

Půda s amikacinem k záchytu beta-hemolytických streptokoků

Dvořáková Heroldová M., Dvořáčková M.

Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Souhrn

Beta-hemolytické streptokoky se uplatňují jako etiologické agens sekundárních infekcí ran, ulcerací a dekubitů. Jejich laboratorní diagnostika bývá komplikována tím, že se na infekci často podílejí i další, růstově méně náročné bakterie (*Staphylococcus aureus*, pseudomonády a enterobakterie). Ty na krevním agaru přerůstají kolonie beta-hemolytických streptokoků.

Byl srovnán záchyt beta-hemolytických streptokoků na krevním agaru a na selektivním krevním agaru s přidavkem amikacinu (36 µg/ml).

Celkem bylo vyšetřeno 836 vzorků od 782 pacientů. Zachyceno bylo 86 izolátů beta-hemolytických streptokoků. V 73 případech byly identifikovány další bakteriální druhy podílející se na infekci. Nejčastěji to byl *S. aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. U vzorků, kde byla zjištěna smíšená infekce, bylo 46 izolátů beta-hemolytických streptokoků zachyceno jak na krevním agaru, tak na krevním agaru s amikacinem. Dalších 27 izolátů bylo zachyceno pouze na krevním agaru s amikacinem. Bez použití selektivní půdy by uniklo 37 % izolátů beta-hemolytických streptokoků u vzorků z kožních lézí.

Klíčová slova: beta-hemolytické streptokoky – sekundární kožní infekce – selektivní půda.

Summary

Dvořáková Heroldová M., Dvořáčková M.: Medium with Amikacin for Laboratory Diagnosis of Beta-haemolytic Streptococci

Beta-haemolytic streptococci are implicated in the etiology of secondary wound infection, ulcerations and decubitus ulcers. Laboratory diagnosis of these causative agents is complicated by the fact that other less fastidious bacteria (*Staphylococcus aureus*, pseudomonads and enterobacteria) may also be involved in the infection. On blood agar, these bacteria overgrow colonies of beta-haemolytic streptococci.

Detectability of beta-haemolytic streptococci on blood agar and selective blood agar added with amikacin (36 µg/ml) was compared.

A total of 836 specimens from 782 patients were examined. Eighty-six isolates of beta-haemolytic streptococci were detected.

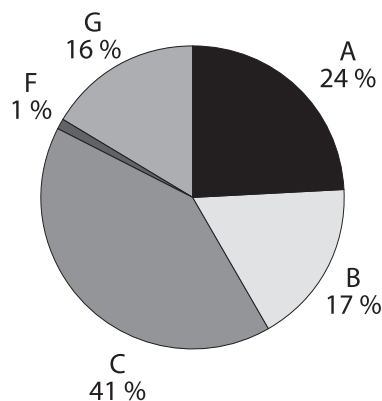
Coinfection with other bacterial species, most frequently identified as *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, was observed in 73 specimens. Forty-six isolates of beta-hemolytic streptococci involved in coinfection were detected on both blood agar and blood agar with amikacin. Twenty-seven additional isolates were only recovered on blood agar with amikacin. Without the use of selective medium, 37 % of isolates of beta-haemolytic streptococci from skin lesion specimens would escape detection.

Key words: beta-haemolytic streptococci – secondary skin infection – selective medium.

Beta-hemolytické streptokoky napadají mimo jiné kůži, a to obvykle již jiným způsobem poškozenou, ať běžným poraněním, operační ranou, diabetickou či jinou ulcerací nebo dekubitem. Laboratorní diagnostika beta-hemolytických streptokoků při sekundárních kožních infekcích může být poměrně obtížná právě s ohledem na to, že v uvedených lézích bývá přítomno více bakteriálních druhů. Tyto bakterie, zejména *Staphylococcus aureus*, enterobakterie a pseudo-

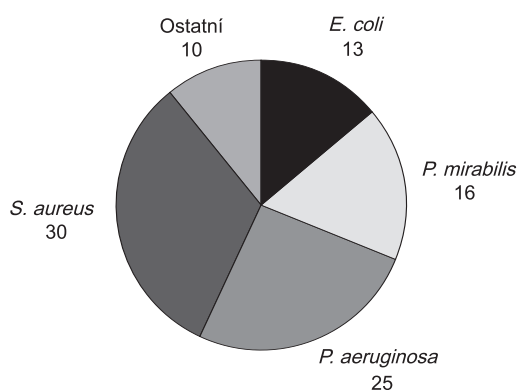
monády, jsou růstově méně náročné než streptokoky [5, 10]. Na krevním agaru snadno přerůstají drobnější kolonie beta-hemolytických streptokoků a komplikují tak jejich záchyt a identifikaci [2, 6].

Rozhodly jsme se proto srovnat záchyt beta-hemolytických streptokoků z kožních lézí na běžném krevním agaru a na krevním agaru s amikacinem. U této selektivní půdy je využita citlivost běžných bakterií včetně stafylokoků, enterobakterií a pseudomonád



Graf 1. Procentuální zastoupení jednotlivých skupin beta-hemolytických streptokoků izolovaných z kožních lézí

Fig. 1. Percentage distribution of groups of beta-hemolytic streptococci isolated from skin lesion specimens



Graf 2. Zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů, které vyrostly ve smíšené kultuře s beta-hemolytickými streptokoky. Ostatní = gramnegativní nefermentující bakterie, *Proteus vulgaris* a *Klebsiella sp.*

Fig. 2. Bacterial species grown together with beta-haemolytic streptococci.

Other = gram-negative non-fermenting bacteria, *Proteus vulgaris* and *Klebsiella sp.*

Tab. 1. Záchyt beta-hemolytických streptokoků ze smíšených infekcí na KA a KA s amikacinem

Table 1. Detection of beta-haemolytic streptococci from co-infection on blood agar and blood agar with amikacin

Krevní agar	Krevní agar s amikacinem	Počet zachycených izolátů
+	+	46 (63 %)
+	-	0
-	+	27 (37 %)
Izolátů ze smíšených infekcí celkem		73 (100 %)

k amikacinu a zároveň nízká citlivost až rezistence streptokoků k tomuto antibiotiku [7].

Materiál a metody

Bylo vyšetřeno 836 stěrů z ran, ulcerací, dekubitů, erozí a bér-cových vředů, a to od 782 pacientů. Všechny vyšetřované mate-

riály byly naočkovány na krevní agar se 7 % ovčích erytrocytů (KA), na Endovu půdu, na krevní agar s 10 % NaCl (KA+NaCl) a na krevní agar s přidavkem amikacinu (36 µg/ml). Hodnota pH KA s amikacinem je $7,3 \pm 0,2$ a doba skladování 10 dní při chladničkové teplotě (předpis amikacinové půdy pochází z receptáře Mikrobiologického ústavu LF MU a FN u sv. Anny v Brně).

Vzorky naočkované na KA a amikacinové půdě byly kultivovány v termostatu při 37 °C za zvýšené tenze CO₂ po dobu 18 hodin. Endova půda a KA+NaCl byly kultivovány v obyčejné atmosféře při 37 °C/18 hodin. Kultivace KA s amikacinem a KA+NaCl byly po prvním odečtení výsledků za 18 hodin prodlouženy o dalších 24 hodin.

Beta-hemolytické streptokoky byly předběžně identifikovány podle zóny beta-hemolýzy na KA, růstu na půdě s amikacinem a negativní katalázové reakce. Pro další určení: byl použit CAMP-test a průkaz pyrrolidonylamidázy (PYRA test PLIVA-Lachema Diagnostica). Zachycené kmeny streptokoků byly poté zařazeny do sérologických skupin latexovou aglutinací pomocí soupravy Pastorex Strep® (Bio-Rad).

Výsledky

Z 836 vyšetřených vzorků bylo zachyceno 86 izolátů beta-hemolytických streptokoků. Nejčastěji (35krát) byly izolovány kmeny skupiny C, které tvořily celých 41 % izolátů. Dvacet jedna kmenů patřilo do skupiny A (24 %). Kmeny skupiny B (15) reprezentovaly 17 % a 14 kmenů skupiny G 16 % izolátů, jeden kmen (1,2 %) byl zařazen do skupiny F (graf 1).

V 73 případech (85 %) bylo zjištěno, že se jedná o smíšenou infekci streptokoky a dalšími bakteriemi. Z toho u 54 vyšetřovaných pacientů se na infekci vedle streptokoků podílel další bakteriální druh a u 19 pacientů dva a více druhů. Nejčastější byla smíšená infekce beta-hemolytickým streptokokem a druhem *S. aureus* (30 izolátů). Dále se na smíšené infekci se streptokoky podílely kmeny *Pseudomonas aeruginosa* (25krát), *Proteus mirabilis* (16krát) a *Escherichia coli* (13krát). Rovněž byly zachyceny gramnegativní nefermentující bakterie, *Proteus vulgaris* a *Klebsiella sp.* (graf 2).

Záchyt beta-hemolytických streptokoků u smíšených infekcí na selektivním KA s amikacinem ukazuje tabulka 1. Beta-hemolytické streptokoky byly u 46 vyšetřených materiálů zachyceny jak na KA, tak na KA s amikacinem. Z dalších 27 vzorků se streptokoky podařilo zachytit pouze na selektivní půdě s amikacinem: na KA nebylo možné kolonie beta-hemolytických streptokoků identifikovat, protože byly přerostlé jinými bakteriemi. Jen v jediném případě vyrostl izolát pouze na KA, šlo o 1 případ z 13, kdy byla nalezena pouze čistá kultura beta-hemolytického streptokoka.

Diskuse

V literatuře jsou jako nejčastější původci infekcí kůže uváděny streptokoky skupiny A, potom skupiny C a dále skupiny G [4, 9, 11]. Převážná většina našich izolátů patřila do skupiny C (42 %). Do skupiny A bylo zařazeno jen 24 % izolátů. Rozdíly mezi našimi výsledky a údaji v literatuře jsou zřejmě způsobeny rozdílným věkovým složením vyšetřovaných souborů. Zatímco výsledky uváděné v literatuře byly získány u dětí, náš soubor tvořili převážně starší pacienti s průměrným věkem 63 let. Rozdílné výsledky mohly být rovněž způsobeny odlišnou patogenezi dětských kožních infekcí. Dalším důvodem pro vysoký záchyt streptokoků skupiny C v našem souboru může být skutečnost, že jsme při posuzování morfologie kolonií nerozlišovaly „velké“ a „drobné“ kolonie streptokoků.

V 73 případech z 86 byly vedle beta-hemolytických streptokoků zachyceny další bakterie, nejčastěji *S. aureus*, *P. aeruginosa* a *P. mirabilis*. Podobné spektrum bakteriálních druhů, které se podílejí na sekundárních infekcích kůže, uvádějí i další autoři [1, 5]. Lee a Tay [10] vyšetřili 89 stěrů od pacientů se sekundární bakteriální infekcí kůže. Zjistili, že 44 % infekcí bylo způsobeno smíšenou mikroflórou a nejčastějšími bakteriemi, které izolovali byl *S. aureus*, *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp. a *Proteus* sp.

V literatuře bylo popsáno několik metod pro zvýšení záchytu beta-hemolytických streptokoků z klinického materiálu. Ve většině případů byl používán krevní agar s přidavkem antibiotik. Carlson et al. využívali kombinaci krystalové violeti, kolistinu a co-trimoxazolu [6]. Dalším antibiotikem, které se osvědčilo jako selektivní nástroj pro beta-hemolytické streptokoky, je gentamicin [2, 12]. My jsme pro izolaci beta-hemolytických streptokoků použily KA s 36 µg/ml amikacinu. Z 86 námi zachycených izolátů beta-hemolytických streptokoků jich 85 vyrostlo na KA i KA s amikacinem. Jen u jednoho izolátu se stalo, že byl vykultivován pouze na KA, zatímco 27 (37 % ze smíšených kultur) jich bylo zachyceno pouze na KA s amikacinem. To znamená, že 37 % izolátů beta-hemolytických streptokoků ze smíšených infekcí by bez použití selektivního krevního agaru s amikacinem uniklo. Podobné výsledky získali i Black W. A. a Buskirk F. [2], kteří použili pro izolaci beta-hemolytických streptokoků vedle KA i KA s gentamicinem. Celkem testovali 87 kmenů beta-hemolytických streptokoků získaných z 742 nejrozličnějších klinických materiálů (výtěrů z pochvy, abscesů, kožních lézí apod.). Jenom tři kmeny zachytily jen KA, ale 22 (25 %) izolovali pouze na KA s gentamicinem. V publikacích, které jsou věnovány problematice beta-hemolytických strep-

tokoků a dostupné v internetové databázi Medline-PubMed autoři pouze jedné z nich využili jako agens pro přípravu selektivního média amikacin. Bosch J. et al. [3] použili pro zvýšení záchytu streptokoků skupiny B ve výtěrech z pochvy Muellerův-Hintonové bujón (2 ml) s amikacinovým diskem (30 µg). Při použití tohoto selektivního média zachytili z vyšetřovaných vzorků více streptokoků (12,7 %) než při použití selektivního krevního agaru s kolistinem a nalidixovou kyselinou (9,9 %).

Dosažené výsledky ukazují na důležitost využívání selektivních pūd pro streptokoky u vzorků z kožních lézí. Kolonie beta-hemolytických streptokoků mohou být totiž velmi snadno přehlédnuty pod koloniemi ostatních bakterií, které se na infekci podílejí. Použití selektivního krevního agaru s amikacinem může tomuto nebezpečí zabránit.

Literatura

1. **Bisno, A. L.** Cutaneous infections: Microbiologic and epidemiologic considerations. *Am J Med.*, 1984, 76, 172–179.
2. **Black, W. A., Buskirk, F.** Gentamicin blood agar used as general-purpose selective medium, *Appl Microbiol*, 1973, 25, 905–907.
3. **Bosch, J., Murillo, S., Rico, M., Salago, M.** The usefulness of a selectivity disk-broth media for the detection of group B streptococci in the vagina (in Spanish). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 1998, 16, 83–84.
4. **Brook, I., Frazier, E. H., Yeager, J. K.** Microbiology of infected poison ivy dermatitis. *Brit J Dermatol*, 2000, 142, 943–946.
5. **Brook, I.** Secondary bacterial infections complicating skin lesions. *J Med Microbiol*, 2002, 51, 808–812.
6. **Carlson, J. R., Merz, W. G., Hansen, B. E., Ruth, S., Moore, D. G.** Improved recovery of group A beta-hemolytic streptococci with a new selective medium. *J Clin Microbiol*, 1985, 21, 307–309.
7. **Jedličková, A.** Antimikrobiální terapie v každodenní praxi. Praha: Maxdorf 1996. 239 s. ISBN 80-85800-40-3.
8. **Laube, S., Farrell, A. M.** Bacterial skin infections in the elderly: diagnosis and treatment. *Drugs Aging*, 2002, 19, 331–342.
9. **Lawal, S. F., Odugbemi, T., Coker, A. O., Solanke, E. O.** Persistent occurrence of beta-hemolytic streptococci in population of Lagos school children. *J Trop Med Hyg*, 1990, 93, 417–418.
10. **Lee, C. T., Tay, L.** Pyodermias: an analysis of 127 cases. *Ann Acad Med Singapore*, 1990, 19, 347–349.
11. **Montgomery, J.** The aerobic bacteriology of infected skin lesions in children of the Eastern Highlands province. *Papua New Guinea Med J*, 1985, 28, 93–103.
12. **Murray, P. R., Wold, A. D., Schreck, C. A.** Washington II, J. A. Effects of selective media and atmosphere of incubation on the isolation of group A streptococci. *J Clin Microbiol*, 1976, 4, 54–56.

Mgr. M. Dvořáková Heroldová, Ph.D.
Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny
Pekařská 53
656 91 Brno
e-mail: monika.heroldova@fnusa.cz