

## Streptokoke, enterokoke i morfološki slični rodovi

U porodici *Streptococcaceae* su rodovi *Streptococcus*, *Lactovium*, *Lactococcus*. Rod *Streptococcus* sadrži 99 vrsta, humanih i animalnih patogena. Rod *Enterococcus*, koji se ustanovljen 1984. godine (porodica *Enterococcaceae*) ima 48 vrsta, a najznačajnije su *E. faecalis* i *E. faecium*. Pored streptokoka i enterokoka, koje se najčešće izoluju iz bolesničkog materijala, u tzv. streptokoku slične organizme se obrađuju i porodice, odnosno rodovi *Leuconostoc*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Gemella*, *Sarcina* i neki drugi, čiji su predstavnici izazivači značajnih, ali retkih infekcija kod ljudi.

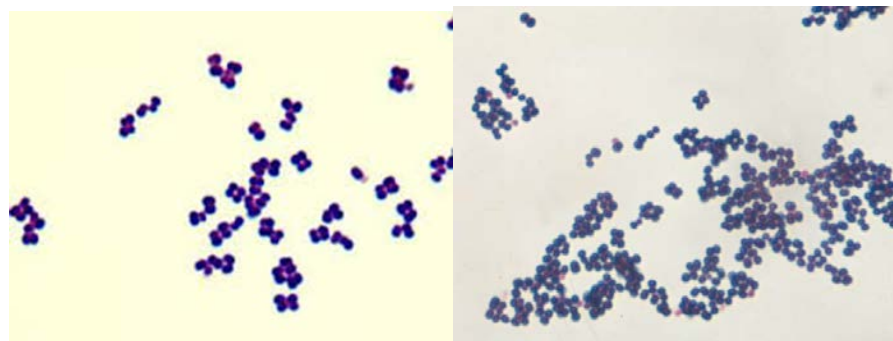
### Morfologija

*Streptococcus*, *Enterococcus* i *Lactococcus* su Gram pozitivne, okrugle ili ovalne koke u parovima i lancima različite dužine (nekad grupice).

*Streptococcus pneumoniae* je Gram pozitivna koka, oblika plamena sveće, u parovima, često se vidi kapsula.

*Aerococcus*, *Pediococcus* su Gram pozitivne koke u tetradama i grozdovima (slika 1).

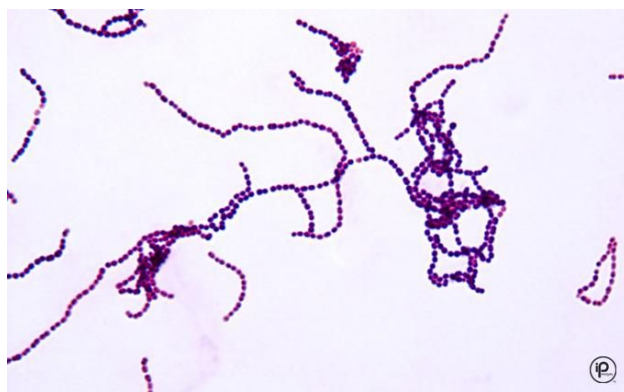
*Leuconostoc* su Gram pozitivne koke u parovima, grozdovima, kratkim lancima (slika 1). *Gemella* može izgledati kao Gram negativna koka.



Slika 1. Levo – *Aerococcus*; desno - *Leuconostoc*

## **Rod *Streptococcus***

Ovom rodu pripadaju brojne vrste, sa zajedničkim morfološkim, kulturelnim i biohemijskim karakteristikama. To su Gram pozitivne koke, prečnika 0.5-1  $\mu\text{m}$ , koje se ređaju u parovima ili lancima različite dužine, što je posledica specifičnosti njihove deobe (slika 2).



*Slika 2. Izgled *S. pyogenes* na preparatu obojenom po Gramu*

Katalaza su negativne. Većinom su fakultativni anaerobi; neke vrste su i kapnoične (rastu bolje u prisustvu 5-10 % ugljen dioksida). Zahtevi u pogledu ishrane su im kompleksni, te se za njihovu izolaciju koriste podloge

obogaćene animalnom krvlju ili serumom. Obično se koristi Trypticase soy agar ili Columbia agar, obogaćen 5% animalnom krvlju.

Biohemijski su aktivne; ugljene hidrate fermentuju, najčešće do mlečne kiseline (homofermentativne bakterije). Produkuju enzim leucin aminopeptidazu (LAP), koja se često naziva i leucin arilamidaza.

### ***Prema tipu hemolize koji daju na krvnom agaru se dele na (slika 3):***

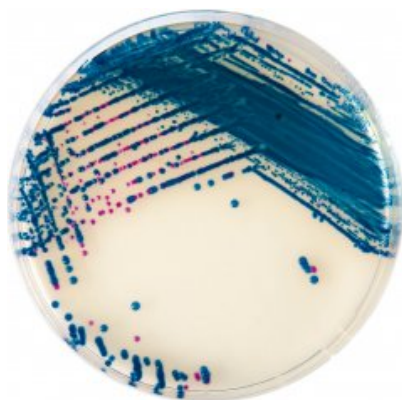
- beta ( $\beta$ ) hemolitičke streptokoke (BHS), koje kompletno razgrađuju hemoglobin iz eritrocita i daju prozračnu zonu hemolize oko kolonija
- alfa ( $\alpha$ ) hemolitičke streptokoke (nepotpuno razgrađuju hemoglobin iz eritrocita i daju zelenu zonu hemolize oko kolonija)
- anhemolitičke streptokoke, ranije nazivane gama ( $\gamma$ ), koje ne razgrađuju hemoglobin
- alfa prim ( $\alpha'$ ) hemolitičke streptokoke - mala zona intaktnih eritrocita oko kolonija, okruženu zonom kompletne hemolize (često se meša sa beta hemolizom)

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka



Slika 3. Izgled beta, alfa hemolize i ploča bez hemolize (desno)

Za izolaciju streptokoka se mogu, pored neselektivnog krvnog agara, koristiti i selektivne podloge, koje pored osnovne baze i krvi, sadrže i odabrane antibiotike da inhibiraju porast druge flore. Tako se za inhibiciju porasta oralne flore (najserijska, hemofilusa, mikrokoka, Gram negativnih koliformnih bakterija) koristi podloga sa dodatkom neomicina i polimiksina B. Na podlozi sa trimetoprim sulfametoksazolom rastu *S. pyogenes* i *S. agalactiae*, ali ne i većina vrsta koje su deo normalne flore faringusa. Za izolaciju *S. agalactiae* se koriste selektivne podloge, na koje se zasejavaju uzorci iz genitalnog i digestivnog trakta. Te podloge sadrže kolistin i kristal violet (Granada), gentamicin i nalidiksinsku kiselinu (Todd Hewitt bujon), a od velike je pomoći hromogena podloga za grupu B streptokoka (GBS), na kojoj se dobro razlikuju kolonije GBS od kolonija enterokoka (slika 4).



Slika 4. Hromogena podloga za *S. agalactiae*

*S. agalactiae* – ljubičaste kolonije, druge bakterije (enterok) – plave kolonije, ili bezbojne.

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

Prema prisustvu grupno specifičnog Lancefield-ovog antigena u ćelijskom zidu (C polisaharid) se dele na 20 serogrupa, označenih slovima od A to V (bez I i J). Humane infekcije izazivaju streptokoke koje poseduju grupno specifične antigene A-G.

### Grupa A

- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus anginosus* i *Streptococcus constellatus* subspecies *constellatus* mogu dati ukrštene reakcije sa grupom A

### Grupa B

- *Streptococcus agalactiae*

### Grupa C

- *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*
- *Streptococcus equi* subspecies *equi*
- *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*
- *Streptococcus anginosus*
- *Streptococcus constellatus* subspecies *pharyngis*

### Grupa D

- *Enterococcus* species

### **Streptococcus bovis** grupa (problematična klasifikacija)

- *Streptococcus bovis*
- *Streptococcus gallolyticus*
- *Streptococcus gallolyticus* subsp *gallolyticus* (*S. bovis* biotype I)
- *Streptococcus gallolyticus* subsp *pasteurianus* (*S. bovis* biotype II/2)
- *Streptococcus gallolyticus* subsp *macedonicu*,
- *Streptococcus equinus*
- *Streptococcus infantarius* (ranije *S. bovis* biotype II/1)
- *Streptococcus pasteurianus*
- *Streptococcus lutetiensis*

### Grupa F

- *Streptococcus anginosus*
- *Streptococcus constellatus* subspecies *constellatus*

### Grupa G

- *Streptococcus anginosus* i *Streptococcus constellatus* subspecies *constellatus* mogu imati grupu G

### **Viridans streptokoke**

Dele se u subgrupe:

- **Streptococcus anginosus grupa** (takođe i *S. milleri* grupa)  
Vrste: *S. anginosus*, *S. anginosus subspecies whileyi*, *S. constellatus subspecies constellatus*, *S. constellatus subspecies pharyngis*, *S. constellatus subspecies viborgensis*, *S. intermedius*
- **Streptococcus mutans grupa** – *S. mutans*, *S. sobrinus*
- **Streptococcus mitis grupa** – *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis*, *S. cristatus*, *S. massiliensis*, *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. peroris*, *S. oligofermentans*, *S. australis*, *S. infantis*, *S. sinensis*
- **Streptococcus salivarius grupa** – *S. salivarius*, *S. vestibularis*
- **Streptococcus sanguis**

### **Rod Enterococcus**

*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*

### **Druge značajne vrste:**

*Aerococcus sp*, *Facklamia sp*, *Gemella sp*, *Globicatella sp*, *Helcococcus sp*, *Lactococcus sp*, *Leuconostoc sp*, *Pediococcus sp*

### **Testovi koji se koriste za identifikaciju streptokoka**

Za sve testove je neophodno koristiti svežu, 18-24 časa staru kulturu ispitivanih bakterija, inkubiranu na krvnom agaru.

- **Test katalaze**

Koristi se da bi se detektovalo prisustvo enzima katalaze, koja razgrađuje vodonik peroksid do kiseonika i vode. Enzim katalaza je prisutan samo u živim kulturama, tako da test mora izvoditi samo sa kulturom starom 18 do 24 sata. Kod starijih kultura postoji mogućnost da više nemaju katalazu, te da rekaicja bude lažno negativna. Vodonik peroksid je nestabilan, te se mora čuvati u frižideru. Voditi računa da se ezom ne prenese deo krvnog agara, što takođe može dovesti do lažno pozitivne reakcije.

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

Test se može izvoditi na staklenoj pločici, u epruveti ili se direktno ukapava 3% vodonik peroksid na bakterijsku kulturu. U slučaju pozitivne reakcije dolazi odmah do pojave mehurića kiseonika. Streptokok je katalaza negativan. Moguća slabo pozitivna reakcija ili pseudokatalaza kod *Aerococcus* spp. i *Enterococcus* spp.

### • Ispitivanje osetljivosti na bacitracin

Ovaj test se koristi prvenstveno za identifikaciju *S. pyogenes*. Bacitracin je antibiotik i test se izvodi kao disk difuzioni metod antibiograma. Inkubira se 18-24 sata na 35°C. Za razliku od drugih beta hemolitičkih streptokoka, *S. pyogenes* je osetljiv na bacitracin. Svaka zona inhibicije rasta oko bacitracina se smatra pozitivnom reakcijom.



Slika 5. Bacitracinski test - pozitivan

### • Ispitivanje osetljivosti na sulfometokslazol-trimetoprim (SXT- TMP)

Princip test je isti kao i bacitracinski i izvodi se obično zajedno sa njim. Grupe A i B BHS su rezistentne na SXT, dok su druge BHS (npr. C) osetljive. Test nije dovoljno pouzdan, ali se, zbog jednostavnosti i jeftinoće često radi u laboratorijama.

	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	Druge BHS
bacitracin	S	R	R
TMP SXT	R	R	S

Tabela 1. Profil osetljivosti beta hemolitičkih streptokoka (BHS) na bacitracin i TMP SXT

### • PYR test (test hidrolize PYR)

Koristi se za identifikaciju *S. pyogenes*, kao i roda *Enterococcus*. Test detektuje prisustvo enzima pirolidonil arilamidaze kod izolata. Vrlo je specifičan za grupu *S. pyogenes* i većinu enterokoka,

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

koji mogu da hidrolizuju supstrat - pirolidonil naftilamid (PYR). Postoji više komercijalnih testova (kao papir ili disk impregniran reagensom). Izvodi se prema uputstvu proizvođača. Ako se koriste filter papiri, oni se nakvase destilovnom vodom i na njih nanese nekoliko ispitivanih kolonija. Posle odgovarajuće inkubacije (temperature i vremena, što zavisi od proizvođača) se dodaje reagens (tzv.colour developer) i očitava reakcija. Promena boje u crvenu ukazuje da je reakcija pozitivna.



Slika 6. Pozitivan PYR test

*Enterococcus* spp. i *S. pyogenes* su pozitivni; *S. bovis* grupa i *S. anginosus* grupa su negativni.

- **Leucin aminopeptidaza (LAP)**

LAP je peptidaza koja hidrolizuje peptidne veze u susedstvu slobodnih aminokiselina. Pošto LAP reaguje brzo sa leucinom, zove se leucin aminopeptidaza. Supstrat je leucin  $\beta$  naftilamid, koji se razlaže do naftilamina. Posle dodavanja reagensa DMCA, dolazi do pojave crvene boje. Ovaj test se obično radi sa PYR testom i vrlo je koristan za razlikovanje *Aerococcus* i *Leuconostoc* od drugih Gram pozitivnih koka (slika 7).



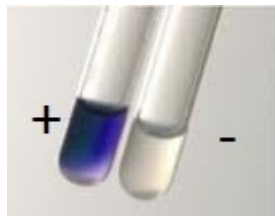
Slika 7. LAP test i kombinacije sa PYR testom

- **Test hidrolize natrijum - hipurata**

Koristi se za identifikaciju grupe B BHS. Testom se ispituje sposobnost ove bakterijske vrste da, pomoću enzima hipurikaze, hidrolizuje kiselinu do natrijum benzoata i glicina. Naknadno dodavanje ninhidrina dovodi do oslobađanja amonijuma iz glicina. Amonijum reaguje sa rezidualnim ninhidrinom i stvara se ljubičasti kompleks. Test se izvodi tako što se rastvor Na hipurata inokuliše gustom suspenzijom ispitivane kulture, inkubira 2 sata na 35-37°C

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

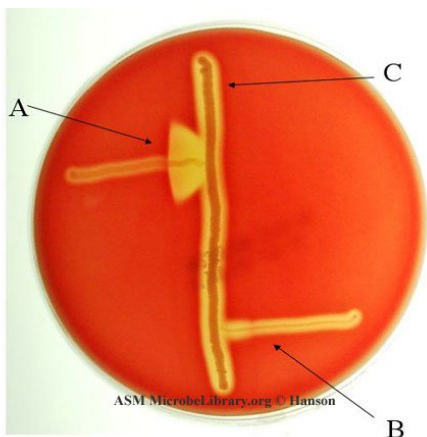
i dodaje ninhidrin. Inkubira se još 10-15 minuta. U slučaju pozitivne reakcije se pojavljuje tamno ljubičasta boja.



Slika 8. Hidroliza hiuprata

### • CAMP test (*Christie; Atkins; Munch-Petersen*)

Ovaj test se primenjuje za identifikaciju grupe B BHS. Bazira na fenomenu olakšane hemolize, koja nastaje kada beta-hemolizin *Staphylococcus aureus* i hemolizini grupe B BHS dođu u kontakt. Na krvnom agaru se uočava kao karakteristična pojačana lučna zona beta hemolize na mestu gde se kolonije grupe B BHS i *S.aureus* približavaju. Test se izvodi na krvom agaru sa ovčjom krvi, na koji se nanosi ezom *S. aureus* u vidu crte. Pod pravim uglom na nju se, ezom, nanosi ispitivani izolat u vidu crte, tako da se ne dodiruje sa *S.aureus*. Inkubira se na 35°C 18 sati. Pojava pojačane hemolize u vidu strele na mestu gde se približavaju kolonije *S. aureus* i streptokoka ukazuje na pozitivan rezultat (slika 9).



Slika 9. CAMP test

A je *S. agalactiae*  
B – CAMP negativan izolat  
C – *S. aureus*

### • Test hidrolize eskulina

Test detektuje mogućnost hidrolize eskulina u prisustvu 40 % žuči. Specifičan je za grupu D BHS i rod *Enterococcus*. Ove dve vrste rastu u prisustvu žuči i proizvode eskulin iz eskuletina. Eskuletin difunduje u agar i reaguje sa feri citratom iz medijuma, pri čemu nastaje crni kompleks. Podloga sa inokulisanom kulturom inkubira se na 35°C 18 -24 sata. Pozitivan rezultat se često vidi



## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

već posle 4 sata inkubacije. Pojava crne boje na kosini agara ukazuje na pozitivan rezultat (slika 10). Neki sojevi *Aerococcus* i *Leuconostoc* spp. mogu da hidrolizuju eskulin.

Slika 10. Hidroliza eskulina u prisutvu žuči



Epruveta

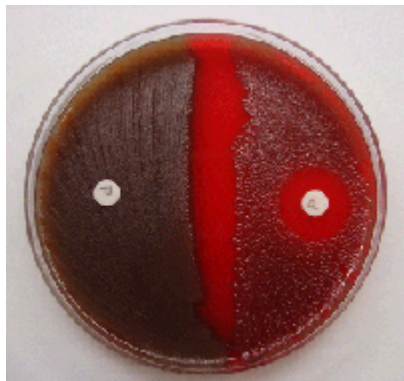
- levo – negativna kontrola
- u sredini – negativan rezultat
- desno – pozitivan rezultat

### • Test tolerancije soli (6.5 %NaCl)

Rod *Enterococcus*, za razliku od ostalih streptokoka može da raste u prisutstvu 6,5%. To mogu i neki sojevi iz rodova *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, stafilokok, a ponekad i *S. agalctiae*. Test se izvodi tako što se nekoliko kolonija prenoćne culture ispitivanog izolata inokulišu u triptikaza soja bujon sa 6,5% NaCl. Inkubira se na 35°C 24 sata i gleda pojava zamućenja.

### • Optohinski test

Ovo je najčešće korišćen test za razlikovanje *S.pneumoniae* od alfa hemolitičkih viridans streptokoka. Izvodi se kao disk difuzioni metod antibiograma i pomoću njega se ispituje osetljivost izolata na optohin (etil hidrokuprein). Pneumokok je osetljiv na optohin, dok viridans streptokoke nisu. Ukoliko je zona inhibicije rasta oko optohina  $\geq 14$  mm, smatra se da je rezultat pozitivan, tj. soj je osetljiv na optohin - *S. pneumoniae* (slika 11). Neki sojevi *S. oralis*, *S. mitis* i *S. pseudopneumoniae* su osetljivi na optohin.



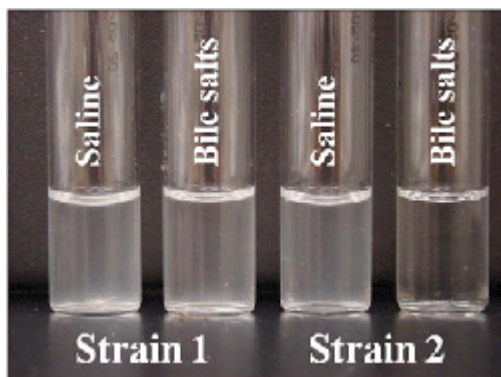
Slika 11. Optohinski test

Levo – negativan, desno - pozitivan

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

### • Test lize žučnim solima

Ovo je vrlo specifičan test za identifikaciju *S.pneumoniae*. Pod uticajem žučnih soli, dolazi do aktivacije autolizina pneumokoka i lize bakterijske kulture. Jednostavan je za izvođenje, a pozitivan rezultat predstavlja izbistravanje bujonske kulture pneumokoka par minuta po dodavanju žučne soli (natrijum dezoksiholata, Na-DOC). Za test u peruveti se koristi 10% rastvor natrijum dezokisholata u vodi. Napravi se gusta suspenzija čiste, sveže (18-24 sata stare) ispitivane kulture u 1 ml 0,85% rastvora NaCl (fiziološkom rastvoru, FR). Podeli se u dve epruvete (kontrola I test) i doda 0,5 ml 10% Na – DOC u test epruvetu, dok se u kontrolnu dodaje 0,5 ml FR. Inkubira se na 37°C do 15 min. Izbistravanje test epruvete, u zamućenost u kontrolnoj kazuje da je došlo do autolize i da je test pozitivan (slika 12).



Slika 12. Test lize žučnim solima

Testirana su dva soja, svaki je imao kontrolnu I test epruvetu.

Soj 1 (strain1) – nije značajna razlika u zamućenju između kontrole i test epruvete = nije *S. pneumonia*

Soj 2 (strain2) – značajna je razlika u zamućenju između kontrole i test epruvete, koja je bistra = *S. pneumoniae*

*S.pneumoniae* je rastvorljiv u žučnim solima; *S. pseudopneumoniae* je delimično rastvorljiv, dok druge alfa hemiolitičke streptokoke nisu.

### Test osetljivosti na vankomicin

Izvodi se kao disk difuzioni metoda antibiograma, u cilju identifikacije. Neke vrste katalaza negativnih koka koje liče na streptokok mogu biti rezistentne na vankomicin.

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

### Ispitivanje antigenskih osobina

Ovi imunološki testovi se zasnivaju na reakciji imunoaglutinacije između lateks partikula obloženih specifičnim antitelima na grupno specifične antigene streptokoka i antigena ispitivane kulture streptokoka. Prave ih razni proizvođači. Reakcija se izvodi po uputstvu proizvođača. Najčešće se ispitivani izolat (prekonoćna kultura) suspenduje u enzimu koji služi za ekstrakciju antigena. Potom se pomeša kap bakterijske suspenzije i kap lateks partikula obeleženih antitelima. Reakcija u vidu aglutinacije se uočava u roku od 30 sekundi do 1 minut. Postoje setovi za detekciju streptokoka grupa A, B, C, D, F i G (slika 13).



Slika 13. Imunoaglutinacioni testovi za identifikaciju serogrupa streptokoka

- **Komercijalni biohemijski testovi za identifikaciju streptokoka (API, Crystal)**

Baziraju na identifikaciji vrsta streptokoka na osnovu analize biohemijskog profila. Mogu sadržati 20, odnosno 32 supstrata. Očitavanje je na osnovu promene boje posle 4h i/ili 24 sata inkubacije inokulisanih stripova (slika 14).



Slika 14. Izgled API stripova za streptokok. Gore – sve reakcije su pozitivne; Dole- sve reakcije su negativne

Mogu se koristiti i automatizovani sistemi (Vitek, Phenix) za identifikaciju streptokoka, koji mogu, pored identifikacije testirati i osetljivost izolata na antibiotike. Poslednjih godina je u upotrebi i vrlo efikasna MALDI TOF spektrofotometrija masa, iako za sada postoje još neki problemi u tačnoj identifikaciji vrsta u grupi *S. mitis*.

Genetičkim analizama je moguće, tađe, izvršiti identifikaciju pojedinih vrsta streptokoka.

## Osobine najznačajnijih vrsta roda *Streptococcus*

### ***Streptococcus pyogenes* (grupa A streptokoka, GAS)**

*Streptococcus pyogenes* se ređa u vidu lanaca. Posle 18-24 sati inkubacije na 35-37°C na krvnom agaru (KA) formira kolonije velike oko 0.5mm, konveksne, sa celim ivicama.

Tabela 2. Najznačajnije karakteristike *S. pyogenes*

	<b><i>Streptococcus pyogenes</i> (grupa A streptokoka, GAS)</b>
Kulturelne osobine	konveksne, beta hemoliza, inkubacija 18-24 sati 35-37° Hemoliza je uočljivija pri anaerobnoj inkubaciji
Grupni antigen	A (poseduju i vrste <i>S. anginosus</i> grupe, koje formiraju male, minutne kolonije)
Bacitracin	osetljiv
PYR	+ (i <i>Enterococcus</i> )
Podloga sa žuči	ne raste
Osetljivost na benzil penicilin	osetljiv

Neki sojevi formiraju mukoidne kolonije. Hemoliza se najbolje vidi kada kultura raste u anaerobnim uslovima, jer su hemolizini stabilniji u odsustvu kiseonika. Ne rastu na podlozi sa eskulinom. Posедуje grupno specifičan A antigen, ali s' obzirom da i vrste *S. anginosus* grupe, koje formiraju male (minutne) kolonije takođe mogu imati grupno specifični A antigen, može doći do zabune. *S. anginosus* grupa raste na podlozi sa žuči. Obično se koristi bacitracinski test za preliminarnu identifikaciju, ali se mora naglasiti da nije visoko specifičan, i da rezultati mogu varirati između laboratorija. Do sada nije za beležena rezistencija na benzil penicilin, kao ni ostale beta laktame. Test pirolidonil aminopeptidaze (ili pirolidonil arilamidaza, PYR) je pozitivan za GAS, a negativan za većinu drugih BHS (neki humani sojevi grupe C I G mogu biti pozitivni). Enterokok je PYR pozitivan.

### ***Streptococcus agalactiae* (beta hemolitički streptokok, grupe B, GBS)**

*Streptococcus agalactiae* se ređa u lancima. Posle 18-24 časovne inkubacije na 35-37°C formira kolonije malo veće od drugih streptokoka (oko 1mm) i zonu β-hemolize. Neki sojevi su anhemolitični. Raste na podlozi sa žuči.

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

Tabela 3. Najznačajnije karakteristike *S. agalactiae*

	<b><i>Streptococcus agalactiae</i> (grupa B streptokoka, GBS)</b>
Kulturelne osobine	konveksne, beta hemoliza, inkubacija 18-24 sati 35-37°
Grupni antigen	B (jedna vrsta sa grupno specifičnim B Ag)
Bacitracin	rezistentan
PYR	-
Hidroliza Na hipurata	+
CAMP test	pozitivan
Podloga sa žuči	raste
Osetljivost na benzil penicilin	osetljiv, ali je osetljivost manja nego drugih BHS

### Streptokoke grupa A, C, G i L

- *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (može imati grupno specifične antigene A, C, G i L)
- *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (grupa C)
- *Streptococcus canis* (grupa G)

Gram pozitivne koke, u lancima.

Grupe C i G koje formiraju **velike kolonije** ( $\geq 0.5\text{mm}$ ) imaju slične kolonije kao *S. pyogenes*. Sojevi *S. dysgalactiae* subspecies *equisimilis* grupa C i G su znatno češći uzročnici infekcija nego sojevi sa grupom A.

Ne rastu na podlogama sa žuči (za razliku od *S. anginosus* sa malim kolonijama i grupnim C i G antigenima).

### Streptokoke grupa A, C, F i G

#### ***Streptococcus anginosus* grupa (*S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*):**

*Streptococcus anginosus* - A, C, F i G antigen

*Streptococcus constellatus* ima 3 subspecijesa -C i F antigen

*Streptococcus intermedius* (ranije "*Streptococcus milleri*" grupa) –**nema** grupni antigen

Gram pozitivne koke u lancima. Na krvnom agaru posle 16-24 sata na 35-37°C formiraju **male kolonije** ( $\leq 0.5\text{mm}$ ) sa  $\alpha$ ,  $\beta$  hemolizom, ili bez hemolize.

*S. anginosus* grupa bolje raste u uslovima sa malo kiseonika i sa dodatkom CO<sub>2</sub>.

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

Vrste u ovoj grupi mogu imati grupno specifičan A, C, F ili G antigen, ili ga ne moraju imati.

*S. intermedius* nema grupno specifičan antigen. *S. constellatus* može imati C ili F antigen, a *S. anginosus* A, C, F ili G antigene. F antigen najčešće eksprimira *S. anginosus*.

Mogu da rastu na podlogama sa žuči, ali ne tolerišu veće koncentracije soli. Za vrste u *S. anginosus* grupi se može za skrining koristiti rezistencija na bacitracin i sulfonamide. Značajna je njihova identifikacija, jer mogu biti uzročnici invazivnih infekcija.

Tabela 4. Najznačajnije karakteristike streptokoka koje nisu *S. pyogenes* i poseduju antigene A, C, F i G

	<b>Streptokoke grupa A, C, G, F</b>
Kulturelne osobine	Konveksne, beta hemoliza, inkubacija 18-24 sati 35-37° Vrste sa velikim ( $\geq 0.5$ mm) kolonijama (kao <i>S. pyogenes</i> ) i malim, minutnim ( $\leq 0.5$ mm) kolonijama, koje mogu biti sa $\alpha$ , $\beta$ hemolizom, ili bez hemolize.
Najčešće vrste i grupni antigeni	<b><i>Streptococcus dysgalactiae</i> subspecies <i>equisimilis</i></b> (najčešće grupno specifični antigeni C i G Ag), značajni sa velikim kolonijama <b><i>Streptococcus equi</i> subspecies <i>zooepidemicus</i></b> (gr. C), značajni sa velikim kolonijama <b><i>Streptococcus anginosus</i> grupa</b> (češće C i F antigeni), a malim kolonijama
Bacitracin	rezistentni
PYR	+ (i <i>Enterococcus</i> )
Podloga sa žuči	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subspecies <i>equisimilis</i> i <i>Streptococcus equi</i> subspecies <i>zooepidemicus</i> ne rastu <i>S. anginosus</i> raste
Osetljivost na benzil penicilin	osetljivi

### Grupa D streptokoka

#### ***Enterococcus* species, *Streptococcus bovis* grupa**

Poseduju D antigen, koji je po sastavu lipoteihoinjska kiselina. Rastu na podlogama sa žuči, a razlikuju se od drugih streptokoka po brzom hidrolizi eskulina u prisustvu 40% žuči.

Enterokoke se mikroskopski uočavaju kao Gram pozitivne koke, sferne ili ovoidne, obično u parovima ili kratkim lancima.. Na KA posle 18-24 časovne inkubacije na 35-37°C formiraju kolonije 1 - 2mm sa  $\alpha$ ,  $\beta$  ili anhemolitične na konjskoj krvi. Većina vrsta raste na hranljivom agaru na 45°C;

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

neki i na 50°C, na pH 9.6 i u prisustvu 6.5% NaCl. Mogu da prežive i na 60°C 30min i PYR su pozitivni, što ih razlikuje od *S. bovis* i *S. gallolyticus*.

Fakultativni su anaerobi. Neki su i pokretni (*E. cassiflavus* i *E. gallinarum*). Oksidaza su negativni i fermentuju ugljene hidrate. Većinom su katalaza negativni, ali neki sojevi mogu proizvoditi pseudokatalazu. Većinom imaju grupno specifični D antigen.

*E. faecalis* je retko rezistentan na ampicilin. Međutim, sojevi rezistentni na vankomicin i druge glikopeptide (V/GRE) su relativno česti. Rezistencija se širi transpozonima i plazmidima, te se prenosi i na druge vrste. Stečena rezistencija se najčešće nalazi kod *E. faecium* i *E. faecalis* I tipično je kodirana *vanA* i *vanB* genima. Sojevi sa *vanA* genom ekprimiraju visok nivo rezistencije na vankomicin i teikoplanin, dok sojevi sa *vanB* genom mogu pokazivati različite nivoe rezistencije samo na vankomicin.

Tabela 5. Najznačajnije karakteristike streptokoka grupe D i enterokoka

	Streptokoke grupe D ( <i>S. bovis</i> grupa i enterokok)
Kulturelne osobine	Enterokok - $\alpha$ , $\beta$ ili anhemolitične kolonije <i>S. bovis</i> – anhemolitične kolonije
Najčešće vrste i grupni antigeni	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. faecium</i> - grupa D <i>Streptococcus bovis</i> (6 vrsta) – grupa D
Rast na 45°C u prisustvu 6.5% NaCl	<i>Enterococcus</i> – da <i>S. bovis</i> - ne
Bacitracin	rezistentni
PYR	<i>Enterococcus</i> – da <i>S. bovis</i> - ne
Hidroliza eskulina u prisutvu žuči	da
Osetljivost na antibiotike	različita

U ***S. bovis*** grupi je 6 vrsta: *S. bovis*, *S. equinus*, *S. gallolyticus* (pre *S. bovis* biotip I), *S. infantarius* (pre *S. bovis* biotip II/1), *S. pasteurianus* (pre *S. bovis* biotip II/2) i *S. lutetiensis*. Gram pozitivne koke u lancima. Posle 18-24 sati inkubacije na 35°C-37°C u prisustvu CO<sub>2</sub> ili anaerobno, formiraju ugl. anhemolitične kolonije na KA, veličine 1-2mm. Mogu se pomešati sa enterokokama, zbog grupno specifičnog D antigena. Važno ih je identifikovati, posebno u slučaju bakterijemije, jer se neke vrste - *S. gallolyticus* i *S. pasteurianus* često nalaze kod obolelih od hroničnih bolesti debelog creva (adenokarcinom kolona). PYR su negativni, što ih razlikuje od enterokoka.

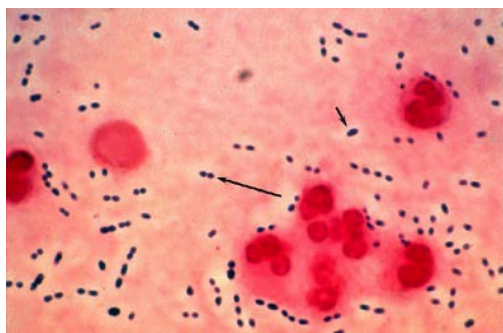
### ***Streptococcus suis***

*S. suis* je beta hemolitičan na konjskoj krvi, optohin rezistentan i PYR negativan. Obično poseduje grupe R, S i T. Ne raste u bujonu sa 6.5% NaCl. Neki sojevi mogu rasti u prisustvu 40% žuči i mogu hidrolizovati eskulin.

## **Streptokoke koje ne poseduju grupno specifične antigene**

### ***Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* (pneumokok) je tipično oblika lancete, grupiše se u parovima, koji mogu biti okruženi kapsulom (slika 15).



Slika 15. Izgled Gram pozitivnih diplokoka okruženih kapsulom u direktnom preparatu sputum (vide se i neutrofili)

Kolonije su velike oko 1-2mm,  $\alpha$ -hemolitične i mogu imati udubljenje (kao krater) zbog hidrolize u stacionarnoj fazi rasta (posle inkubacije sa 5-10% CO<sub>2</sub> na 35-37°C tokom 16-24 sati). Nekada su vrlo sluzave (mukoidne). U anaerobnim uslovima kolonije mogu biti veće i više mukoidne (slika 16).



Slika 16. Mukoidne kolonije *S. pneumoniae* (levo) i tipično udubljene kolonije, zbog autolize (desno)



## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

*S. pneumoniae* je obično osjetljiv na optohin (etilhidrokuprein hidrohlorid), iako ima i rezistentnih sojeva. Rastvorljiv je u žučnim solima.

Može se identifikovati i serološki – reakcijom aglutinacije, a serotipovi se određuju reakcijom bubrenja kapsule. Komercijalni testovi aglutinacije (koji sadrže At na više 80 kapsularnih tipova, koja su apsorbirana na lateks partikule) mogu dati ukrštenu reakciju sa srodnim vrstama iz *S. oralis* i *S. mitis* grupa.

Tabela 6. Najznačajnije karakteristike *S. pneumoniae* i *viridans* streptokoka

	<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	<b>Viridans streptokoke</b>
Kolonije	alfa hemolitične, udubljene	alfa ili anhemolitične
Morfologija	Gram pozitivne diplokoke, oblik plamena sveće (kapsula)	Gram pozitivne u vidu lanaca
Optohin	osjetljiv	rezistentan
Aglutinacija sa antipneumokoknim antiserumom	da	ne (retko ukršteno pozitivne)
Liza žučnim solima	pozitivna	negativna
Automatizovani sistemi	Moguće je da dođe do pogrešne identifikacije i da se sojevi <i>S.mitis/S.oralis</i> identifikuju kao <i>S. pneumoniae</i>	

### Viridans streptokoke

Ime viridans potiče od latinske reči viridis, što znači zelen. Gram pozitivne koke u lancima (kao i BHS). Formiraju kolonije od oko 0.5-1.0 mm, koje su  $\alpha$  ili anhemolitične na KA posle anaerobne inkubacije na 35-37°C u prisustvu CO<sub>2</sub> 16-24 sata. Nemaju grupno specifičan antigen i rezistentni su na optohin. Nerastvorljivi su u žuči.

U grupi *Streptococcus mitis* je novoidentifikovani *Streptococcus pseudopneumoniae*, koji se može pomešati sa *S. pneumoniae*. Međutim, od pneumokoka se razlikuje po:

- odsustvu kapsule (ne može se tipizirati)
- nerastvorljiv je u žuči
- osjetljiv je na optohin kada se inkubira u ambijentalnom vazduhu, ali je rezistentan ili intermedijarno osjetljiv kada se inkubira u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>.

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

Generalno, ove streptokoke je dovoljno identifikovati kao  $\alpha$  ili anhemolitične streptokoke ukoliko se izoluju iz uzoraka kolonizovanih normalnom florom. Međutim, u slučaju sumnje na endocarditis, treba ih identifikovati. Posebno su česti streptokokni endokarditisi izazvani vrstama *Streptococcus sanguinis* i *Streptococcus oralis*.

**Tabela 7. Identifikacija naiznačajnijih humanih vrsta streptokoka**

	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.agalactae</i>	BHS C,F,G	enterokok	BHS gr.D	<i>S.pneumoniae</i>	viridans streptok
Hemoliza	Beta	Beta	Beta	Alfa i bez hemolize	Alfa i bez hemolize	Alfa	Alfa
Bacitracin	S	R	R	R	R	S	R
TMP SXT	R	R	S	R	V	S	S
Optohin	R	R	R	R	R	S	R
Hidroliza hipurata	–	+	–	–	–	–	–
PYR test	+	–	–	+	–	–	–
CAMP test	–	+	–	–	–	–	–
Hidroliza eskulina u 40% žuči	–	–	–	+	+	–	–
Rast u pris. 6.5% NaCl	–	–	–	+	–	–	–
Rast na +10°C i +45°C	–	–	–	+	–	–	–
Grupa po Lancefield	A	B	C,F,G	D	D	nema gr. spec. Ag	nema gr. spec.Ag

### Rodovi slični streptokokama

#### ***Aerococcus* spp.**

Ima 7 vrsta u rodu *Aerococcus*, od čega je 5 patogeno i izazivaju urinarne i invazivne infekcije (i infektivni endokarditis). Aerokoke liče na viridans streptokoke na kulturi, ali se na preparatu uočavaju kao parovi, tetrade i grozdovi, slično stafilokokama. Nekada su slabo katalaza pozitivni. Relativno su sporo rastući i formiraju male, jasno ograničene, prozračne, alfa hemolitične kolonije na KA. Neki sojevi *Aerococcus viridans* su eskulin i PYR pozitivni. *Aerococcus urinae* je eskulin i PYR negativan. Rastu i u aerobnim i anaerobnim uslovima.

Većinom su osjetljivi na beta laktame, kao i većinu drugih antibiotika. Osetljivi su na vankomicin.

***Gemella spp.***

Ima 5 vrsta u rodu. Katalaza su negativne, fakultativno anaerobne, Gram varijabilne koke, koje se ređaju u parovima, tetradama i grozdovima, nekada lancima. Neki sojevi se vrlo brzo dekolorizuju u bojenju po Gramu, pa postaju Gram negativni. Neki sojevi su strktno anaerobni. Na KA su ili  $\alpha$ -hemolitični ili anhemolitični i liče na kolonije viridans streptokoka. Kolonije su male i sive ili bezbojne. U nekim komercijalnim sistemima se viridans streptokoke mogu pogrešno identifikovati kao *Gemella spp.*

***Lactococcus spp.***

Ima 7 vrsta u ovom rodu. Vrlo su slični enterokokama – fakultativno su anaerobni,  $\alpha$  ili anhemolitični, ređaju se kao pojedinačne Gram pozitivne koke, ili u parovima i tetradama. Rastu u prisustvu žuči i eskulina (pozitivni su), ali nemaju grupno specifični D antigen.

***Leuconostoc spp.***

Rod *Leuconostoc* ima preko 20 vrsta. *Leuconostoc mesenteroides* izaziva infekcije kod ljudi. Vrste roda *Leuconostoc* su Gram pozitivne koke, koje se javljaju u parovima i lancima. Karakteristično je da su rezistentni na vankomicin i da produkuju CO<sub>2</sub> iz glukoze. Katalaza su negativni i uglavnom  $\alpha$ -hemolitični na KA. Fakultativno su anaerobni i mogu se zamentiti sa enterokokama, jer su žuč – eskulin pozitivni i neki sojevi daju ukrštenu reakciju sa grupno specifičnim D antiserumom.

***Pediococcus spp.***

Liči na viridans streptokoke na kulturi (alfa ili anhemolitični), a na preparatu na stafilokok. Gram pozitivne se koke, koje se javljaju u parovima, tetradama i grozdovima. Urođeno su rezistentni na vankomicin i umereno osetljivi na beta laktame. Fakultativno su anaerobni i katalaza negativni. Od *Leuconostoc spp.* se razlikuju po tome što su leucin aminopeptidaza pozitivni. Mogu se zameniti sa enterokokama, jer su žuč eskulin pozitivni i daju ukršteno pozitivnu reakciju sa grupno specifičnim D antiserumom.

**Tabela 8. Značajne karakteristike Gram pozitivnih katalaza negativnih koka**

	<b><i>Aerococcus</i></b>	<b><i>Gemella</i></b>	<b><i>Lactococcus</i></b>	<b><i>Leuconostoc</i></b>	<b><i>Pediococcus</i></b>
Morfologija	parovi, tetrade i grozdovi, slično stafilokokama	Gram varijabilne koke - parovi, tetrade i grozdovi, nekada lanci	pojedinačne Gram pozitivne koke, ili u parovima i tetradama	Gram pozitivne koke, u parovima i lancima	Gram pozitivne koke, parovi, tetrade i grozdovi, slično stafilokokama
Kultura	kao viridans streptokoke	$\alpha$ -hemolitični ili anhemolitični i liče na kolonije viridans streptokoka	slično enterokokama - $\alpha$ ili anhemolitični	$\alpha$ -hemolitični	liče na viridans streptokoke na kulturi (alfa ili anhemolitični)
Katalaza	negativni ili slabo pozitivni	negativne	negativni	negativni	negativni
PYR	neki su pozitivni				
Vankomicin	S	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	R
Eskulin, žuč	neki su pozitivni		pozitivni	pozitivni (varij)	pozitivni

### **Osetljivost streptokoka na antibiotike**

Beta hemolitičke streptokoke su osetljive na penicilin i druge beta laktame (BLA). Smanjenu osetljivost na penicilin pokazuje grupa B streptokoka, čiji MIK benzilpenicilina može ići do 1 mg/L. Za ove vrste treba izvestiti osetljivost na penicilinske, cefalosporinske preparate i karbapeneme. U slučaju da se registruje rezistencija na penicilin, treba proveriti identifikaciju i kvalitet ispitivanja osetljivosti na antibiotike.

*Streptococcus pneumoniae* je još pre više decenija razvio rezistenciju na beta laktame, prvenstveno penicilin. Kada se izoluje iz primarno sterilnih regija, treba ispitati MIK penicilina i cefalosporina treće generacije, koji se primenjuju u terapiji meningitisa i sepse. Za skrining na osetljivost na BLA se koristi disk oksacilina.

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

Sve enterokoke su urođeno rezistentne na cefalosporine, ali je poslednjih godina i rezistencija na ampicilin u porastu. Ona nastaje zbog promena u PBP5 i prvenstveno se javlja kod *E.faecium*. Ove promene dovode do smanjene osetljivosti na beta laktame, odnosno sve peniciline i karbapeneme. Penicilinaza produkujući enterokok je odnedavno detektovan.

Za razliku od BLA, streptokoke su razvile rezistenciju na makrolde, linkozamide i streptogramine (MLS) grupa antibiotika. To se dešava uglavnom na dva načina. Jedan je izmena ciljnog mesta vezivanja (metilacija rRNK za koju se vezuju ovi antibiotici) i to je MLS tip rezistencije, što znači istovremene rezistencije na sve tri grupe antibiotika. U zavisnosti da li se enzim metilaza eksprimira konstitutivno ili inducibilno, nakon izlaganja makrolidima, razlikuju se cMLS (konstitutivni) i iMLS (inducibilni) tip rezistencije. Odlikuju se visokim vrednostima MIK eritromicina i visokim ili varijabilnim vrednostima MIK klindamicina. U slučaju ove rezistencije se u terapiji ne primenjuju ni makrolidi, ni linkozamidi, ni streptogramini. Drugi tip rezistencije nastaje kao posledica efluksa makrolida iz bakterijske ćelije. Karakteriše se rezistencijom samo na makrolide, a ne i na ostale antibiotike, a rezistencija je manja nego prethodna. Označava se kao M tip rezistencije. Rezistencija streptokoka na MLS antibiotike se ispituje tzv. double (dvostrukim) disk difuzionim testom – DD testom, u kome se diskovi eritromicina i klindamicina postavljaju na ploču na rastojanju od 12-16 mm. Rezistencija na eritromicin ukazuje na rezistenciju i na ostale makrolide.

Izolati koji su osetljivi na tetracikline su osetljivi i na doksiciklin i minociklin.

Prema EUCAST –u se osetljivost streptokoka na antibiotike ispituje na pločama Mueller-Hinton agara sa 5% defibrinisanom konjskom krvi uz dodatak 20 mg/L  $\beta$ -NAD. Inokulum je McFarland 0.5, a ploče se inkubiraju u prisustvu 5% CO<sub>2</sub>, na 35±1°C, tokom 18±2h.

Disk norfloksacina se koristi za skrining na rezistenciju na fluorohinolone. Izolati koji su osetljivi na norfloksacin su osetljivi i na levofloksacin i moksifloksacin i tako treba izvestiti. Izolati koji nisu osetljivi na norfloksacin se moraju testirati na pojedinačne fluorohinolone.

Za viridans streptokoke EUCAST je dao granične zone u mm za benzil penicilin i ampicilin. Na osnovu njih se može izvestiti osetljivost i na amoksicilin, amoksicilin – klavulanat i piperacilin. Disk benziil penicilina od 1 U se može koristiti za skrining na rezistenciju viridans streptokoka na beta

## Nacionalna referentna laboratorija za streptokok Identifikacija streptokoka

laktame. Za izolate koji su osjetljivi se može izvestiti da su osjetljivi na BLA čije su granične vrednosti navedene u vodiču, dok se za rezistentne isolate mora testirati osjetljivost na pojedinačne antibiotike.

Viridans streptokoke su urođeno rezistentne na aminoglikozide (AG), koji se ne mogu koristiti kao monoterapija. S' obzirom da postoji sinergizam između AG i penicilina ili glikopeptida, ova kombinacija može biti delotvorna kod sojeva koji nemaju visok nivo rezistencije na AG. Zato treba ispitati da li postoji visok nivo rezistencije na AG, utvrđivanjem MIK gentamicina. Granična vrednost je MIK od 128 mg/L. Sojevi sa MIK  $\leq 128$  mg/L gentamicina imaju nizak nivo rezistencije i može se očekivati terapijski uspeh ako se gentamicin da sa BL ili glikopeptidima. Oni sojevi sa MIK gentamicina  $> 128$  mg/L imaju visok nivo rezistencije i nijedan AG (osim streptomycina) se ne može koristiti u terapiji.

Antibiotici za koje se ispituje osjetljivost *S. pneumoniae*, disk difuzionom metodom su oksacilin, eritromicin, klindamicin, tetraciklini, trimetoprim-sulfametoksazol i hloramfenikol. Za bolničke materijale se dodaje vankomicin i linezolid. U slučaju rezistencije na oksacilin se mora odrediti MIK penicilina, cefalosporina treće generacije i meropenema, a po potrebi i nekih drugih BLA koji se planiraju u terapiji.