



ZKUŠENOSTI S IDENTIFIKACÍ GRAM-POZITIVNÍCH KATALÁZA NEGATIVNÍCH KOKŮ Z HEMOKULTUR

I. Porazilová, E. Durnová, J. Jančová

Centrum mikrobiologie, parazitologie a imunologie, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

ÚVOD:

Gram-pozitivní kataláza negativní koky (v praxi běžně označované jako „viridující streptokoky“) tvoří podstatnou součást normální flóry v dutině ústní a v horních cestách dýchacích, mohou se vyskytovat také v horní části zažívacího traktu i ve stolici. Chovají se jako podmíněně patogeny. Jsou hlavní příčinou septikémií u pacientů s neutropenií (1), patří mezi významná etiologická agens bakteriální endokarditidy obzvláště u jedinců s poškozeným endokardem. Uvádí se, že jsou příčinou více než 40 % všech případů infekční endokarditidy (2). Záchyt často vyžaduje opakovanou odběry hemokultur - právě opakovaný záchyt stejného kmene by mohl potvrdit, že izolovaný kmen lze považovat za etiologické agens a naznačit některé epidemiologické souvislosti. Proto je důležité věnovat identifikaci izolátů ze skupiny gram-pozitivních kataláza negativních koků značnou pozornost.

Taxonomie sledovaných skupiny koků zahrnuje nejméně 10 rodů (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Gemella*, *Aerococcus*, *Helcococcus*, *Rothia*, *Globicatella*, *Granulicatella*) (3), v roce 2002 bylo v rod *Streptococcus* popsáno 6 nových druhů. Identifikace je běžně prováděna pouze na základě biochemických testů, které se ukazují být nedostačující.

Obtížnost a nejednoznačnost dourčení gram-pozitivních kataláza negativních koků jsme se pokusili dohlédnout na souboru 30-ti vybraných kmenů. Byly srovnány výsledky získané pomocí dvou identifikčních systémů - systému biochemické identifikace API 20 Strep (BioMérieux, Francie) a mikrobiologického identifikčního systému Sherlock (MIDI, Inc., USA) založeného na základě analýzy methylesterů celulózních mastných kyselin (FAME).

METODY:

Kmeny zařazené do této studie byly získány z hemokultur kultivovaných v systému BacT/Alert (Organon Teknica, USA). Z lahvičky obsahující hemokulturu a signalizující pozitivitu byl zhotoven preparát barvený dle Grama a narostlé kolonie byly dále identifikovány.

Morfologie kolonií byla hodnocena u kultury kmene narostlé za 24 h na krevním agaru v atmosféře s 5 % CO₂. Z kultury připravený mikroskopický preparát obarvený podle Grama byl pozorován ve zvětšení 10x100. U všech kmenů byl proveden test na produkci katalázy.

Identifikace pomocí systému API 20 Strep byla provedena podle laboratorního manuálu doporučeného výrobcem: enzymatické reakce byly hodnoceny po inkubaci stripu 4 h při 37 °C, zkvašování cukrů bylo hodnoceno i za 24 h. Doporučené dodatkové testy pro diferenciaci gram-pozitivních kataláza negativních koků/kokobacilů (4) byly inkubovány vždy 48 h při 37 °C: rezistence k vankomycinu (disk 30 µg, Bio-Rad, USA), růst v přítomnosti 6,5 % NaCl, růst při teplotách 10 °C a 45 °C v bujónu BHI (Brain Heart Infusion), hydrolyza eskulinu v přítomnosti 40 % žluči, produkce plynu z glukózy v bujónu Lactobacilli MRS Broth (Becton Dickinson, USA), test satelitismu - inkubace na krevním agaru s črtho kmene *S. aureus* v atmosféře s 5 % CO₂. Průkaz přítomnosti skupinově specifického antigenu serologické skupiny D byl proveden latexovou aglutinací PASTOREX - STREP (Bio-Rad, USA).

Pro stanovení methylesterů mastných kyselin (FAME) byly kmeny kultivovány 48 h na BHI agaru (Becton Dickinson, USA) za anaerobních podmínek. Extrakce FAME byla provedena podle laboratorního manuálu (5).

VÝSLEDKY:

Pouhý morfologický obraz jednotlivých kmenů byl různý - rozdíly dokumentuje obrázek 1. Mikroskopicky byly všechny kmeny označeny za „streptokokové“, odlišnosti jsou uvedeny v tabulce 1. V systému biochemické identifikace API 20 Strep bylo 8 kmenů určeno jako *Streptococcus acidiminimus*, 3 kmeny jako *Lactococcus lactis cremoris*, po 1 kmeni *Streptococcus bovis*, *S. constellatus*, *S. mitis*, *S. sanguis* a *S. salivarius salivarius*. U třetího koků byl výsledek identifikace nejednoznačný (pouze s malým pravděpodobnostním indexem).

Také dodatkové testy uvedené v tabulce 1 dokládají rozdíly v biochemických i fyziologických vlastnostech jednotlivých kmenů. Výsledky srovnání profilů FAME ukazují obrázek 2. Jednoznačně odděleny (ED 17) byly kmeny *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Streptococcus bovis* a skupina nutričně deficitních streptokoků.

DISKUSE:

V API 20 Strep byla pouze identifikace *Streptococcus bovis* označena jako „excellently“, s pravděpodobností 99,9 %. T index 0,94. Správnost identifikace potvrzují i dodatkové testy - např. pozitivní reakce se skupinovým antigenem serologické skupiny D a negativní průkaz produkce pyrrolidonyl amidopeptidázy. *Leuconostoc* sp. lze v praxi velmi dobře odlišit rezistencí k vankomycinu, produkci plynu z glukózy a negativními průkazy enzymů pyrrolidonyl amidopeptidázy a leucin amidopeptidázy. U kmene *Lactococcus* sp. byl pozorován narostl od ostatních koků růst v přítomnosti 6,5 % NaCl a při teplotě 10 °C. Nejčastější zařazení zbyvajících kmenů na základě identifikace API 20 Strep do rodů *Streptococcus/Lactococcus* se shoduje se zařazením testovaných kmenů na základě využití výsledků dodatkových testů, morfologie a mikroskopického obrazu dle Murray a kol. (4). Zvláštní skupinu tvoří nutričně deficitní kmeny charakteristické svým satelitismem, průkaz produkce enzymu pyrrolidonyl amidopeptidázy byl u všech pozitivní.

Analýza FAME nebyla hodnocena identifikace na základě srovnání s databází vzhledem k malému počtu zastoupených druhů ze skupiny gram-pozitivních kataláza negativních koků. Srovnání získaných profilů FAME v dendrogramu však ukazuje na možnost využití této metody k diferenciaci alespoň některých koků ze skupiny - výrazně odlišné zastoupení mastných kyselin vedlo k oddělení kmene *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp. a *Streptococcus bovis*. Samostatnou skupinu zde tvořily i nutričně deficitní kmeny.

Ostatní vybrané kmeny nebylo možné na základě použitých testů blíže určit, popř. jejich identifikaci potvrdit. Vzhledem ke složitosti bližšího dourčení vybraných kmenů bychom navrhovali zvlášť u podobných izolátů použití názvu „viridující streptokoky“. Jiné vhodnější souborné označení je např. gram-pozitivní kataláza negativní koky (3).

LITERATURA:

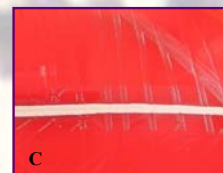
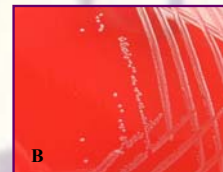
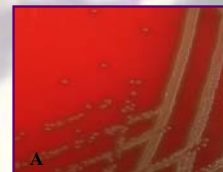
- (1) Beighton D., Carr AD, Oppenheim BA (1994), *J Med Microbiol* 40:202-204
- (2) Dankert, J. (1992) Infective endocarditis: treatment and prophylaxis. In Congenital heart disease in adolescents and adults. J. Hess and G.R. Sutherland (eds.) Kluwer, Dordrecht, 155-170
- (3) Materiály NRL pro streptokoky a enterokoky SZU/CEM, Praha, květen 2002
- (4) Murray et al. (1999) Manual of Clinical Microbiology, 7th ed.
- (5) MIDI, Inc. (2001) Sherlock Microbial identification system. Operátin manual, version 4.0. MIDI, Inc. Newark, Del. USA

Práce je součástí výzkumného záměru podporovaného Ministerstvem zdravotnictví, Id.kód: MZO/ZA/00538.

Kontakt: iva.porazilova@zuova.cz

Obr. 1 : Různá morfologie G+ kataláza negativních koků - inkubace 24 hodin při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂:

- A - G+ kataláza negativní koky s viridací
- B - G+ kataláza negativní koky podobné enterokokům
- C - satelitní růst nutričně deficitních streptokoků
- D - *Streptococcus bovis*
- E - *Lactococcus* sp.

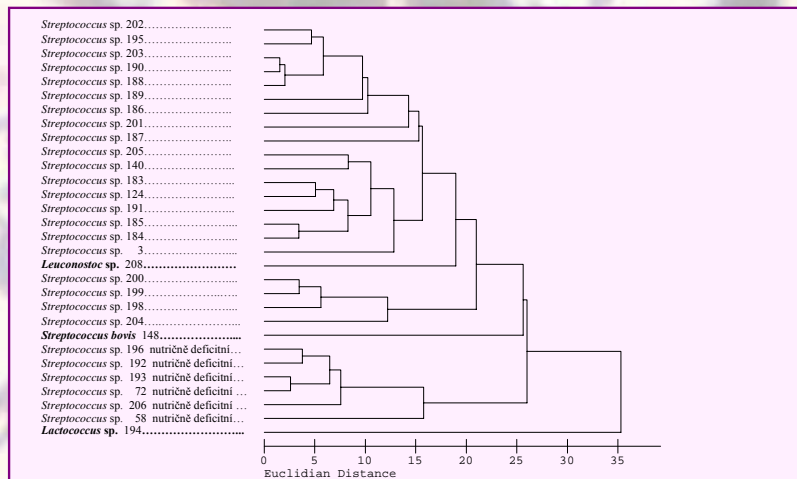


Tab. 1: Přehled výsledků biochemických testů - API 20 Strep (BioMérieux) gram-pozitivních kataláza negativních koků v porovnání s dalšími dodatkovými testy, morfologií a mikroskopii

Kmen číslo	Výsledek API	Kid API	P/R	LAP	ESK	VAN	NaCl	10	45	BE	GAS	Sat	D	Morfologie	Mikroskopie
202	<i>Lc. lactis cremoris</i>	7070401	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	E:α	„streptokoková“, řetězdy
195	<i>Lc. lactis cremoris</i>	7069400	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	α	„streptokoková“, ovoidní
203	<i>Lc. lactis cremoris</i>	7070401	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	E	„streptokoková“, ovoidní
190	<i>Stc. acidiminimus</i>	6070611	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	E:α	„streptokoková“, kokobacily
188	<i>Lc. lactis cremoris, St. salivarius salivarius</i>	7070441	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	E	„streptokoková“, ovoidní
189	<i>St. salivarius salivarius</i>	7070471	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	E:α	„streptokoková“, kokobacily
186	<i>Stc. acidiminimus</i>	6071400	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	α	„streptokoková“, granulózní
201	<i>Stc. mannis, Aerococcus viridans 3</i>	7340770	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	βk, velmi drobné	„streptokoková“, kokobacily, granulózní
187	<i>Stc. acidiminimus, Lactococcus lactis lactis</i>	6056601	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	α	„streptokoková“, kokobacily
205	<i>Stc. acidiminimus</i>	2069401	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	α	„streptokoková“, ztlustělé formy
140	<i>Stc. sanguis</i>	6241410	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	α	„streptokoková“, řetězdy
183	<i>Lc. lactis lactis, Stc. constellatus</i>	7061110	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	E	„streptokoková“, ovoidní
124	<i>Stc. acidiminimus</i>	2070400	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	α, suché, drobné	„streptokoková“, granulózní, velmi drobné, ztlustělé formy
191	<i>Stc. acidiminimus</i>	2059401	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	α	„streptokoková“, ztlustělé formy
185	<i>Stc. acidiminimus</i>	2059501	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	α	„streptokoková“, ztlustělé formy
184	<i>Stc. mitis 2</i>	2054441	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	α	„streptokoková“, kokobacily, ztlustělé formy
3	<i>Stc. acidiminimus</i>	2070401	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	α	„streptokoková“, granulózní, řetězdy, kokobacily i vlákná, ztlustělé formy
208	<i>Lc. lactis cremoris, Leuconostoc spp.</i>	3210440	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	α	„streptokoková“, granulózní, kokobacily
200	<i>Stc. constellatus</i>	7061400	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	E:α	„streptokoková“, ovoidní
199	<i>Stc. constellatus, Lc. lactis lactis</i>	7061410	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	E:α	„streptokoková“, ovoidní
198	<i>Stc. intermedius, Lc. actis lactis</i>	7071411	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	E	„streptokoková“, ovoidní
204	<i>Stc. intermedius, Stc. anginosus</i>	7064411	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	E:α	„streptokoková“, ovoidní
148	<i>Streptococcus bovis</i>	5040573	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	E	„streptokoková“, drobné
196	<i>Alloccoccus otitis, Abiotrophia adiacens</i>	2140000	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	sečí, drobné	„streptokoková“, granulózní, velmi drobné, ztlustělé formy
192	<i>Stc. acidiminimus</i>	6561000	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	sečí, drobné	„streptokoková“, granulózní, velmi drobné
193	<i>Stc. acidiminimus, Aerococcus viridans 2</i>	2140010	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	sečí, drobné	„streptokoková“, granulózní, velmi drobné, řetězdy
72	<i>Alloccoccus otitis, Abiotrophia adiacens</i>	2140000	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	sečí, drobné	„streptokoková“, granulózní, velmi drobné, řetězdy
206	<i>Stc. acidiminimus, Aerococcus viridans 2</i>	2140010	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	sečí, drobné	„streptokoková“, granulózní, velmi drobné, řetězdy
58	<i>Abiotrophia deficiens, Aerococcus viridans 2</i>	1314111	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	sečí, drobné	„streptokoková“, granulózní, kokobacily i vlákná, ztlustělé formy
194	<i>Lactococcus lactis lactis</i>	7045110	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	E, vlákné	„streptokoková“, ovoidní, kokobacily

Legenda
Stc. Streptococcus
Lc. Lactococcus
P/R pyrrolidonyl amidopeptidáza - odečteno z API 10
LAP leucin amidopeptidáza - odečteno z API 45
ESK eskulin - odečteno z API
VAN rezistence k vankomycinu
NaCl růst v 6,5% NaCl
růst při teplotě 10°C
růst při teplotě 45°C
BE hydrolyza eskulinu v přítomnosti 40% žluči
GAS plyn z glukózy
Sat test satelitismu
D skupinově specifický antigen serologické skupiny D
E enterokový vzhled kolonií
α viridace, alfa hemolýza na krevním agaru

Obr. 2: Srovnání profilů FAME testovaných kmenů gram-pozitivních kataláza negativních koků z hemokultur v dendrogramu



ZÁVĚR:

Ani jeden z použitých identifikčních systémů nedává vzhledem k omezenému počtu druhů zařazených v databázi uspokojivé výsledky. Identifikaci je nutno doplnit konfirmací s mikroskopickým obrazem izolátů, vzhledem kolonií a provedením doporučených doplňkových testů.

Srovnání získaných profilů FAME studovaného souboru umožnilo zařadit alespoň některé z kmenů do rodu resp. druhu. Podle sestaveného dendrogramu bylo možné odlišit zástupce rodů *Leuconostoc*, *Lactococcus* a druh *Streptococcus bovis* od ostatních gram-pozitivních kataláza negativních koků. Výsledkům identifikace podle profilu FAME u jmenovaných tří kmenů odpovídala i biochemická identifikace podle soupravy API 20 Strep.