

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

Uzimanje uzoraka, čuvanje i transport u Referentnu laboratoriju za streptokok i pneumokok

Streptococcus pneumoniae je alfa hemolitičan, Gram pozitivan diplokok, koji pripada rodu *Streptococcus*. Nutritivni je izbirač, te su za izolaciju potrebne obogaćene hranljive podloge (kolumbija krvni agar, triptikaza soja krvni agar, moždano srčani krvni agar). Zahteva povećanu koncentraciju CO₂ tokom inkubacije, pa se podloge moraju inkubirati u termostatima sa CO₂. Osetljiv je na faktore spoljne sredine i autolizira u stacionarnoj fazi rasta, te je potreban adekvatan i brz transport bolesničkog uzorka u laboratoriju. Glavni faktor virulencije mu je polisaharidna kapsula i na osnovu razlike u njenoj građi se deli na 93 serotipa. Ipak, najveći broj bolesti izaziva 10 do 15 serotipova pneumokoka.

Prenosi se respiratornim putem i kolonizuje gornje respiratorne puteve ljudi. Posebno je čest tokom zimskih meseci, a kolonizacija počinje već u prvim mesecima života. Najviši nivo kolonizacije je zabeležen kod odojčadi i dece predškolskog uzrasta (do 70%), a zatim postepeno opada. Kliconoštvo kod odraslih je oko 10%, ali je taj procenat veći kod onih koji su okruženi decom. Takođe, u kolektivima (kasarne, obdaništa...) je kliconoštvo posebno izraženo. Kod male dece često izaziva zapaljenje srednjeg uha, a vodeći je uzročnik vanbolničkih pneumonija u svim uzrastima. Ipak, od pneumokokne pneumonije obično obolevaju stariji od 65 godina i u ovoj populaciji su komplikacije česte. Druge uobičajene manifestacije blage pneumokokne bolesti su konjuktivitis i sinusitis.

Međutim, pneumokok je čest izazivač invazivnih bolesti (invazivna pneumokokna bolest – IPB), kao što je sepsa, meningitis i teški oblici pneumonije (bakterijemijaska pneumonija), kao i komplikacija zapaljenja pluća - empijem pleure. Ređe manifestacije IPB su peritonitis, artritis, nekrotizirajući fasciitis. Posebno je značajna okultna bakterijemija, koja se pojavljuje kod prethodno zdrave dece, ili one koja imaju blage znake respiratornih infekcija ili zapaljenja srednjeg uha. Ovaj oblik bakterijemije su obično javlja u uzrastu od 6 do 36

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

meseci, a karakteriše se temperaturom većom od 39°C i leukocitozom $\geq 15\ 000\ \mu\text{L}$. Najteža komplikacija je meningitis, a druge ređe su osteomijelitis, peritonitis, celulitis.

Pored uzrasnih grupa ≤ 2 godine i ≥ 65 godina života, populacije koje su posebno predisponirane za IPB su: splenektomirani, oboleli od HIV, osobe sa hroničnim oboljenjima srca, jetre i bubrega, hroničnom bronhijalnom bolesti, astmom, pušači, alkoholičari, narkomani, dijabetičari i oni sa povredama glave, gde postoji isticanje likvora.

Prema definiciji, **invazivna pneumokokna bolest** je ona tokom koje se *Streptococcus pneumoniae* izoluje iz primarno sterilnih regija (krv, likvor, pleuralni punktat, perikardijalni punktat, aspirat srednjeg uha, aspirat zglobova, boptati i dr.) ili se u tim materijalima dokazuje njegov antigen ili nukleinska kiselina.

Lečenje pneumokoknih bolesti se sprovodi antibioticima iz klase beta laktama (penicilin, amoksicilin, amoksicilin i klavulanska kiselina, cefalosporini), makrolida (eritromicin, azitromicin), novijih generacija fluorohinolona, lenezolidom, vankomicinom. Izbor antibiotika zavisi od težine kliničke slike, uzrasta pacijenata i osetljivosti soja na antibiotike. Zbog značajnog procenta rezistentnih izolata pneumokoka, neophodno je raditi antibiogram, a tumačenje sprovoditi na osnovu CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) ili EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) standarda. Za invazivne izolate je potrebno odrediti vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) za penicilin i cefalsporine treće generacije.

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

Uzimanje i transport materijala

Prilikom suumnje na IPB, neophodno je uzeti odgovarajući materijal, pravovremeno i na pravilan način, kako bi se bakterija mogla dokazati u uzorku. **Vrlo je važno da se materijal uzme pre započinjanja davanja antibiotika**, ili, ukoliko se tokom terapije uzorak ponovo uzima, pre davanja sledeće doze lekova, kada je koncentracija antibiotika u krvi najmanja. Transport materijala do laboratorije treba da je kratak (do 2 sata) i na odgovarajućoj temperaturi. Generalno, ukoliko se iz materijala želi izolacija pneumokoka, treba ga do obrade u laboratoriji držati na temperaturi 35-37°C, dok je za kraće vreme prihvatljiva i sobna temperatura od oko 25°C. Nikako se ne sme stavljati u frižider. Ukoliko se u bolesničkom uzorku dokazuje antigen ili nukleinska kiselina pneumokoka, materijal se može držati na +4°C.

Hemokultura

Ukoliko pacijent ima kliničke znake meningitisa, sepse, okultne bakterijemije, teške pneumonije i drugih IPB, neophodno je uzeti krv za hemokulturu.

Krv za hemokulturu se uzima venepunkcijom iz kubitalne vene. Zbog visokog rizika od kontaminacije, treba izbegavati uzimanje krvi iz centralnog venskog katetera.

Pre uzimanja krvi, treba imati pripremljene rukavice, iglu, špic, bočice za hemokulturu, dezinficijens, tufere vate. Ako se uzorak obrađuje u laboratoriji koje imaju automatizovane sisteme za detekciju porasta bakterija u krvi (BactAlert ili neki drugi sistem), krv se stavlja u bočice za hemokulturu odgovarajućeg proizvođača, dok laboratorije bez automatizovanog sistema koriste komercijalne podloge za kultivaciju aerobnih i anaerobnih bakterija, npr. „HEMOSAN-Torlak ili neku drugu. Treba napomenuti da se po volumenu bujona razlikuju bočice za hemokulturu za odrasle i decu.

Ceo postupak se radi u rukavicama za jednokratnu upotrebu, koje se nakon uzimanja materijala, bacaju.

- krv za hemokulturu treba uzimati 2 do 3 puta na dan, u razmacima od 1 – 2 sata
- krv se uzima u dve bočice (za aerobne i anaerobne bakterije)

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

- krv se inokuliše u tečnu hranljivu podlogu u bočicama za hemokulturu, odmah po uzimanju, odnosno pored bolesničke postelje
- obeleži se bočica sa bujonom za hemokulturu
- dezinfekcija bočice za uzimanje krvi - namočiti komadić vate 70% izopropilnim alkoholom i ostaviti ga na gumenom čepu bočice da stoji 1 min
- dezinfikovati kožu gde će se raditi venepunkcija 70% alkoholom, a zatim povidon jodidom, ili tinkturom joda (100 ml 70% izopropil alkohola sa 1g joda); pričekati da se jod osuši; venu više ne palpirati na dezinficiranom mestu
- uzeti krv i inokulirati u bočicu za hemokulturu
- nakon venepunkcije, jod sa kože očistiti alkoholom
- količina krvi koja se uzima:

od male dece se uzima 1 – 2 ml krvi, koja se razređuje u 20 ml bujona (1:10 do 1:20)

od odraslih se uzima 5 – 10 ml krvi, koja se razređuje u 40 - 50 ml bujona (1:5 do 1:10) ako se koriste bočice za automatizovane sisteme, odnosno 10 - 20 ml ako se koriste komercijalne bočice koje imaju veću zapreminu bujona

- na uputu za laboratoriju napisati podatke o pacijentu: JMBG, broj zdravstvene knjižice, naznačiti vreme uzimanja krvi i mesto (npr. iz centralnog venskog katetera – CVK ili periferne vene); naznačiti da li je pacijent na antibiotskoj terapiji i, ako jeste, na kojoj; napisati uputnu dijagnozu.
- transport uzorka:

Najbolje bi bilo bočicu sa uzetom krvi odmah transportovati u laboratoriju. U ustanovama gde postoje automatizovani sistemi za hemokulturu, bilo bi poželjno da postoji 24 časovna mogućnost ubacivanja bočica sa uzorkom u aparat. Ukoliko nije moguće bočice dostaviti odmah u laboratoriju, optimalno bi bilo da se donesu u roku od 2 do 4 sata od uzimanja, a najkasnije 12 – 18 sati, ali jedino ukoliko se čuvaju na odgovarajućoj temperaturi. **Bočice za hemokulturu nikako ne stavljati u frižider.** Najbolje bi bilo da se drže na 35°C ili, eventualno, sobnoj temperaturi (25°C), a nikako na ekstremnim temperaturama (<18°C or >37°C), koji deluju pogubno na većinu bakterija u krvi.

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

Cerebrospinalna tečnost (likvor)

Pri sumnji na meningitis se uzima likvor, lumbalnom punkcijom. Za to je potrebno imati dezinficijens za kožu, sterilnu gazu, vatu, odgovarajuće igle za odrasle, odnosno decu, epruvete koje se dobro zatvaraju ili gotove hranljive podloge u koje se likvor inokuliše odmah pored postelje pacijenta. Mogu se koristiti i bočice sa bujonom za hemokulturu (sa manjim sadržajem bujona).

- koža se dezinfikuje 70% alkoholom, a zatim povidon jodidom, ili tinkturom joda (100 ml 70% izopropil alkohola sa 1g joda); sačekati da se dezinfikovano mesto osuši
- ako je moguće, uzima se 3-4 ml likvora, a minimalno 1 ml kod odraslih. Kod male dece često se ne može uzeti više od 1 ml likvora.
- likvor se uzima u tri posude za tri vrste analiza: mikrobiološku, citološku i biohemijsku. Ukoliko je moguće uzeti samo 1 ml, koristi se samo za mikrobiološku analizu
- likvor treba dostaviti u laboratoriju što pre, optimalno u roku od 1 sata od uzimanja. Ne sme se stavljati u frižider, niti izlagati temperaturi višoj od 37°C, kao ni sunčevoj svetlosti. Može se držati u ruci, tj. na temperaturi tela dok se nosi do laboratorije. U slučaju da se ne može transportovati u roku od 1 sata, treba ga stavljati u transportne podloge za likvor. Alternativa su bočice za hemokulturu.

Aspirat srednjeg uha

Pri sumnji na bakterijsko zapaljenje srednjeg uha, materijal se uzima timpanocintezom.

- pre timpanocenteze, spoljašnji slušni kanal tretirati 70 % etil alkoholom i osušiti sterilnim tupferom
- uneti sterilan levak u spoljašnji slušni kanal, kroz koji se vrši incizija timpanične membrane. Purulentan iscedak uzorkovati odmah koristeći transportni sistem sa brisom (transportni medijum).

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

- prema uputstvu za upotrebu, bris uneti u epruvetu sa transportnim medijumom, polomiti štapić brisa do obeleženog mesta i zatvoriti epruvetu poklopcem. Bris treba odneti što pre u laboratoriju i ne ostavljati ga u frižideru.

Tečnosti iz primarno sterlnih regija (pleuralna, perikardijalna, peritonealna tečnost, sinovijalna tečnost, sadržaj apscesa, bioptati...)

- koža se dezinfikuje 2% jodnom tinkturom (rastvor joda u 70% alkoholu)
- uzorak uzeti perkutanom aspiracijom pomoću igle ili hirurški
- optimalna količina uzorka za izolaciju bakterija je 1ml
- dobijena tečnost se stavlja u sterilnu posudu s čepom i navojem
- označiti na uputu podatke o pacijentu, uputnu dijagnozu, vrstu materijala, koja se analiza traži i eventualno terapiju antibioticima
- uzorak ne stavlja u frižider, već odmah doneti u laboratoriju; držati ga do 2 sata na temperaturi u rangu 25 do 35°C

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

Obrada uzoraka u laboratoriji

Hemokultura

Bočice za hemokulturu sadrže obično triptokaza soja bujon ili neku drugu obogaćenu tečnu hranljivu podlogu (moždano srčani bujon) i inkubiraju se ili u automatizovanim sistemima do 5 dana, ili u inkubatoru na 35-37°C do 7 dana. Automatizovani sistemi su osetljiviji i detektuju metaboličke produkte koji nastaju prilikom umnožavanja bakterija, te registruju porast bakterija ranije u odnosu na klasično kultivisanje. Ukoliko aparat detektuje pozitivnu hemokulturu, treba je izvaditi iz aparata i pristupiti daljoj obradi uzorka. Hemokulture koje se inkubiraju u termostatu treba posmatrati posle 14 do 17 sati inkubacije, zatim posle 48 sati i na kraju posle 7 dana. Ukoliko se uoči zamućenje ili liza eritrocita, treba ih uzeti u dalju obradu. Pre izdavanja negativnog rezultata, hemokulture treba subkultivisati.

Od pozitivnih hemokultura se pravi:

- direktni preparat i boji po Gramu. Na direktnom preparatu se između ćelija krvi uočavaju Gram pozitivne diplokoke u slučaju pneumokoka, odnosno odgovarajući morfološki oblici ukoliko je sepsa drugog porekla.
- subkultura na čvrstim hranljivim podlogama (čokoladni agar i krvni agar, sa 5% krvi) i kultiviše na 35-37°C i u prisustvu 5% CO₂, 18-24 sata. Od podloga se najčešće koriste kolumbija krvni agar i triptikaza krvni agar.

Cerebrospinalna tečnost (likvor)

Postupak obrade likvora zavisi od količine materijala koji je stigao u laboratoriju.

- ukoliko ima manje od 1 ml likvora, ne sme se centrifugirati, već se od njega pravi direktni preparat, radi test aglutinacije za meningealne patogene i kultiviše na hranljivim podlogama.
- ako ima više od 1 ml likvora, treba ga centrifugirati 10 -15 minuta na 1000 x g. Odliti supernatant Pasterovom pipetom. Od supernatanta se može raditi test aglutinacije. Sediment snažno promućkati (vorteksirati) i uzeti jednu kap za pravljenje preparata koji se boji po Gramu i jednu kap za kultivisanje na podlogama.

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

- u slučaju pneumokoknog meningitisa, na preparatu, obojenom po Gramu, se uočavaju polimorfonuklearni leukociti i Gram pozitivne diplokoke. Direktni preparat ima veliku osetljivost i specifičnost, ali se ona znatno smanjuje ukoliko je pacijent dobijao antibiotike pre uzimanja likvora.
- za izradu testa lateks aglutinacije se koriste komercijalni kitovi. Najbolje je da se koristi supernatant centrifugiranog likvora i da se test radi što pre. Ukoliko to nije moguće, supernatant se drži u frižideru (2°C do 8°C) nekoliko sati ili na -20°C tokom dužeg perioda. Voditi računa da se reagensi za lateks aglutinaciju stalno drže u frižideru i nikada ne zamrzavaju. Izrada lateks aglutinacije se radi prema uputstvu proizvođača. U principu se supernatant zagreva u vodenom kupatilu na 100°C, 5 minuta; potom vorteksira. Na predmetno staklo ili plastificiranu karticu se stavlja jedna kap lateks suspenzije za svaki patogen i dodaje po 30-50 µl supernatanta ipločica se rotira 2 do 10 minuta (prema uputstvu). Pojava aglutinacije označava pozitivnu reakciju.
- sediment likvora se inokuliše na hanljive podloge – kolumbija krvni agar ili triptikaza soja krvni agar (5% krvi) i čokoladni agar. U podloge se dodaje ovčija ili konjska krv, nikako humana, zbog eventualnog prisustva antitela i drugih baktericidnih supstanci. Podloge se inkubiraju 18-24 sata na 35°C - 37°C, u prisustvu 5% CO₂. Kolonije pneukokoka se uočavaju posle 18 do 24 sata, najbolje na krvnom agaru. Da bi došlo do porasta kulture na podlogama, neophodno je što pre zasejati likvor, jer vijabilnost bakterija znatno opada vremenom.
- likvor koji se odmah inokuliše u bočice za hemokulturu se stavlja u automatizovani sistem i sa njim se postupa kao sa hemokulturom.

Pleuralna tečnost

se inokuliše, bez prethodnog centrifugiranja, na triptikaza soja krvni agar i čokoladni agar. Podloge se inkubiraju 18-24 sata na 35°C - 37°C, u prisustvu 5% CO₂.

Aspirat zglobne tečnosti (sinovijalne tečnosti) se može:

- direktno inokulisati u bočicu za hemokulturu i stavljati u automatizovani sistem i dalje obrađivati kao hemokultura

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

- centrifugirati, a potom sediment inokulisati na obogaćene hranljive podloge (triptikaza krvni agar, kolumbija krvni agar) i inkubirati 18-24 sata na 35°C - 37°C, u prisustvu 5% CO₂.

Aspirat srednjeg uha

se direktno zasejava na hranljive podloge (triptikaza krvni agar, columbija krvni agar) i inkubira 18-24 sata na 35°C - 37°C, u prisustvu 5% CO₂.

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

Identifikacija *Streptococcus pneumoniae*

Mikroskopske osobine

Pneumokok se tipično pojavljuje u vidu Gram pozitivnih diplokoka, koje su na direktnim preparatima iz bolesničkog materijala okružene polimorfonuklearnim leukocitima. 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.

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. Izgled kolonija zavisi od serotipa, kao i od vrste podloge i uslova kultivisanja. Posle 24-časovne inkubacije, kolonije pneumokoka imaju centralno udubljenje, koje je posledica njegove autolize. 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.

Pneumokok je, kao i ostale streptokoke, **katalaza negativan** i ukoliko postoji dilema da li kolonije pripadaju rodu *Streptococcus*, treba uraditi test katalaze. Test se izvodi na staklenoj pločici, sa 3% vodonik peroksidom (H₂O₂). Na pločicu se stavlja 1 ml H₂O₂ i u kap 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.

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

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

Optohinski test

Izvodi se na 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 fiziološkog 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, ako 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 dezoksiholatom.

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.

Test lize žučnim solima (Na-dezoksiholat)

Ovaj test bazira 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-dezoksiholatom, koji se priprema tako što se 10 g (komercijalnog) dezoksiholata 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 sadži po 0,5 ml bakterijske suspenzije. Epruvete se označe – jedna je test epruveta, a druga kontrola. U

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

test epruvetu se dodaje 0,5 ml 10% Na- dezoksiholata, 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 nepromenju kontrolu, označava pozitivnu reakciju. Ukoliko se reakcija tada ne uoči, produžiti inkubaciju naredna 3 sata, pa onda ponovo očitati reakciju.

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-dezoksiholata 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.

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 pneumokokni 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 kapsularnih 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 u principu 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

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

nanese kap fiziološkog rastvora i u nju suspenduju kolonije direktno sa ploče. Najbolje je da se na svaku polovinu predmetnog stakla nanese, odnosno napravi, po jedna kap suspenzije (za testiranje i za kontrolu). Na kap suspenzije koja služi za testiranje se nanese kap (oko 5-10 μ l) lateks reagens, a na kontrolu kap fiziološkog rastvora. Plastičnim štapićem se promešaju 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*. Ukoliko se reakcije ne odigra ni posle 30 sekundi, može se smatrati negativnom.

Ispitivanje osetljivosti *S.pneumoniae* na antibiotike

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

Antibiogram se radi prema preporukama CLSI ili EUCAST, na pločama Mueller Hinton agara, uz dodatak 5% krvi. EUCAST preporučuje da se koristi Mueller-Hinton agar + 5% defibrinisana konjska krv i 20 mg/L β -NAD (MH-F). Gustina baktetrijske suspenzije treba da je 0,5 McFarland ukoliko se 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-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. Za ispitivanje osetljivost na beta laktamske antibiotike se upotrebljava disk oksacilina, 1 μ g. Ukoliko je zona inhibicije rasta ≥ 20 mm, može se smatrati da je soj osetljiv na sve beta laktamske antibiotike. Ukoliko je soj rezistentan na oksacilin, ne može se izvesti zaključak da je rezistentan na sve beta laktamske antibiotike, već se mora odrediti vrednost MIK. Pošto se za lečenje pneumokoknih bolesti najčešće koriste penicilin i cefalosporini treće generacije (npr. ceftriakon), preporučuje se određivanje MIK za ove antibiotike. EUCAST daje smernice i za interpretaciju zona oko oksacilina koje su manje od 20mm, najbolje koristiti nove verzije preporuka EUCAST, dostupne na sajtu:

Protokol za izolaciju i identifikaciju invazivnih izolata *Streptococcus pneumoniae*

Autor: Nataša Opavski, vanredni profesor

Rukovodilac NRL za streptokok i pneumokok

Medicinski fakultet Beograd

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf .

Izolati pneumokoka se testiraju na osetljivost na makrolide i linkozamide, primenom „double“ disk testa, odnosno aplikacijom diska eritromicina i klindamicina, na rastojanju od 20 mm. Osetljivost na eritromicin ukazuje da soj osetljiv i na azitromicin, klaritromicin i roksitromicin. Pneumokok nije osetljiv na ciprofloksain, te se izveštava da je intermedijarno osetljiv. Disk norfloksacina se koristi kao skrining na fluorohinolonsku rezistenciju. Ne izveštava se osetljivost na norfloksacin, ali se rezultat notira. EUCAST daje granične zone za vankomicin, teikoplanin i linezolid.

Vrednost MIK se obično u kliničkim laboratorijama određuje korišćenjem E testa (bioMerieux), M.I.C. Evaluators (Oxoid) ili Liofilchem® MIC Test Strips.

Slanje invazivnih sojeva pneumokoka u Nacionalnu referentnu laboratoriju (NRL) za streptokok i pneumokok

Po izolaciji invazivnog pneumokoka, potrebno je takav soj dostaviti u Nacionalnu referentnu laboratoriju (NRL) za streptokok i pneumokok, koja se nalazi na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, kako bi se obavila serotipizacija. Izolat je najbolje transportovati u transportnoj podlozi (Amies ili STGG - Skim-milk tryptone glucose glycerol), tako što se sveža prekonoćna kultura pneumokoka na krvom agaru pokupi sterilnim brisom i inokuliše u transportni medijum. Podloga STGG može da stoji i više nedelja na -20°C. Ovako konzervirana kultura može da stoji nekoliko sati na sobnoj temperaturi, ili 2 dana na temperaturi frižidera (+4°C).

Zbog ograničenih finansija, a da bi soj stigao do NRL, može se soj dostavljati kao sveža kultura na krvnoj ploči, oblepljena lepljivom trakom, kako se ploča ne bi otvorila i ne bi došlo do sušenja kulture. Ovo posebno važi za laboratorije u Beogradu ili laboratorije van Beograda, koje mogu kulturu da pošalju vozilom ili poštom.