

IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

Streptococcus pneumoniae taksonomski pripada mitis grupi streptokoka, u kojoj se, pored njega nalazi još 14 vrsta. Neke od njih su: *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *S. infantis*, *S. crista*, *S. pseudopneumoniae*.

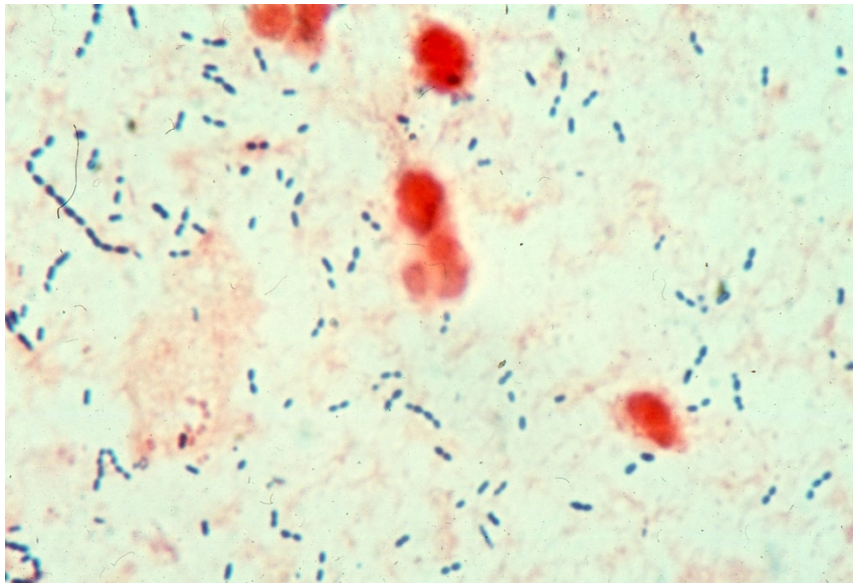
1. Mikroskopske osobine

Pneumokok se tipično pojavljuje u vidu Gram pozitivnih diplokoka, promera oko 1-2 μm , (slika 1), koje su na direktnim preparatima iz bolesničkog materijala okružene polimorfonuklearnim leukocitima (slika 2). U direktnom preparatu se neretko može uočiti i kapsula, kao zona prosvetljenja oko diplokoka. Ponekad, kao posledica antimikrobne terapije, pneumokok može donekle izmeniti morfologiju, te se, zbog preterane dekolorizacije, prebojava crveno i stiče se utisak da su Gram negativne diplokoke.



***Streptococcus
pneumoniae***

Slika 1. Pneumokok – diplokoke, okružene kapsulom



Slika 2. Izgled ćelija *Streptococcus pneumoniae* u direktnom preparatu likvora, obojenom po Gramu; uočavaju se izdužene diplokoke, koje mogu formirati lance

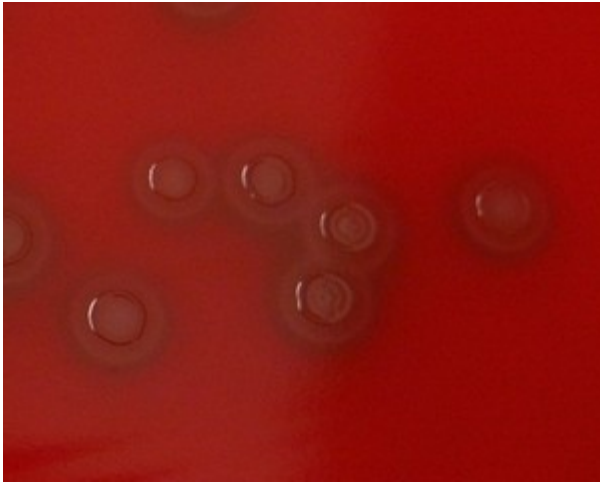
2. Kulturelne osobine

Posle 18-24 časovne inkubacije krvnog ili čokoladnog agara na 35°C, u prisustvu 5% CO₂, se uočavaju male (1-2 mm), sivkaste, ponekad mukoidne kolonije, koje su na krvnom agaru okružene zonom alfa hemolize (slika 3). Izgled kolonija zavisi od serotipa, kao i od vrste podloge i uslova kultivisanja. Neki serotipovi (npr. tip 3) formiraju izrazito sluzave kolonije (slika 3, desno). Posle 24-časovne inkubacije kolonije pneumokoka imaju centralno udubljenje, koje je posledica njegove autolize (slika 3, levo). Ovakav izgled kolonija je tipičan za *S. pneumoniae* i po tome se razlikuje od drugih alfa hemolitičkih (viridans) streptokoka.

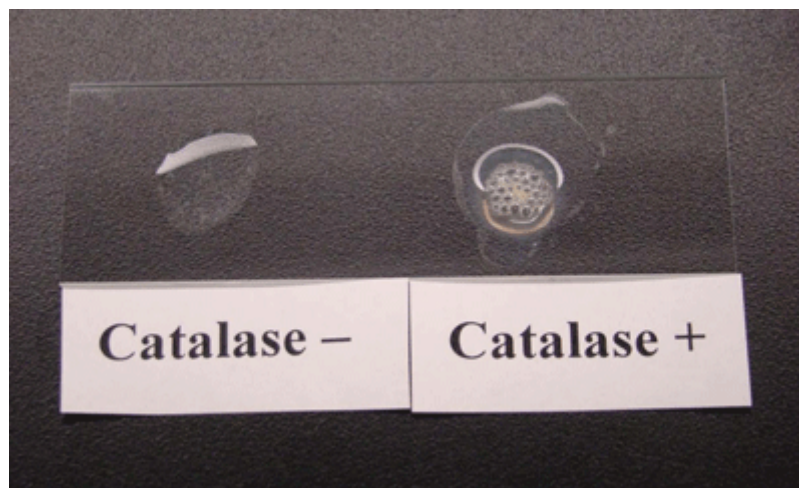
Za sve testove koji se dalje rade u cilju identifikacije pneumokoka, kao i izradu antibiograma, neophodno je imati svežu, 18-24-časovnu kulturu. Najbolje je za subkultivisanje uzimati pojedinačne kolonije, kako bi se izbegla mogućnost kontaminacije, posebno ukoliko je kultura poreklom iz regija kolonizovanih fiziološkom mikroflorom, odnosno na ploči je mešana kultura.

3. Test katalaze

Pneumokok je, kao i ostale streptokoke, **katalaza negativan** i ukoliko postoji dilema da li kolonije pripadaju rodu *Streptococcus*, treba uraditi test katalaze (slika 4). Test se izvodi na staklenoj pločici, sa 3% vodonik peroksidom (H₂O₂). Na pločicu se stavlja jedna kap H₂O₂ i u nju se, ezom, suspenduju bakterijske kolonije, vodeći računa da se ne prenese i deo krvog agara. Eritrociti iz krvnog agara mogu dati lažno pozitivnu reakciju katalaze. Pojava mehurića vazduha označava pozitivnu reakciju, a njihovo odsustvo negativnu. Vodonik peroksid treba čuvati u dobro zatvorenoj bočici, na +4°C.



Slika 3. Izgled kolonija *Streptococcus pneumoniae* na krvnom agaru. *Levo*: tipično udubljenje u kolonijama posle 24 časovne inkubacije, koje se javlja kao posledica autolize; *Desno*: izgled mukoidnih kolonija *Streptococcus pneumoniae*



Slika 4. Test katalaze

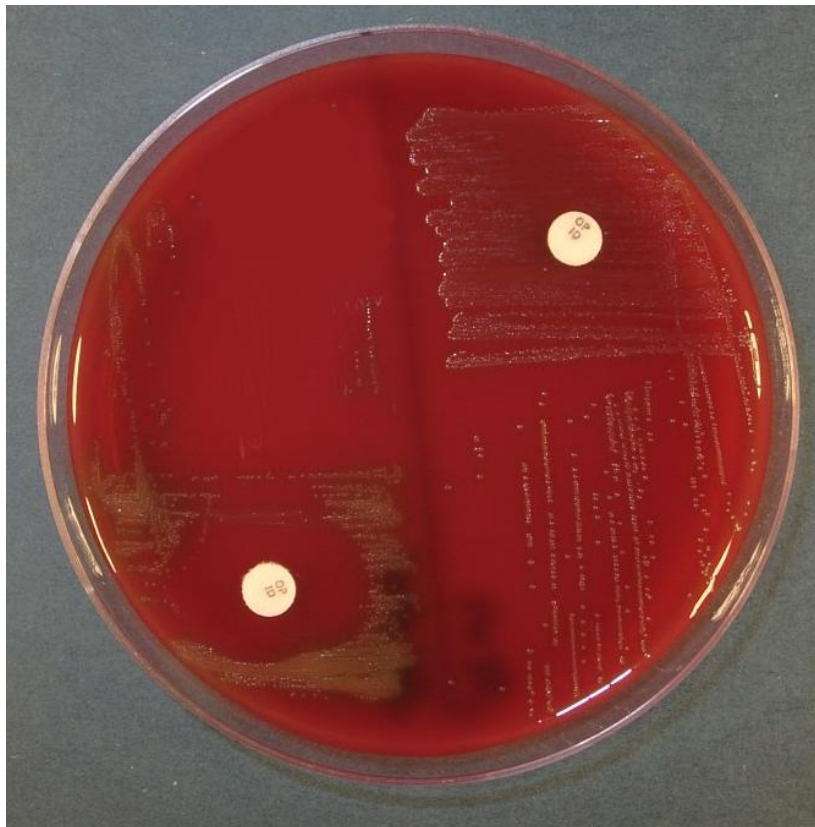
Za dalju identifikaciju pneumokoka koja je prvenstveno usmerena na razlikovanje *S. pneumoniae* od viridans streptokoka koriste se **dva ključna testa: optohinski i test lize deoksiholatom**. *S. pneumoniae* je osetljiv na optohin (etilhidrokuprein hidrohlorid) i lizira u prisustvu žučnih soli (deoksiholata) za razliku od viridans streptokoka.

4. Optohinski test

Izvodi se sa diskovima optohina (6 mm, 5 µg), komercijalno dostupnim. Čista 24 časovna kultura pneumokoka se presejava, ezom, na krvni agar, tako da je cela površina ploče zasejana bakterijskom kulturom. Može se koristiti i polovina ploče. Ukoliko se optohinski test radi paralelno sa antibiogramom, pravi se suspenzija pneumokoka, gustine 0,5 McFarland, u 1 ml fizološkog rastvora, a zatim se sterilnim brisom zasejava na krvni agar. Postavlja se disk optohina i ploča se inkubira 18-24 sata, na 35-37°C, u prisustvu 5% CO₂. Posle prekoćne inkubacije se očitava zona

inhibicije rasta, sa gornje strane otvorene ploče, kaliperom ili lenjirom. Ukoliko je prečnik zone ≥ 14 mm, smatra se da je ispitivani izolat osetljiv na optohin. Zona inhibicije manja od ove, ali i potpuna rezistencija na optohin (kada se piše da je prečnik 6 mm, koliko je prečnik diska), ukazuje da izolat, verovatno, nije *S. pneumoniae*. S' obzirom da oko 10% sojeva pneumokoka može biti rezistentno na optohin, za sojeve koji su rezistentni, potrebno je uraditi test lize deoksiholatom.

Za svaki novi lot diskova optohina treba uraditi pozitivnu i negativnu kontrolu. Najbolje je da se za kontrolu koriste standardni sojevi *S. pneumoniae* ATCC 49619 kao pozitivna i *S. mitis* ATCC 49456, kao negativna.



Slika 5. Optohinski test. Levo: *Streptococcus pneumoniae*, osetljiv na optohin; desno: viridans streptokoke – rezistentne na optohin

5. Test lize žučnim solima (Na-deoksiholat)

Ovaj test se zasniva na činjenici da pneumokok ima enzim autolizin, koga aktiviraju žučne soli, te u njihovom prisustvu dolazi do autolize kulture pneumokoka, za razliku od viridans streptokoka, čija kultura ne lizira.

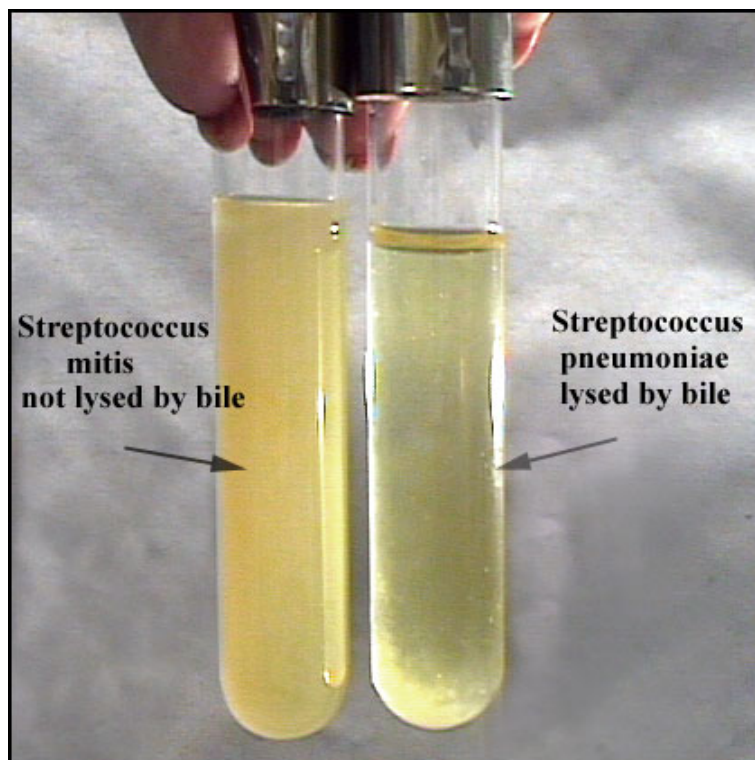
Test se radi sa 10% Na-deoksiholatom (Na DOC), koji se priprema tako što se 10 g (komercijalnog) deoksiholata rastvori u 100 ml sterilne destilovane vode. Koristi se 18-24 časovna kultura ispitivane bakterije, od koje se pravi suspenzija, gustine 1,0 - 2,0 McFarland, u 1 ml 0,8% fiziološkog rastvora. Ova suspenzija se podeli u dve epruvete, tako da svaka epruveta sadrži po 0,5 ml bakterijske suspenzije. Epruvete se označe – jedna je test epruveta, a druga kontrola. U test epruvetu se dodaje 0,5 ml 10% Na- deoksiholata, a u kontrolnu 0,5 ml 0,8% fiziološkog rastvora. Obe

epruvete se vorteksiraju i inkubiraju na 35-37°C u prisustvu 5% CO₂. Reakcija se prvi put očitava posle 10 minuta, pošto se obe epruvete vorteksiraju. Izbistravanje suspenzije u test epruveti, uz nepromenu kontrolu, označava pozitivnu reakciju (slika 6). Ukoliko se reakcija tada ne uoči, inkubacija se produžava naredna 3 sata, nakon čega se reakcija opet očitava. Pored testa lize Na DOC u epruveti, moguće je raditi test i direktnim nakapavanjem Na DOC na bakterijsku koloniju, nakon čega se ploča inkubira 30 minuta na 35°C. Dezintegracija kolonije i/ili pojava hemolize na podlozi na mestu gde je bila kolonija, ukazuje na pozitivnu reakciju (slika 7).

Treba napomenuti da ima sojeva *S. pneumoniae* koji ne liziraju u prisustvu žučnih soli, te ovaj test, iako visoko specifičan i osetljiv, nije uvek 100% pouzdan.

Delimično izbistravanje suspenzije, uz prečnik zone oko optohina manji od 14 mm, ukazuje da ispitivani izolat nije *S. pneumoniae*.

Svaki novi lot Na-deoksiholata treba testirati pozitivnom i negativnom kontrolom. Najbolje je da se za kontrolu koriste standardni sojevi *S. pneumoniae* ATCC 49619 kao pozitivna i *S. mitis* ATCC 49456, kao negativna.



Slika 6. Test lize žučnim solima u epruveti. *Levo:* viridans streptokoke, čija bujonska kultura ostaje zamućena posle dodavanja žučnih soli, test je negativan. *Desno:* *Streptococcus pneumoniae*, čija se bujonska kultura izbistrila posle dodavanja žučnih soli, test je pozitivan.



Slika 7. Test lize žučnim solima direktnim nakapavanjem na koloniju. *Levo:* kolonije pneumokoka pre izvođenja testa; *Desno:* kolonije pneumokoka 30 minuta posle nakapavanja DOC (kolonije okružene flomasterom).

6. Komercijalni kitovi za identifikaciju *S. pneumoniae* - lateks aglutinacioni test

Najčešće korišćen komercijalni test za identifikaciju *S. pneumoniae* je **lateks aglutinacioni test**, koji sadrži suspenziju lateks partikula obloženih zečjim antitelima specifičnim za penumokokni kapsularni antigen. Ovim testom se kvalitativno detektuje kapsularni antigen pneumokoka iz kulture. Treba uvek koristiti svežu (18-24 časovnu) i čistu bakterijsku kulturu. U slučaju pozitivne reakcije, uočava se vidljiva aglutinacija. U kitovima se nalazi i pozitivna i negativna kontrola. Pozitivna kontrola je liofilizovani ekstrakt polivalentnog kapsularnog antigena *S. pneumoniae*, a negativna kontrola sadrži suspenziju lateks čestica na koje su nanoseni zečji imunoglobulini. Kitovi se čuvaju u frižideru, na +4°C, a reagensi se vade 15 minuta pre izvođenja testa, kako bi se zagrejali do sobne temperature. Test treba izvoditi prema uputstvu proizvođača. Prilikom otvaranja novog kita, a i povremeno, ukoliko kit duže stoji, treba uraditi pozitivnu i negativnu kontrolu, kako bi se proverila ispravnost reagenasa.

Test se izvodi tako što se na predmetno staklo ili plastificirane kartice, ako su obezbeđene u pakovanju, nanosi već napravljena suspenzija ispitivanih bakterija (suspenzija se pravi od sveže prekonocne kulture, tako što se kolonije suspenduju u 0,5–1 ml fiziološkog rastvora u epruveti; gustina suspenzije je oko 0,5 -1 Mc Farland) ili se na predmetnu pločicu nanese kap fiziološkog rastvora i u nju suspenduju kolonije direktno sa ploče. Najbolje je da se na svaku polovinu predmetnog stakla nanese po jedna kap suspenzije (za testiranje i za kontrolu). Na kap suspenzije koja služi za testiranje se nanese kap (oko 5-10 µl) lateks reagensa, a na kontrolu kap fiziološkog rastvora. Plastičnim štapićem se pomešaju lateks reagens i suspenzija (test), odnosno fiziološki rastvor i suspenzija (kontrola). Rukom se rotira pločica, pazeći da ne dođe do mešanja test i kontrolnih suspenzija. Posle 5-10 sekundi se očitava reakcija. Pojava aglutinacije na test suspenziji, uz odsustvo aglutinacije na kontroli, označava pozitivnu reakciju, odnosno potvrdu da je ispitivani soj *S. pneumoniae*. (slika 8). Ukoliko se reakcija ne odigra ni posle 30 sekundi, test se može smatrati negativnim. Lažno pozitivne reakcije su moguće sa *Streptococcus oralis* i *Streptococcus mitis* grupom.



Slika 8. Lateks aglutinacija. Negativna i pozitivna reakcija

7. Komercijalni kitovi za identifikaciju *S. pneumoniae* – biohemijske reakcije

Identifikacija pneumokoka se radi i putem analize biohemijskih osobina. Uglavnom se koriste komercijalni kitovi. U našoj sredini su to API 20 Strep i Rapid ID 32 Strep, koji prve rezultate daje posle 4 sata inkubacije, a konačne posle 24 sata (slika 9). Takođe je u upotrebi i BBL Crystal Rapid Gram positive kit, pomoći koga se dobija identifikacija posle 4 sata (slika 10). Koriste se i automatizovani sistemi Vitek 2 i Phoenix Strep panel, pomoću kojih je moguće, pored identifikacije pneumokoka dobiti i rezultat osetljivosti na antibiotike. Ipak, treba napomenuti da bi se pneumokok razlikovao od drugih vrsta iz grupe mitis streptokoka, analizu biohemijskih osobina obavezno treba dopuniti rezultatima optohinskog testa i testa lize deoksiholatom.



Slika 9. API 20 Strep: gornji red – sve reakcije su pozitivne; donji red: sve reakcije su negativne



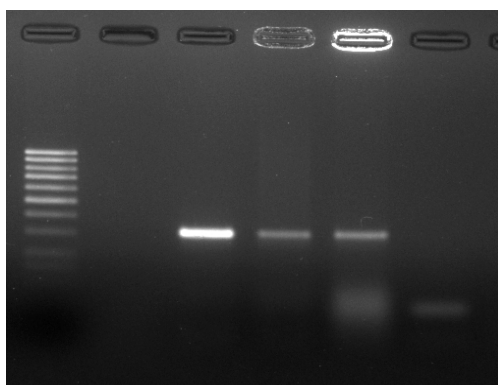
Slika 10. Crystal Gram positive Rapid ID

8. Genske probe za identifikaciju *S. pneumoniae*

Za identifikaciju atipičnih sojeva pneumokoka, kao i za razlikovanje pneumokoka od viridans streptokoka se koriste i genske probe. Postoji komercijalna proba – AccuProbe Pneumococcus, koja bazira na detekciji specifične ribozomalne RNK sekvence. Koristi jednolančanu DNKprobu obeleženu hemiluminiscentnom bojom, koja je komplementarna ribozomalnoj RNK. Ako dođe do formiranja DNK-RNK specifičnog hibrida, taj kompleks će biti registrovan u lumunimetru. Ovaj test je namenjen identifikaciji pneumokoka sa kulture. Sama reakcija traje manje od sat vremena, te je moguće dobiti brzo rezultate. Međutim, ovaj test je pozitivan i kod *Streptococcus pseudopneumoniae*.

PCR testovi za identifikaciju *S. pneumoniae*

Iako nema komercijalnih testova, razvijeno je više protokola za reakcije PCR pomoću kojih je moguće identifikovati gene specifične za *S. pneumoniae*. Detektuju se *lytA* gen (za autolizin), *ply* gen (za pneumolizin), *psaA* gen (za pneumokokni površni adhezin). Od gore pomenutih gena, *lytA* gen se smatra najspecifičnijim za pneumokok (slika 11), s obzirom da se ostala dva relativno često nalaze i kod ostalih streptokoka iz grupe mitis. Za identifikaciju pneumokoka je, takođe, vrlo specifičan PCR za detekciju 16S rRNA.



Slika 11. PCR produkt *lytA* gena – 319 bp

Detekcija nukleinskih kiselina se pokazala vrlo korisnom metodom u dijagnozi IPB. Pomoću PCR se sada već rutinski radi dokazivanje pneumokokne DNK u likvoru, što je znatno unapredilo dijagnozu pneumokoknog meningitisa. Međutim, dokazivanje bakterijske DNK u krvi nije još dostiglo osjetljivost klasičnih metoda dijagnostike, tj. kultivisanja.

9. Ispitivanje osjetljivosti *S. pneumoniae* na antibiotike

Ukoliko se laboratorijski potvrdi da je ispitivani invazivni izolat *Streptococcus pneumoniae*, treba uraditi antibiogram. Rutinski se radi disk difuzioni metod antibiograma, a za invazivne izolate treba odrediti i vrednost minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) za penicilin i cefotaksim ili ceftriakson.

Antibiogram se radi prema preporukama CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute, USA) ili EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Prema uputstvima CLSI, koriste se ploče Mueller Hinton agara, uz dodatak 5% ovčje krvi. EUCAST preporučuje da se koristi Mueller-Hinton agar + 5% defibrinisana konjska krv i 20 mg/L β -NAD (MH-F). Gustina bakterijske suspenzije treba da je 0,5 McFarland ukoliko se, za pravljenje koristi bakterijska kultura sa krvog agara, odnosno 1,0 McFarland, ukoliko je pneumokok kultivisan na čokoladnom agaru. Obavezno se, za izradu antibiograma, koristi sveža, prekonoćna kultura. Zasejne ploče MH/MH-F agara se inkubiraju na $35\pm 1^\circ\text{C}$, $18\pm 2\text{h}$, u prisustvu 5% CO_2 . Kao kontrolini soj se koristi *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619.

Ispitivanje osjetljivosti na beta-laktamske antibiotike

Za ispitivanje osjetljivosti na beta laktamske antibiotike se upotrebljava disk oksacilina, 1 μg . Ukoliko je zona inhibicije rasta ≥ 20 mm, može se smatrati da je soj osjetljiv na sve beta laktamske antibiotike. Ukoliko je soj rezistentan na oksacilin (zona ≤ 19 mm), ne može se izvesti zaključak o rezistenciji na beta laktamske antibiotike. Pošto se za lečenje pneumokoknih bolesti najčešće koriste penicilin i cefalosporini treće generacije (npr. ceftriakson), oba standarda (CLSI i EUCAST) upućuju da se odredi vrednost MIK ovih antibiotika, a svake godine oba standarda daju nove vodiče sa graničnim vrednostima za interpretaciju kategorija osjetljivosti. Prilikom procene osjetljivosti soja treba voditi računa da su i CLSI i EUCAST napravili razliku u interpretaciji u zavisnosti da li je soj izazivač meningitisa ili neke druge invazivne ili neinvazivne bolesti. U slučaju **meningitisa**, granične vrednosti su strožije.

Standard	Antibiotici	S	I	R
CLSI	penicilin (meningealni)	$\leq 0,06$	0,12-1	≥ 2
	ceftriakson / cefotaksim / cefepim (meningealni)	$\leq 0,5$	1	≥ 2
EUCAST	penicilin (meningealni)	$\leq 0,06$	-	$> 0,06$
	ceftriakson / cefotaksim (svi izolati)	$\leq 0,5$	-	> 2
	cefepim (svi izolati)	≤ 1	-	> 2

U slučaju da je ispitivani **izolat izazivač pneumonije, sepse itd.**, koriste se drugačiji kriterijumi za interpretaciju, koji zavise i od doze datog leka, odnosno koncentracije koju lek dostiže u krvi.

Standard	Antibiotici	S	I	R
CLSI	penicilin (ne-meningealni)*	≤ 2	4	≥ 8
	ceftriakson / cefotaksim (ne-meningealni)	$\leq 0,5$	1	≥ 2
	cefepim (ne-meningealni)	≤ 1	2	≥ 4
EUCAST	penicilin (ne-meningealni)**	$\leq 0,06$	-	> 2
	ceftriakson / cefotaksim (svi izolati)	$\leq 0,5$	-	> 2
	cefepim (svi izolati)	≤ 1	-	> 2

*doza i.v. datog penicilina od bar 2 miliona IU na 4 sata, tj. 12 miliona IU u toku dana će biti efikasna za sojeve sa $MIK \leq 2$, dok će za soj sa $MIK=4$ biti potrebno 18-24 miliona IU na dan

**u zavisnosti od doze penicilina, soj koji izaziva pneumoniju, sa MIK koji je veći od 0,06, može smatrati osetljivim:

- ako je doza benzilpenicilina 1,2 g x 4; granična vrednost za S je $S \leq 0,5$
- ako je doza benzilpenicilina 2,4 g x 4 ili 1,2 g x 6; granična vrednost za S je $S \leq 1$
- ako je doza benzilpenicilina 2,4 g x 6; granična vrednost za S je $S \leq 2$

Napomena: sve granične vrednosti su izražene u mg/L, odnosno $\mu\text{g/ml}$

U terapiji meningitisa se može još koristiti i meropenem i vankomicin.

CLSI preporučuje da se za izolate iz likvora daju interpretacije samo za sojeve iz likvora, dok za izolate iz drugih kliničkih materijala, treba dati interpretaciju i za meningealne i nemeningealne izolate.

S obzirom da se kriterijumi za procenu osetljivosti bakterija na antibiotike svake godine znanjavljaju, treba pratiti eventualne izmene. Preporuke i granične vrednosti EUCAST su dostupne na [ovom sajtu](#).

Za razliku od CLSI, EUCAST iz 2014. godine daje dodatna uputstva za "skrining" na rezistenciju pneumokoka na beta laktamske antibiotike:

oksacilin 1 μg dijametar zone inhibicije	Antibiotik	Dalje testiranje/interpretacija
≥ 20 mm	svi beta laktami	izvestiti da je soj osetljiv, bez obzira na kliničke indikacije
< 20 mm	benzilpenicilin (meningitis) i fenoksimetilpenicilin (sve indikacije)	izvestiti da je soj rezistentan
	benzilpenicilin (ne-meningitis)	odrediti MIK i interpretirati
	ampicilin, amoksicilin i piperacilin (sa ili bez inhibitora beta laktamaza), cefepim, cefotaksim, ceftriakson	zona ≥ 8 mm: izvestiti da je soj osetljiv zona < 8 mm: odrediti MIK za beta laktame
	drugi beta laktami	odrediti MIK i interpretirati

Ispitivanje osetljivosti na makrolidne antibiotike

Procena osetljivosti pneumokoka na makrolide se može izvršiti testiranjem osetljivosti na eritromicin. Ukoliko je soj osetljiv/rezistentan na eritromicin, može na osnovu toga zaključiti kakva je osetljivost na azitromicin, klaritromicin i roksitromicin. Inducibilna rezistencija na klindamicin se ispituje „double“ disk testom, odnosno aplikacijom diska eritromicina (15 µg) i klindamicina (2 µg), na rastojanju od 20 mm (CLSI), tj 12-16 mm (EUCAST). Pojava tzv. D zone oko klindamicina ka disku eritromicina, ukazuje na inducibilnu rezistenciju na klindamicin.

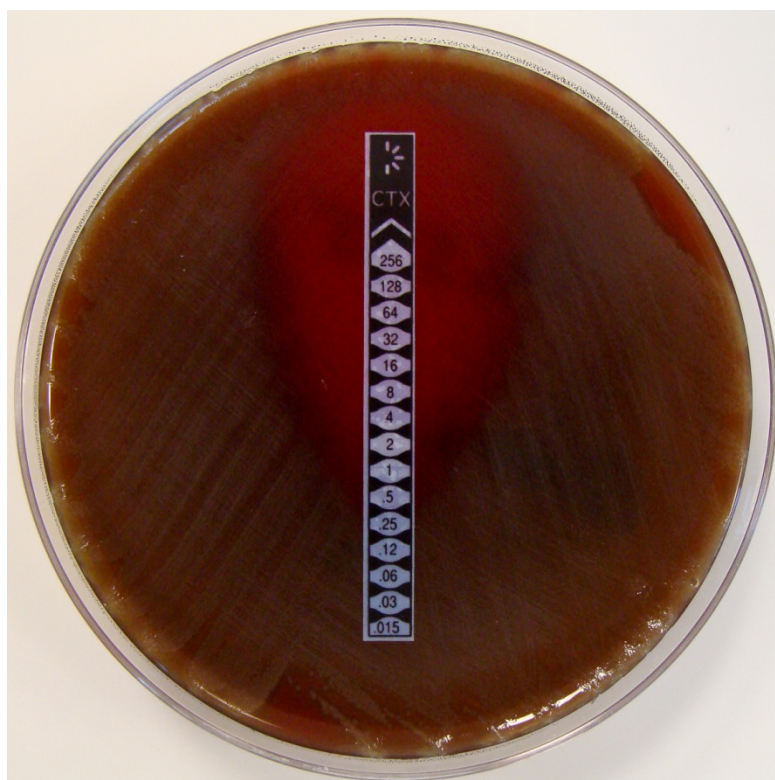
Prema EUCAST se disk norfloksacina (10 µg) se koristi kao skrining na rezistenciju na fluorohinolone. Pneumokok nije osetljiv na ciprofloksacin, te se izveštava da je intermedijarno osetljiv. Ako je soj osetljiv na norfloksacin (≥ 12 mm), može se izvestiti da je osetljiv na levofloksacin i moksifloksacin, a intermedijarno osetljiv na ciprofloksacin i ofloksacin. Ako je rezistentan na norfloksacin (< 12 mm), moraju se pojedinačno testirati ostali fluorohinoloni. Ne izveštava se osetljivost na norfloksacin, ali se rezultat notira. Prema CLSI se sojevi pneumokoka koji su osetljivi na levofloksacin, mogu smatrati osetljivim na gemifloksacin i moksifloksacin, dok obrnuto ne važi.

I CLSI i EUCAST daju granične zone za vankomicin, linezolid, hloramfenikol, tetracikline, rifampicin, a EUCAST i za teikoplanin.

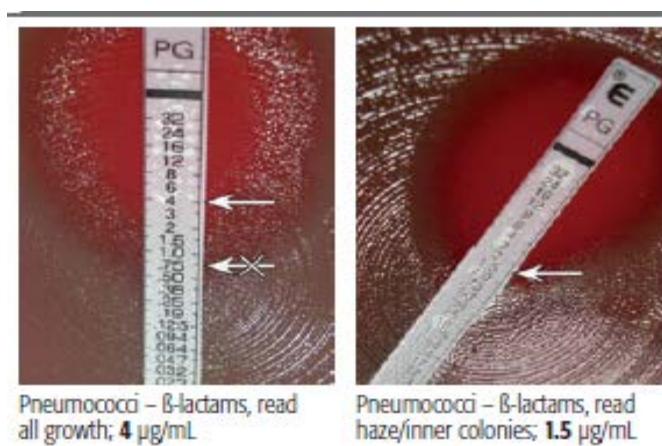


Slika 12. Disk difuzioni metod antibiograma, ispitivani izolat: *S. pneumoniae*; diskovi: oksacilina (1ug), hloramfenikola (10ug), tetraciklina (10 ug) i ertromicina (5 ug)

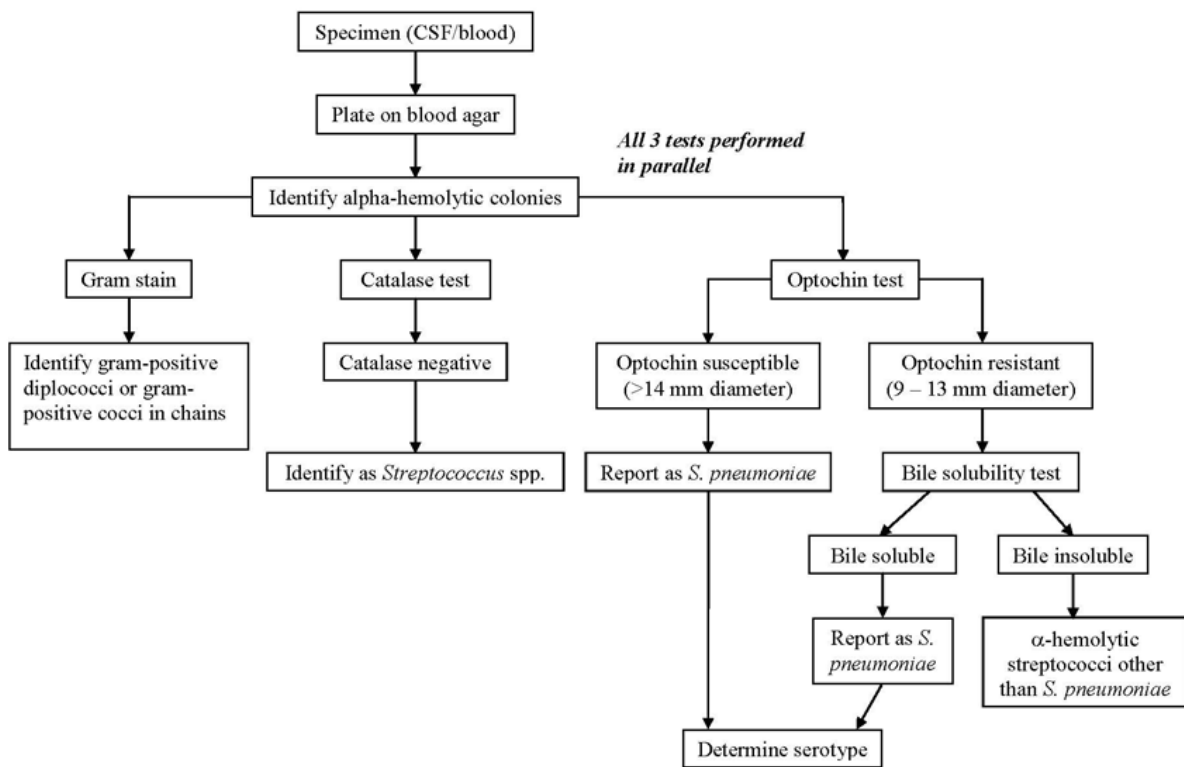
Vrednost MIK se obično u kliničkim laboratorijama određuje korišćenjem E testa (bioMerieux), M.I.C. Evaluators (Oxoid) ili Liofilchem® MIC Test Strips. Mogu se koristiti i komercijalni sistemi, npr. VITEK 2 AST P576, kao i BD Phoenix™ za Gram pozitivne bakterije.



Slika 13. Određivanje vrednosti MIK cefotaksima za pneumokok, pomoću trake M.I.C. evaluator (Oxoid), koji je ekvivalentan E testu (bioMerieux)



Slika 14. Uputstva za očitavanje MIK oko traka sa beta laktamskim antibioticima za pneumokok; u slučaju pojave kolonija koje urastaju u zonu inhibicije očitava se unutrašnja zona, odnosno uzima se u obzir celokupan rast pneumokoka, kao i u slučaju porasta sitnih kolonija pneumokoka u vidu izmaglice.



Algoritam za identifikaciju *Streptococcus pneumoniae*; preuzet sa [ovog sajta](#).

Karakteristike *Streptococcus pseudopneumoniae*:

- nema kapsulu
- nije rastvorljiv u žučnim solima
- osetljiv na optohin kada se inkubira u ambijentalnoj atmosferi, ali pokazuje rezistenciju ili interemedijarnu osetljivost na optohin u prisustvu 5% CO₂
- genske probe (AccuProbe Pneumo) su lažno pozitivne; moguće ga je razlikovati od *S. pneumoniae* u testu PCR za 16S rRNK.