

厭氧細菌簡介

黃文貴

高雄榮民總醫院微生物科

前言

現在已確認厭氧菌與約50~60%之嚴重性的感染症有關。於某些特殊的情況下厭氧菌感染者，可由單一菌種所引起，但在大部份的情形中，由於常與身體內的正常細菌叢混合生長，再加上厭氧菌生長速率緩慢和對氧氣敏感，故常造成分離技術上的困擾。微生物實驗室內進行厭氧菌的培養及分離是費時且費用昂貴的，在許多實驗室常被困擾著如何選擇便宜且有效的方法來進行厭氧菌的檢驗工作。

由於厭氧菌於臨床檢體中很容易被忽略或遺漏，故臨床醫師要獲得正確可靠的厭氧菌培養結果，適當的收集和運送檢體是非常重要的。於實驗室裡對適當的檢體操作簡易的直接試驗，將可提供初步診斷厭氧菌感染的線索。針對各種不同的厭氧菌群，實驗室裡必需選擇使用適當的營養性（例如：添加vitamin K及hemin）和具選擇性（例如：添加抗微生物製劑）的培養基及簡易的初步鑑定試驗以利分離、鑑定工作的順利進行。至於菌種的確認鑑定試驗，則需仰賴複雜且耗時的傳統方法。目前許多的實驗室裡已經普遍的使用商業化鑑定套組，其原理是利用於試劑組內的塑膠小管或小孔裡含乾燥的基質，以測定厭氧菌的酵素活性。至於商業化鑑定

套組及培養基種類的選擇，則依各個實驗室的傳統及喜好而有所不同，但基本的原則是必需達到有效的分離技術及初步鑑定層次的能力。

命名的改變

最近發展的化學分類方法，應用了分析DNA基質組成，DNA及RNA的相似性，及RNA序列等技術，將許多的厭氧菌命名做了重新分類或組合；臨床上重要的重新命名厭氧菌列於表一。*Bacteroides*屬中已分為*Bacteroides fragilis*群及相關菌；原歸於可分解糖類之*B. melaninogenicus-oralis-ruminicola*群已重新命名為*Prevotella*屬，且還包括產色素及不產色素種。不可分解糖類的產色素革蘭氏陰性桿菌現在被新命名為*Porphyromonas*。至於*B. ureolyticus*群、*B. gracilis*及其他種則待再研究。

利用分析peptidoglycan成份的命名方式亦被應用，已知*Fusobacterium*屬中大多數的種(species)於peptidoglycan結構上含有mesolanthionine。

於臨床上重要的厭氧革蘭氏陽性球菌、clostridia及不產芽孢革蘭氏陽性桿菌命名亦有部份改變。於*Peptococcus*屬中只剩下會產生黑色素的*Peptococcus niger*。

表一 最新臨床上重要厭氧菌之命名

舊 名	新 名
<i>Bacteroides fragilis</i> and related organisms	<i>B. fragilis</i>
	<i>Bacteroides sensu stricti</i>
<i>B. melaninogenicus-oralis-ruminicola</i> group	<i>Prevotella melaninogenica</i>
	<i>Prevotella oralis, Prevotella buccalis</i>
	<i>Prevotella oris, Prevotella buccae</i>
<i>B. asaccharolyticus</i>	<i>Porhphyromonas asaccharolyticus</i>
<i>B. gingivalis</i>	<i>Porhphyromonas gingivalis</i>
<i>B. endontalis</i>	<i>Porhphyromonas endontalis</i>
<i>Fusobacterium symbiosum</i>	<i>Clostridium symbiosum</i>
<i>Clostridium botulinum</i> G	<i>Clostridium argentinense</i>
some <i>C. hastiforme</i>	
some <i>C. subterminale</i>	
<i>C. barati</i>	<i>Clostridium barati</i>
<i>C. perenne</i>	
<i>C. parapefringens</i>	
<i>Arachnia propionica</i>	<i>Propionibacterium propionicus</i>
<i>Bifidobacterium ericksonii</i>	<i>Bifidobacterium dentium</i>
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>
<i>Peptococcus magnus</i>	<i>Peptostreptococcus magnus</i>
<i>Peptococcus micros</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Peptococcus prevotii</i>	<i>Peptostreptococcus prevotii</i>
<i>Peptococcus indolicus</i>	<i>Peptostreptococcus indolicus</i>
<i>Gaffkya anaerobia</i>	<i>Peptostreptococcus tetradius</i>

檢 體

由實驗室提供適當的檢體收集容器、方法及和臨床醫師溝通，以獲得品質佳的檢體，將是厭氧菌分離成功與否的要件。以針抽取足量的膿液或切除的組織是做厭氧菌培養的最佳檢體；避免受到鄰近正常菌叢污染的檢體採集後，應迅速送至實驗室不可延遲。至於棉籤拭子的檢體，雖然

不是很好，但如果是唯一可獲得檢體的方式，實驗室亦可接受，但此時輸送培養基將會扮演著非常重要的角色，而且迅速送檢仍是必要的。

慢性的竇管(sinus tract)感染是不易診斷的；當要檢查出*Actinomyces* spp.時，檢體最好是以針抽取膿液或引流液，則將會有較佳的結果。如以棉籤拭子採取感染部位的表面，將不利於此菌的分離。

直接檢查

實驗室裡利用不同的直接檢查臨床檢體的方法，將可以迅速提供初步假設性的診斷厭氧菌感染症線索。有學者認為於檢體內有散發惡臭味，幾乎可以確定有厭氧菌的存在，但是如果檢體內無惡臭，並不代表沒有厭氧菌存在。使用改良的Kopeloff's氏革蘭氏染色法，如有發現典型的紡錘狀革蘭陰性桿菌例如fusobacteria厭氧菌形態時，對快速診斷上有很大的幫助。氣-液相色層分析法(GLC, gas-liquid chromatography)過去已被廣泛的應用於診斷厭氧菌的感染；假使有多個代謝終產物的峰(peak)產生，就可以證實厭氧菌的存在，但也會因沒有代謝終產物產生而厭

氧菌存在的偽陰性結果。即使氣-液相色層分析法無法提供有效的線索時，可利用臨床檢體的臭味，加上良好的革蘭氏染色技術，亦可診斷厭氧菌感染。使用紫外線來照射膿檢體中是否有*Prevotella* 或 *Porphyromonas* 存在，而產生磚紅色螢光，但亦不是絕對的，因為有許多的檢體並不會產生螢光。

選擇性培養基

由於大部份的厭氧菌感染，常混有需氧菌的存在，故對於厭氧菌初步的分離，是必需使用適當的具選擇性的培養基。不幸的，目前並沒有單一適當的選擇性培養基，可以將所有的各類厭氧菌分離出來；故使用一種以上的選擇性培養基，乃

表二 分離厭氧菌用選擇性培養基

培養基	抗生素		篩選菌種
1. Neomycin agar	Neomycin	100mg/L	clostridia, <i>Bacteroides</i> , anaerobic cocci
2. Kanamycin agar	Kanamycin	75mg/L	clostridia
3. Neomycin- Vancomycin agar	Neomycin Vancomycin	75mg/L 2.5mg/L	<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> fusobacteria
4. Kanamycin- Vancomycin agar	Kanamycin Vancomycin	75mg/L 2.5mg/L	<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i>
5. Nalidixic acid agar +Tween 80	Nalidixic acid Tween 80	10mg/L 1.0g/L	<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> <i>Peptostreptococcus</i>
6. Nalidixic acid- Vancomycin agar	Nalidixic acid Vancomycin	10mg/L 2.5mg/L	<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i> fusobacteria <i>Veillonella</i>
7. Brain Heart Infusion agar	Nalidixic acid Metronidazole	30mg/L 10mg/L	<i>Actinomyces</i>
8. CCFA	Cycloserine Cefoxitin	250mg/L 8mg/L	<i>C. difficile</i>

是幫助初步分離厭氧菌必備的。傳統的選擇性培養基中添加例如 *neomycin* 或 *kanamycin* 等胺基糖苷類抗微生物製劑；添加 *neomycin* 可以分離檢體中的 *clostridia* 和革蘭氏陰性厭氧桿菌，但有部份的厭氧球菌和不分解糖類的革蘭氏陰性厭氧桿菌於此培養基生長情形不佳；添加選擇性較強的 *kanamycin* 時，則祇有 *clostridia* 可以被篩選出來，其餘的例如 *fusobacteria* 和某些革蘭氏陽性厭氧球菌將會被抑制生長。添加 *vancomycin* 於培養基時，則可選擇出革蘭氏陰性厭氧菌。於培養基中添加單獨 *nalidixic acid* 或者合併著 *vancomycin* 時，將可取代添加胺基糖苷類抗微生物製劑時的功能；而且當培養基含有 *nalidixic acid* 及 *vancomycin* 時，革蘭氏陰性厭氧菌生長情形更好。但如果要發現 *clostridia* 仍然是使用含胺基糖苷類抗微生物製劑的選擇性培養基，效果最好。配合使用滋養性及選擇性培養基，將有利於分離各類厭氧菌。於表二內，可總結各種抑制劑的功能。

厭氧菌的鑑定

一般而言，臨床上重要的厭氧菌可分為兩個鑑定層次。每個臨床微生物實驗室必需要有能夠執行一些簡易試驗，以初步分群部份臨床上有意義厭氧菌種的能力。在臨床檢體中的厭氧菌有65~75%為 *B. fragilis* 群、*P. melaninogenica*, *F. nucleatum*, *Peptostreptococcus* 和 *C. perfringens*。進行簡易的試驗方法：菌落形狀（含瓊脂表面的凹陷現象），革蘭氏染色形態（含孢子的形成），使用一些抗微生物製劑紙錠，

Nagler 試驗，於 *egg yolk* 培養平板的反應，*reverse CAMP* 試驗，其他亦可由 *formate-fumerate* 的刺激生長、*spot indole* 試驗、*nitrate* 生長、還原試驗，於 *bile esculin* 瓊脂上的水解作用等線索獲得。於表三中列出各試驗的反應結果。

B. fragilis 群常造成嚴重性的感染，也是臨床檢體中最常被發現的厭氧菌，有些學者認為當它存在時，將會有較差的癒後情形，故對此菌加以確認、鑑定是重要的；此菌於 *bile esculin* 瓊脂上生長良好，而且還會因水解作用產生暗色菌落，周圍具有棕色到黑色的暈環。

並不是所有會產色的革蘭氏陰性桿菌對 *bile* 有耐受性，故於 *bile-esculin* 瓊脂上可能會不生長。*B. ureolyticus* 和 *B. gracilis* 於厭氧BAP瓊脂上呈現凸起的菌落，並且會使瓊脂表面產生凹陷的情形；這兩種細菌對 *kanamycin* 都具感受性，但後者較前者對抗生素更具抗藥性。*Fusobacterium nucleatum* 是 *fusobacteria* 屬中於臨床檢體內最常被分離的，它對 *kanamycin* 具感受性，由厭氧BAP瓊脂呈麵包屑狀的菌落挑起進行革蘭氏染色，常呈現針狀，且此菌的 *spot indole* 試驗是陽性。有些學者建議使用含 *brilliant green* 紙錠來區別 *Bacteroides*（具感受性）和 *fusobacteria*（具抗藥性）；但於判讀時必需注意，因抑制圈是很小的，有時候還有不容易判讀的情形。*C. perfringens* 於厭氧BAP瓊脂上會產生雙溶血圈現象的菌落，傳統的 *Nagler* 試驗呈陽性，最近發現此菌有增強B群鏈球菌產生溶血的 *reverse-CAMP* 現象。*C. sordellii* 及 *C. difformis* 則無此現象。

表三 厭氧菌“初步分群”之鑑定

	Gram negative anaerobes								
	Bile					Pitting			
	Kana	Vanc	Colistin	Aescul	F/F	NO ₃	Motility	of agar	Pigment
<i>B. fragilis</i> group	R	R	R	+	-	-	-	-	-
<i>Prevotella</i> spp.	R	V	V	-	-	V	-	-	V
<i>Porphyromonas</i> spp.	R	V	V	-	-	-	-	-	V
<i>B. ureolyticus</i> group	S	R	S	-	+	V	V	+	-
<i>Fusobacterium</i> spp.	S	R	S	-+	-	-	-	-	-
<i>Veillonella</i> spp.	S	R	S	-	-	+	-	-	-
	Gram positive anaerobes								
	Spores	SPS	Indole	Cat	Nagler	Rev	CAMP	Grows in CO ₂	
<i>C. perfringens</i>	-	R	-	-	+	-	+	-	
<i>C. bifermentans</i>	+	R	+	-	+	-	-	-	
<i>C. sordellii</i>	+	R	+	-	+	-	-	-	
<i>C. species</i>	+	R	V	-	-	-	-	-	
<i>Peptostreptococcus anaerob.</i>	-	S	-	-	-	-	-	-	
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	-	R	V	V	-	-	-	-	
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	R	+	+	-	-	-	+	
<i>Propionibacterium</i> spp.	-	R	-	-	+	-	+	+	
Other NSGPB	-	R	V	V	-	-	-	V	

V=variable, SPS=liquoid, S=sensitive, R=resistant, -+=most strains negative, F/F=stimulation of growth(formate and furmarate), NSGPB=Non-sporing Gram-positive bacilli

對厭氧菌的確認鑑定有兩種方法：
 (1) 進行傳統的生化試驗，然後以VPI (Virginia Polytechnic Institute and State University) 厭氧操作手冊為依據來分析代謝最終產物，此法仍是被公認為最標準的方法。(2) 最近使用非常普遍的商品化鑑定試劑組，其利用電腦整合試驗資料來輔助測定酵素的輪廓，最近已有許多實驗室放棄使用傳統的生化鑑定方法，而朝著方便

性及快速性方向走，這些方法可於嗜氧環境中培養四小時即有結果。目前市面上使用Rapid ID 32A及Rap ID ANA II系統者最多；這兩種商品化試劑組可以完整的鑑定出臨床檢體常見的厭氧菌，甚至於傳統方法無法鑑定的，它也可以成功的鑑定出來；但使用這些鑑定試劑組必需與初步的分群試驗結果吻合，而且必需熟悉操作流程及正確的結果判讀。

C. difficile 大腸炎

實驗室必需隨時有偵測糞便檢體懸浮液中*C. difficile* 細胞毒素(cytotoxin)的應變能力，包含利用組織細胞培養方法或者是使用更快速但更昂貴的酵素免疫分析法以測定內毒素的存在。由無症狀的病人身上分離出的菌株和懷疑有交互感染時必需進行毒性測定試驗，甚至需要做分型試驗。

C. perfringens 內毒素亦可能會造成與抗生素使用有關的腹瀉，可利用糞便的上清液，進行逆轉被動性凝膠試驗分析之。

臨床觀念

雖然我們已了解了許多的厭氧菌會對病患產生疾病，但仍有許多新的相關性陸續再被發現且被確定。例如：大家需要知道*C. perfringens* 亦可與使用抗生素腹瀉有關，而不限於*C. difficile*。另外一有趣的發現：於羊水液及新生兒的胃抽取液中發現fusobacteria（特別是*F. nucleatum*），而造成羊膜腔炎。

由於培養技術及改進選擇性培養瓊脂，而發現糖尿病人之壞疽性潰瘍和病人置換關節後的感染，常與*Peptostreptococcus magnus* 的感染有關。

由於嗜酒、糖尿病、白血病、癌症、淋巴瘤、及後天免疫缺乏症候群等免疫不全病人的大量湧入醫院，以往常被認為正常菌叢的菌株，最近發現常與敗血症有關，這些細菌包括*Wolinella*、

Selenomonas、*Desulfovibrio*、*Anaerobiospirillum*、及*Leptotrichia*等細菌，來自胸水、經氣管抽取後、傷口引液及血液等檢體。最近更常發現*C. septicum*可於癌症病人中分離出來，且具有相關性；亦有人由發燒的白血病患之血液中分離出*Leptotrichia*。對於這些分離菌的臨床意義，目前雖然無法完全確定，但它是反應出這些不常被發現的菌種，已開始被逐漸的發現，且這些感染症可能是與改變中的現代內科及外科醫療技術有關。

展 望

目前可以核酸探針或單株抗體標示免疫螢光染料等技術，針對與毒素有關厭氧菌的感染進行快速的偵測，例如具嚴重性的*C. botulinum*、*C. difficile* 及*F. necrophorum*，將有助於病人的照顧。由於新的檢驗技術發展迅速，無可置疑的是將改變臨床厭氧菌學的常規技術。筆者建議是否鑑定及藥物感受性試驗最好由專門的實驗中心來負責，而臨床實驗室則祇進行快速診斷及分離的技術。

參考文獻

1. Wren MWD: In Anaerobes and Human Disease. London: Edward Arnold. 1991.
2. Finegold SM, Edelstein MAC: In Anaerobes Today. Hardie JM, Borriello SP, eds. Wiley, Chichester. 1989.
3. Murray PR, Citron DM: In Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. ASM, Washington. 1991.
4. Carman RJ, Van Tassell, RL, Lyerly DM, et al: In Anaerobes Today. Hardie JM, Borriello SP, eds. Wiley, Chichester. 1988.