. K odběru vzorku je nutné využít např. speciální stříkačky se zátkou, ke kultivaci je nezbytné používat kultivační půdy s nízkým redox-potenciálem (okolo -200 mV) a provádět ji v anaerobním boxu či anaerostatu. Dodržování těchto postupů je prvním a velmi důležitým krokem k úspěšnosti identifikace anaerobního mikroorganismu. Pokud není anaerob odhalen, pacient nemůže být tudíž adekvátně léčen.

Důležitou roli mají metody stanovení citlivosti bakterií k ATB. Ve své práci jsem popsala různé metody, které se ke stanovení citlivosti využívají a nastínila jejich výhody/nevýhody pro klinické využití. Z kvantitativních metod jsem představila agarovou diluční metodu a metodu mikrodiluční, z kvalitativních metod diskový difúzní test a z kombinovaných metod E-test. Dle mého názoru je E-test nejlepší volbou. Překážkou pro běžné využívání tohoto testu v laboratořích bývá však jeho vysoká cena, proto laboratoře tuto metodu obvykle kombinují i s jinými metodami (např. DDT).

V závěru teoretické části jsem se zabývala přínosem výsledků poskytnutých metodami stanovení citlivosti k ATB. Kromě toho, že mají klíčovou roli při cílené ATB terapii, mohou také poskytnout cenné informace při volbě nejjvhodnější empirické léčby. K empirické léčbě, stejně jako k té cílené, je nutné přistupovat s co největší zodpovědností, jelikož nevhodná terapie může přispět ke zhoršení klinického stavu pacienta či podpořit vznik rezistence. Důležitou součástí práce bylo také upozornit na problematiku vzrůstající rezistence anaerobů k ATB a potřebu tuto rezistenci monitorovat, za účelem dosažení co nejefektivnější léčby.

Cílem praktické části bakalářské práce bylo vyhodnotit profil citlivosti anaerobních bakterií k antimikrobiálním látkám v konkrétní oblasti/zdravotnickém zařízení a poskytnout tak užitečné informace pro klinické pracovníky při volbě empirické léčby.

Práce byla zaměřena na vyhodnocení profilu citlivosti anaerobů k ATB ve Fakultní nemocnici Brno. V laboratořích OKM FN Brno bylo za rok 2018 testováno celkem 769 kmenů anaerobních bakterií v klinickém vzorku (viz tabulka 10). Více než třetinu izolátů (35,6 %) tvořily bakterie rodu *Bacteroides*. Významné zastoupení měly také rody *Prevotella* (17,4 %) a *Propionibacterium* (11,8 %).

Tabulka 10: Celkový počet testovaných pacientů, zastoupení jednotlivých bakteriálních rodů

Bakteriální kmen	N	% z celku
<i>Bacteroides</i>	274	35,6
<i>Prevotella</i>	134	17,4
<i>Propionibacterium</i>	91	11,8
<i>Peptococcus</i>	79	10,3
<i>Clostridium</i>	62	8,1
<i>Peptostreptococcus</i>	59	7,7
<i>Fusobacterium</i>	24	3,1
<i>Actinomyces</i>	17	2,2
<i>Veillonella</i>	9	1,2
<i>Anaerococcus</i>	8	1
<i>G+ anaerobní tyčinky a koky</i>	5	0,7
<i>Porphyromonas</i>	4	0,5
<i>Eubacterium</i>	3	0,4
Celkem	769	

Testování citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám bylo provedeno pomocí diskové difúzní metody nebo E-testu. Bakteriální kultury byly testovány především na citlivost k AMC, CLI a MTR, na srovnání účinnosti těchto ATB byla tudíž práce zaměřena.

100% citlivosti k AMC dosahovaly bakterie rodu *Propionibacterium*, *Peptococcus*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Anaerococcus*, *Porphyromonas* a *Eubacterium*. O něco nižší citlivost, ovšem stále vysokou, vykazovaly rody *Prevotella* (99,3 %), *Bacteroides* (97,8 %) a *Peptostreptococcus* (94,9 %). Z výsledků vyplývá, že kombinace beta-laktamového antibiotika amoxicilinu a inhibitoru β -laktamáz kyseliny klavulanové je vhodná pro léčbu většiny anaerobních infekcí.

100% citlivost ke klindamycinu byla stanovena pouze u rodů *Veillonella* a *Eubacterium*. Více než 80 % citlivosti dosahovaly rody *Peptostreptococcus* (89,8 %) a *Fusobacterium*

(83,3 %). Citlivosti 80 % se také blížily bakterie rodu *Propionibacterium* (79,1 %). Ostatní testované anaerobní bakterie vykazovaly citlivost nižší, tudíž využití CLI v empirické léčbě u těchto druhů není více či méně vhodné.

100% citlivost k metronidazolu byla prokázána u rodů *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Porphyromonas* a *Eubacterium*. Více než 90% citlivosti dosáhly bakterie rodu *Bacteroides* (98,9 %), *Prevotella* (97,7 %), *Clostridium* (96,7 %). Nad 80 % pak rody *Peptostreptococcus* (89,7 %) a *Peptococcus* (82,3 %). Výrazná rezistence byla pozorována u bakterií rodu *Propionibacterium* (96,7 %), ta je ovšem u těchto bakterií běžná a je nutné s ní při volbě vhodného ATB počítat. Z výsledků též vyplývá, že volbě MTR u infekcí způsobených bakteriemi rodu *Actinomyces*, je vhodné se též vyhnout. Rezistence zde dosahovala přes 60 %.

Tabulka 11: Profil citlivosti anaerobních bakterií, zachycených ve FN Brno v roce 2018

Bakteriální kmen	N	AMC		CLI		MTR	
		C	R	C	R	C	R
<i>Bacteroides</i>	274	97,8 %	1,5 %*	58,2 %	40,3 %*	98,9 %	1,1 %
<i>Prevotella</i>	134	99,3 %	0,7 %	64,9 %	35,1 %	97,7 %	2,3 %
<i>Fusobacterium</i>	24	100 %	0 %	83,3 %	16,7 %	100 %	0 %
<i>Veillonella</i>	9	100 %	0 %	100 %	0 %	100 %	0 %
<i>Peptostreptococcus</i>	59	94,9 %	5,1 %	89,8 %	8,5 %*	89,7 %	10,3 %
<i>Peptococcus</i>	79	100 %	0 %	73,1 %	25,6 %*	82,3 %	17,7 %
<i>Propionibacterium</i>	91	100 %	0 %	79,1 %	20,9 %	3,3 %	96,7 %
<i>Actinomyces</i>	17	100 %	0 %	75 %	25 %	27,3 %	63,6 %*
<i>Clostridium</i>	62	100 %	0 %	73,8 %	21,3 %*	96,7 %	1,65 %*
<i>Anaerococcus</i>	8	100 %	0 %	62,5 %	37,5 %	75 %	25 %
<i>Porphyromonas</i>	4	100 %	0 %	75 %	25 %	100 %	0 %
<i>Eubacterium</i>	3	100 %	0 %	100 %	0 %	100 %	0 %

* C + R netvoří 100 %, jelikož nejsou přičteny mezní výsledky

8. DISKUZE

Anaerobní bakterie jsou přirozenou součástí lidského mikrobiomu, přesto se mohou podílet na celé řadě smíšených endogenních infekcí. Role těchto bakterií v infekci může být kvůli odlišným nárokům na zpracování či neadekvátnímu nasazení empirické léčby přehlédnuta. I když tyto bakterie většinou nemají výhradní postavení při vzniku infekce a pacienta neohrožují bezprostředně na životě, mohou ovšem značně komplikovat léčbu. Ráda bych tudíž vyzdvihla, že schopnost předvídat přítomnost anaerobního agens v klinickém materiálu (především u chronických infekcí/ran) a s tím související následná adekvátní manipulace se vzorkem, má svůj podíl na úspěšnosti terapie a není radno tento fakt podceňovat.

Významnou součástí úspěšnosti antibiotické terapie představuje testování citlivosti bakterií k antimikrobiálním látkám. Výsledky, které tato testování přináší, mají důležitou roli nejen v cílené terapii, ale i v té empirické. Bohužel nejen ze studie E. Goldsteina [11] vyplývá, že stanovení citlivosti anaerobních bakterií k ATB pro klinickou praxi není z mnoha důvodů běžné a empirická terapie je nasazována na základě dat, která nejsou relevantní pro danou oblast či zdravotnické zařízení. Toto jednání bývá mimo jiné dané domněnkou, že citlivost anaerobů k ATB se v podstatě nemění a empirická léčba se dá dobře odhadnout, to ovšem považuji za chybu. Myslím si, že je namístě zdůraznit, že tyto postupy, stejně jako neodhalení anaerobů v místě infekce, mohou nahrávat zhoršení klinického stavu pacienta, a především vést k nárůstu rezistence. Za překážku v odhalování vzrůstající rezistence u anaerobů a boji proti ní považuji také fakt, že není vyvinut systém pro celonárodní dohled. Proto považuji za klíčové, aby nemocnice dohled prováděly samy.

Trend vzrůstající rezistence anaerobů byl již zdokumentován v řadě studiích od různých autorů [1, 10, 11, 12, 18, 19, 20 aj.]. Největší míra vzrůstu rezistence u anaerobních bakterií byla zaznamenána především u antibiotika klindamycinu a kmenů *Bacteroides*, *Prevotella*, *Propionibacterium* či *Fusobacterium*. Gajdác [10] uvádí, že CLI byl velmi oblíbený pro léčbu anaerobních infekcí, ovšem za posledních 40–50 let rezistence k tomuto ATB podstatně vzrostla, např. u rodu *Bacteroides* přibližně o 30–40 %, u *Prevotella* okolo 10–40 %. Společně s dalšími autory se shoduje, že CLI již není vhodnou volbou pro léčbu infekcí, které byly způsobeny bakteriemi rodu *Bacteroides* (především pak u druhu *B. fragilis*) či rodu *Prevotella*.

Výsledky mé práce (rezistence rodu *Bacteroides* 40,3 %, *Prevotella* 35,1 %), mě přivedly ke stejnému závěru a potvrdily tak nevhodnost tohoto antibiotika pro empirickou

léčbu. Nord [19] ve své práci upozornil na vzrůstající rezistenci bakterií rodu *Propionibacterium* (především pak u druhu *P. acnes*), kterou spojoval s předchozí léčbou akné. Evropská studie [20] zaměřená na *P. acnes*, na které se též podílel, odhalila rezistenci ke CLI 15,1 %. V mé práci jsem u rodu *Propioibacterium* zaznamenala rezistenci necelých 21 %, rezistence u druhu *P. acnes* činila 7 %. I když rezistence nedosahovala vysokých hodnot, neměla by být určité přehlížena, ba naopak její další vývoj by měl být sledován, a to především právě u pacientů po předchozí léčbě akné. Stejně jako jiní autoři, jsem určitý stupeň rezistence ke CLI zaznamenala také u rodu *Fusobacterium* (16,7 %), *Peptococcus* (25,6 %), *Clostridium* (21,3 %) aj. Je patrné, že i u těchto bakterií CLI ztrácí svou spolehlivost a výsledek léčby může být mnohdy nepředvídatelný.

Trend vzrůstající rezistence (nejen u aerobů, ale i anaerobů) obecně považuji za velký celosvětový problém a jsem ráda, že se toto téma v poslední době dostalo do popředí. Je důležité mít na paměti, že metody stanovení citlivosti nám poskytují schopnost tento trend předvídat, a především nám na základě svých výsledků umožňují cílenou a efektivní léčbu, která má potenciál tento trend vzrůstající rezistence zpomalit. Proto bych nakonec ještě jednou chtěla vyzdvihnout důležitost těchto metod a vyzvat k jejich častějšímu využívání pro klinickou praxi.

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1: *Clostridium perfringens*

Obrázek 2: *Actinomyces israelii*

Obrázek 3: *Propionibacterium acnes*

Obrázek 4: *Bacteroides fragilis*

Obrázek 5: *Prevotella intermedia*

Obrázek 6: Anaerobní box

Obrázek 7: Anaerostat

Obrázek 8: Mikrotitrační destička

Obrázek 9: Agarová diluční metoda

Obrázek 10: Diskový difúzní test

Obrázek 11: Proužek E-testu

Obrázek 12: Detekce MIC pomocí E-testu

Tabulka 1: Anaerobní bakterie rodu *Bacteroides* zachycené ve FN Brno v roce 2018

Tabulka 2: Anaerobní bakterie rodu *Prevotella* zachycené ve FN Brno v roce 2018

Tabulka 3: Anaerobní bakterie rodu *Fusobacterium* zachycené ve FN Brno v roce 2018

Tabulka 4: Anaerobní bakterie rodu *Veillonella* zachycené ve FN Brno v roce 2018

Tabulka 5: Anaerobní bakterie rodu *Peptostreptococcus* zachycené ve FN Brno v roce 2018

Tabulka 6: Anaerobní bakterie rodu *Peptococcus* zachycené ve FN Brno v roce 2018

Tabulka 7: Anaerobní bakterie rodu *Propionibacterium* zachycené ve FN Brno v roce 2018

Tabulka 8: Anaerobní bakterie rodu *Actinomyces* zachycené ve FN Brno v roce 2018

Tabulka 9: Anaerobní bakterie rodu *Clostridium* zachycené ve FN Brno v roce 2018

Graf 1: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Bacteroides*

Graf 2: Profil citlivosti bakterií rodu *Bacteroides* k AMC (FN Brno, 2018)

Graf 3: Profil citlivosti bakterií rodu *Bacteroides* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)

Graf 4: Profil citlivosti bakterií rodu *Bacteroides* k metronidazolu (FN Brno, 2018)

Graf 5: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Prevotella*

Graf 6: Profil citlivosti bakterií rodu *Prevotella* k AMC (FN Brno, 2018)

Graf 7: Profil citlivosti bakterií rodu *Prevotella* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)

Graf 8: Profil citlivosti bakterií rodu *Prevotella* k metronidazolu (FN Brno, 2018)

Graf 9: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Fusobacterium*

Graf 10: Profil citlivosti bakterií rodu *Fusobacterium* k AMC (FN Brno, 2018)

Graf 11: Profil citlivosti bakterií rodu *Fusobacterium* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)

Graf 12: Profil citlivosti bakterií rodu *Fusobacterium* k metronidazolu (FN Brno, 2018)

Graf 13: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Veillonella*

Graf 14: Profil citlivosti bakterií rodu *Veillonella* k AMC (FN Brno, 2018)

Graf 15: Profil citlivosti bakterií rodu *Veillonella* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)

Graf 16: Profil citlivosti bakterií rodu *Veillonella* k metronidazolu (FN Brno, 2018)

Graf 17: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Peptostreptococcus*

Graf 18: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptostreptococcus* k AMC (FN Brno, 2018)

Graf 19: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptostreptococcus* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)

Graf 20: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptostreptococcus* k metronidazolu (FN Brno, 2018)

Graf 21: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptococcus* k AMC (FN Brno, 2018)

Graf 22: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptococcus* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)

Graf 23: Profil citlivosti bakterií rodu *Peptococcus* k metronidazolu (FN Brno, 2018)

Graf 24: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Propionibacterium*

Graf 25: Profil citlivosti bakterií rodu *Propionibacterium* k AMC (FN Brno, 2018)

Graf 26: Profil citlivosti bakterií rodu *Propionibacterium* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)

Graf 27: Profil citlivosti bakterií rodu *Propionibacterium* k metronidazolu (FN Brno, 2018)

Graf 28: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Actinomyces*

Graf 29: Profil citlivosti bakterií rodu *Actinomyces* k AMC (FN Brno, 2018)

Graf 30: Profil citlivosti bakterií rodu *Actinomyces* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)

Graf 31: Profil citlivosti bakterií rodu *Actinomyces* k metronidazolu (FN Brno, 2018)

Graf 32: Procentuální zastoupení bakteriálních druhů rodu *Clostridium*

Graf 33: Profil citlivosti bakterií rodu *Clostridium* k AMC (FN Brno, 2018)

Graf 34: Profil citlivosti bakterií rodu *Clostridium* ke klindamycinu (FN Brno, 2018)

Graf 35: Profil citlivosti bakterií rodu *Clostridium* k metronidazolu (FN Brno, 2018)

Přílohy

Příloha 1: Profil citlivost vybraných anaerobů k CMP a MER (FN Brno, 2018)

Bakteriální kmen	N	CMP		MER	
		C	R	C	R
<i>Bacteroides</i>	7	100 %	0 %	85,7 %	14,3 %
<i>Clostridium</i>	7	100 %	0 %	100 %	0 %
<i>Fusobacterium</i>	3	100 %	0 %	100 %	0 %
<i>Peptococcus</i>	3	66,7 %	33,3 %	100 %	0 %
<i>Prevotella</i>	2	100 %	0 %	100 %	0 %
<i>Propionibacterium</i>	15	100 %	0 %	100 %	0 %
<i>Actinomyces</i>	4	100 %	0 %	-	-

Seznam použité literatury

1. ALDRIDGE, Kenneth E. 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* [online]. USA, 2001, April, 45(4), 1238–1243 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC90449/>
2. BALEJOVÁ, Magda. Předběžná identifikace anaerobních bakterií. Státní zdravotní ústav [online]. Praha, 2007 [cit. 2020-01-26]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/predbezna-identifikace-anaerobnich-bakterii>
3. BARICH, Daniel. Bifidobacterium. MicrobeWiki [online]. 2010, July [cit. 2019-11-03]. Dostupné z: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium>
4. BEDNÁŘ, Marek. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. 1996. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.
5. BENEŠ, Jiří. Infekční lékařství. Praha: Galén, c2009. ISBN 978-80-7262-644-1.
6. BROOK, Itzhak. 184 - Anaerobic Bacteria. *Infectious Diseases* [online]. Fourth Edition. Elsevier, 2017, s. 1628-1644 [cit. 2019-10-18]. ISBN 9780702062858. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702062858001842>
7. BROOK, Itzhak, Hannah M. WEXLER a Ellie J. C. GOLDSTEIN. Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2013 [cit. 2020-02-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719496/>
8. CHMELARĚ, Dittmar. Citlivost na vybraná antibiotika a produkce endotoxinu u bakterií Bacteroides fragilis group [online]. Brno, 2008 [cit. 2019-12-07]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/0kqqe6/>. Disertační práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce doc. RNDr. Miroslav Němec, CSc.
9. FERRY, Tristan, Florent VALOUR, Judith KARSENTY, et al. Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infection and Drug Resistance* [online]. [cit. 2019-11-03]. DOI: 10.2147/IDR.S39601. ISSN 1178-6973. Dostupné z: <http://www.dovepress.com/actinomycosis-etiology-clinical-features-diagnosis-treatment-and-manag-peer-reviewed-article-IDR>

10. GAJDÁCS, Márió, Gabriella SPENGLER a Edit URBÁN. Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology? *Antibiotics: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)* [online]. 2017 [cit. 2020-02-21]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5745468/>
11. GOLDSTEIN, Ellie J.C., et al. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III. *Anaerobe* [online]. 2008, April, 14(2), 68-72 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996408000048>
12. GOLDSTEIN, Ellie J.C., et al. Resistance Trends in Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria, Part II. *Clinical Microbiology Newsletter* [online]. 2011, 15 January, 33(2), 9-15 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196439910000589>
13. JURÁNKOVÁ, Jana. *Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi: bakalářský obor Zdravotní laborant*. Brno: Masarykova univerzita, 2011. ISBN 978-80-210-5657-2.
14. KOUKALOVÁ, Dagmar. *Praktické cvičení z lékařské mikrobiologie I*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2013. ISBN 978-80-244-3395-0.
15. *Laboratorní příručka*. Laborař Krevního centra s.r.o. [online]. Frýdek-Místek, 2019 [cit. 2020-01-20]. Dostupné z: <https://www.krevnicentrum.cz/laboratorni-prirucka/HVEZDAAAEA.htm>
16. MELTER, Oto a Annika MALMGREN. *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*. Praha: Karolinum, 2014. ISBN 978-80-246-2414-3.
17. MURRAY, Patrick R., Ken S. ROSENTHAL a Michael A. PFALLER. *Medical microbiology*. 8th edition. Philadelphia, PA: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-323-29956-5.
18. NAGY, Erzsébet, et al. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2011, March, 17(3), 371-379 [cit. 2020-04-09]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14638702>
19. NORD, Carl Erik a Cristina OPRICA. Antibiotic resistance in *Propionibacterium acnes*: Microbiological and clinical aspects. *Anaerobe* [online]. Sweden, 2006, 26 September, 12(5-6), 207-210 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996406000540?via%3Dihub>

20. OPRICA, Cristina a C. E. NORD. European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2005, March, 11(3), 204-213 [cit. 2020-04-19]. Dostupné z: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)62075-9/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)62075-9/fulltext)
21. SCHUETZ, Audrey N. Antimicrobial Resistance and Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Oxford Academia: Clinical Infectious Diseases* [online]. 2014 [cit. 2020-02-21]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/59/5/698/2895712>
22. VOTAVA, Miroslav, et al. Lékařská mikrobiologie II: přehled vyšetřovacích metod v lékařské mikrobiologii. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2272-8.
23. VOTAVA, Miroslav, et al. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.
24. VOTAVA, Miroslav, et al. Lékařská mikrobiologie: vyšetřovací metody. Brno: Neptun, c2010. ISBN 978-80-86850-04-7.
25. VŠCHTE. MALDI-TOF MS. VŠCHTE PRAHA: Miniatlasy vad [online]. Praha, 2016 [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <http://umtk.vscht.cz/miniatlas-vad/metody/maldi-tof-ms/>
26. ZWYRTKOVÁ, Tereza. Srovnání tří způsobů kultivace anaerobních patogenních bakterií [online]. Ostrava, 2011 [cit. 2020-01-23]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/hosaf8/?lang=en>

Zdroje obrázků

27. *Actinomyces israelii*. In: Introduction To Clinical Microbiology [online]. 1995 [cit. 2020-01-16]. Dostupné z:
https://www.uaz.edu.mx/histo/pathology/ed/ch_9b/path/00001503.htm
28. Agarová diluční metoda. In: Annals of Tropical Medicine and Public Health [online]. [cit. 2020-04-09]. Dostupné z:
http://www.atmph.org/viewimage.asp?img=AnnTropMedPublicHealth_2012_5_3_178_9_8609_u1.jpg
29. Anaerobní box, Anaerostat, Diskový difúzní test – vlastní zdroj
30. *Bacteroides fragilis*. In: Microbiologyinpictures.com [online]. 2015 [cit. 2020-01-16]. Dostupné z: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-negative/bacteroides-fragilis.html>
31. *Clostridium perfringens*. In: Alchetron [online]. 2019 [cit. 2020-01-16]. Dostupné z: <https://alchetron.com/Clostridium-perfringens#clostridium-perfringens-559bcd33-1418-46ef-abfd-57d2b3a3c3c-resize-750.jpeg>
32. Detekce MIC pomocí E-testu. In: BioMérieux [online]. [cit. 2020-04-09]. Dostupné z: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/64-brucella-blood-agar>
33. Mikrotitrační destička. In: Ústav mikrobiologie [online]. Praha: 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy [cit. 2020-04-09]. Dostupné z: <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/mic/mic.htm>
34. *Prevotella intermedia*. In: Microbiologyinpictures.com [online]. [cit. 2020-01-16]. Dostupné z: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-negative/prevotella.html>
35. *Propionibacterium acnes*. In: Microbiologyinpictures.com [online]. 2015 [cit. 2020-01-16]. Dostupné z: <https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-micrographs/gram-stain/gram-positive/propionibacterium.html>
36. Proužek E-testu. In: Ilex Medical [online]. 2012 [cit. 2020-04-09]. Dostupné z: http://www.illexmedical.com/files/E-test-Package-Insert/AST_WW.pdf