

Semikvantitativna analiza beta-hemolitičkih streptokoka izoliranih iz briseva ždrijela

Tatjana Popović-Uroić, Emil Bobinac,
Miroslav Đurašinić i Marina
Mošnjak

Izvorni znanstveni rad
UDK 616-078
Prispjelo: 7. svibnja 1988.

Medicinski fakultet u Zagrebu i Medicinski fakultet u Tuzli

Izvršena je prospektivna semikvantitativna analiza beta-hemolitičkih streptokoka (BHS) seroloških grupa A, B, C i G, izoliranih iz briseva zdrijela bolnički i ambulantno liječenih bolesnika Klinike za infektivne bolesti »Dr Fran Mihaljević« u Zagrebu u šestogodišnjem periodu (1982-1987).

Utvrđene su značajne razlike u proporciji izoliranih sojeva različitih seroloških grupa unutar pojedinog stupnja semikvantitativne gradacije. BHS-A

se značajno češće izolira u više od 50 kolonija, ili čak, u čistoj kulturi (83%), nego ostali BHS ($p < 0.01$). U 56% briseva ždrijela iz kojih je izoliran BHS-B, bilo je manje od 50 kolonija, a tek u njih 12% radilo se o čistoj kulturi.

Preko polovine sojeva BHS-C i BHS-G (59%, odnosno 56%) izolirano je u više od 50 kolonija, ali je ta proporcija još uvijek značajno manja od one u BHS-A ($p < 0.01$).

Ključne riječi: beta-hemolitički streptokoki, bris ždrijela, semikvantitativna analiza,

Među osnovna pitanja o streptokokozama koja se upućuju mikrobiološkom laboratoriju, svakako pripadaju i ona koja se odnose na adekvatne mikrobiološke metode za sigurniji uvid i kvalitativnu i kvantitativnu diferencijaciju beta-hemolitičkih streptokoka (BHS) i na značaj te diferencijacije za kliničke manifestacije streptokokne bolesti, kao i za njena epidemiološka obilježja u bolesnoj i zdravoj populaciji.

Premda dostupni rezultati nedvojbeno ukazuju da je BHS serološke grupe A (BHS-A) dominantan uzročnik streptokoknih bolesti,^{5,12,23,15,21} sve je značajnije praćenje zastupljenosti i drugih BHS koji ne pripadaju ovoj grupi.^{22,27} Prvenstveno se radi o BHS-B,²⁶ BHS-C¹¹ i BHS-G,^{6,9} za koje se danas opravdano drži da mogu biti uzročnici istih kliničkih manifestacija kao i BHS-A. Još uvijek nema dovoljno pouzdanih podataka o povezanosti nalaza BHS koji ne pripadaju serološkoj grupi A u respiratornom traktu bolesnika i kliničkih manifestacija streptokokne bolesti. Neminovno se nameće potreba razlučivanja da li je prisustvo ovih BHS u respiratornom traktu znak kliconoštva ili prava etiologija bolesti. Analiza broja poraslih kolonija BHS pojedinih seroloških grupa iz respiratornog trakta mogla bi barem djelomično doprinijeti rasvjetljavanju situacije kada je potrebno razlikovati kliconoštvo od bolesti, što bi bila i neposredna praktična korist za svakodnevni medicinski pristup streptokoknom infektu, kako s terapijskog, tako is preventivnog aspekta.

MATERIJAL I METODE RADA

Vrijeme istraživanja: Od 1. 1. 1982. do 31. 12. 1987. godine.

Mjesto istraživanja: Klinika za infektivne bolesti »Dr Fran Mihaljević«, Odsjek za kliničku mikrobiologiju, Zagreb.

Laboratorijske metode: U promatranom šestogodišnjem periodu iz briseva gornjeg dijela respiratornog puta (bris ždrijela i bris nosoždrijelne sluznice) izolirano je ukupno 13.818 sojeva BHS. Od toga je broja 12.519 sojeva pripadalo serološkoj grupi A (90,6%), dok su BHS seroloških grupa B, C i G bili izolirani u 1299 briseva ždrijela te nosno-ždrijelne sluznice (9,4%). Međusobni odnos im je slijedeći: BHS-B 36,7%, BHS-C 36,9%, BHS-G 26,4%.

Za ovo su istraživanje, međutim, izdvojeni svi sojevi BHS koji ne pripadaju grupi A, a koji su izolirani iz briseva ždrijela. Analizom je tako obuhvaćeno 394 soja BHS-B, 404 soja BHS-C i 289 sojeva BHS-G. Metodom slučajnog izbora obuhvaćeno je radi usporedbe i 400 sojeva BHS-A također izoliranih iz briseva ždrijela.

Svi brisevi ždrijela zasijavani su istovremeno na dvije hranjive podloge: neselektivni agar s 5% ovčje krvi i selektivnu podlogu koja, osim 5% ovčje krvi, sadrži i 3% NaCl i 40 mg nalidiksične kiseline na 1 litru gotove podloge.¹⁰

Broj poraslih kolonija BHS određen je semikvantitativno prema slijedećim kriterijima:^{3,4,14}

+ 1— 9 kolonija
++ 10— 49 kolonija
+++ 50— 200 kolonija
++++ čista kultura

Grupna pripadnost izoliranih sojeva BHS određena je metodom koaglutinacije,^{24,25} uz prethodnu ekstrakciju grupnog polisaharidnog antigena ledenom otopenom kiselinom i natrijevim nitritom¹⁸ ili upotrebom komercijalnog enzimskog sistema za ekstrakciju.²⁴

Statistička analiza rezultata: Uz tabelarni prikaz rezultata korištena je i metoda χ^2 testa.

REZULTATI

Rezultati semikvantitativne analize porasta sojeva BHS seroloških grupa A, B, C i G prikazani su

TABLICA 1.

Semikvantitativna analiza broja poraslih kolonija beta hemolitičkih streptokoka seroloških grupa A, B, C i G

BETA HEMOLITICKI STREPTOKOK	SEMIKVANTITATIVNA GRADACIJA				UKUPNO
	+	++	+++	++++	
SEROLOSKE GRUPE	Broj (%)	Broj (%)	Broj (%)	Broj (%)	
A	9 (2.2)	59 (14.8)	54 (13.5)	278 (69.5)	400
B	129 (32.7)	96 (24.5)	122 (30.9)	47 (11.9)	394
C	96 (23.8)	68 (16.8)	132 (32.7)	108 (26.7)	404
G	84 (29.1)	44 (15.2)	86 (29.8)	75 (25.9)	289
SVEUKUPNO					1487

Legenda: + 1— 9 kolonija
++ 10— 49 kolonija
+++ 50—200 kolonija
++++ čista kultura

sumarno na **tablici broj 1.** Uočava se da postoje značajne razlike u distribuciji broja izoliranih sojeva BHS različitih seroloških grupa unutar svakog pojedinog stupnja semikvantitativne gradacije. Tako se BHS-A značajno češće izolira u broju kolonija većim od 50 ili u čistoj kulturi (83), nego ostali BHS koji ne pripadaju ovoj grupi.

Svega 30,9% sojeva BHS-B izolirano je u više od 50 kolonija, dok je u čistoj kulturi bilo tek 11,9% sojeva. Više od jedne polovine analiziranih sojeva BHS-C i BHS-G (59,4%, odnosno 55,7% izolirano je u više od 50 kolonija, ali je ta proporcija ipak značajno manja u usporedbi s odgovarajućom proporcijom BHS-A ($p < 0.01$). Između BHS-C i BHS-G nema statistički značajnih odstupanja u proporcijama izoliranih sojeva unutar pojedinog stupnja semikvantitativne gradacije ($p > 0.01$).

U malom broju kolonija najčešće se izolira BHS-B (56,4%) u usporedbi s BHS-C (40,7%) i BHS-G (44,5%). Ova je razlika pogotovo izražena u odnosu na BHS-A koji je u manje od 50 kolonija izoliran u svega 17% briseva ždrijela ($p < 0.01$).

DISKUSIJA

U diferencijalnoj dijagnozi akutnog tonzilofaringitisa nesigurni su klinički kriteriji za razlikovanje streptokokne bolesti od onih druge etiologije. Neprecizna dijagnoza može čak dovesti do neugodnih posljedica neprepoznate streptokokoze, ili do neracionalne antimikrobne terapije kada se ta dijagnoza neopravdano prenaplaćava. Njena pouzdanost ipak u dobroj mjeri ovisi o mikrobiološkom nalazu.^{8, 19, 23, 28}

Prisustvo BHS u ždrijelu opserviranog bolesnika može imati dva posve oprečna tumačenja:

1. radi se o bolesniku s tonzilofaringitisom uzrokovanim BHS, ili
2. radi se o kliconoštvu BHS u bolesnika čija je aktualna bolest druge etiologije.

Interes istraživača bio je prvenstveno okrenut BHS-A zbog njegove virulentnosti i brojčane prevlake nad ostalim BHS.^{1, 17, 20, 29}

Breese i suradnici pokazali su da postoji izražita korelacija između broja poraslih kolonija BHS-A i kliničkih impresija o bolesti. Koristeći semikvantitativnu gradaciju, utvrdili su da se BHS-A znatno češće izolira u velikom broju kolonija (više od 50 ili čak u čistoj kulturi) pogotovo u djece i mlađih bolesnika s jasnom kliničkom slikom akutnog tonzilofaringitisa. U takvih bolesnika brisevi ždrijela bili su pozitivni u 74% slučajeva, a od njih je čak 83% sadržavalo više od 50 kolonija BHS-A.³

S druge strane, u zdravih osoba je BHS-A bio izoliran u svega 4%. To znači da je kliconoštva bilo 4%, ali je tek u jedne trećine takvih bolesnika bilo više od 50 kolonija u brisevima ždrijela.³

U asimptomatskih ispitanika najčešće se BHS-A izolira u malom broju kolonija (+ ili ++). Kliconoštvo ili manifestna bolest su podjednako zastupljeni pod gradacijom označenom +++, dok se u bolesnika s jasnom streptokoknom bolesti najčešće izoliraju BHS-A u čistoj kulturi (++++). Za zaključke drugih autora karakteristične su izolacije BHS ostalih seroloških grupa (B, C i G) koje u prosječno 63% briseva sadrže više od 50 kolonija.^{14, 16} Radi usporedbe ističemo da je BHS-A u tom broju kolonija izoliran u 83% briseva, isto što su pokazali i naši rezultati.

Problem razlikovanja faringealnog kliconoštva od akutne bolesti osobito je izražen u mlađoj životnoj dobi, kada je i proporcija dokazanog kliconoštva veća. To je naročito izraženo za BHS-A, BHS-C i BHS-G, više u hladnije doba godine, osobito u gradu i u djece predškolskog uzrasta.^{2, 4, 7} Kliconoštvo ovih BHS se kreće od 1—7,5%. S obzirom na učestalost kliconoštva, za grupu B je karakteristično da nema izraziti afinitet za pojedinu životnu dob.⁷

Hoffman je pokazao, ispitujući BHS u kliconoša (zdrave osobe bez respiratornih simptoma, tri mjeseca bez antimikrobne terapije), da je 65% izoliranih BHS-A bilo u manje od 50 kolonija, BHS-B 35% BHS-C 52% i BHS-G 53%.¹⁴ Promatrajući istovremeno učestalost izolacije BHS u čistoj kulturi u kliconoša, uočavaju se još veće razlike. Tu je BHS-A u kliconoša izoliran u svega 5% slučajeva. Drugim riječima, prisustvo BHS-A u malom broju kolonija je gotovo siguran znak kliconoštva osim kada imamo podatak o terapijskom utjecaju antimikrobnih sredstava. Za BHS drugih seroloških grupa podaci su dvojbeni. Tako BHS-B raste u čistoj kulturi u osoba bez ikakvih kliničkih simptoma u 18%, BHS-C u 13%, a BHS-G u 9%.¹⁴ Ove su vrijednosti veće od onih za BHS-A, ali ipak sugeriraju da je kliconoštvo najčešće povezano s malim brojem poraslih kolonija.

Ima nekoliko objašnjenja za prisustvo malog broja kolonija BHS u brisu ždrijela:

1. Radilo se prvenstveno o velikom broju mikroorganizama koji se zbog vanjskih utjecaja, kao što je, na primjer, antimikrobna terapija, usporeno razmnožavaju i tako izazivaju blage ili, čak, inaparentne infekcije.

2. Možda je od početka bolesti proteklo više vremena. Naime, pokazalo se da mikrobiološka analiza brisa ždrijela ima veću vrijednost ako se brisevi uzimaju u obradu do 10 sati od početka bolesti, jer se tada ne dokaže tek 10% BHS infekcija.³ To su upravo oni brisevi gdje je i broj kolonija BHS očevidno malen.

3. Radilo se prvenstveno o malom broju mikroorganizama (mala infektivna doza, slaba virulencija, izražene obrambene reakcije domaćina). U takvih

osoba nije bilo dovoljno razmnožavanje mikroorganizama da bi porastao veliki broj kolonija na hranjivoj podlozi.

Identifikacija streptokoknog uzročnika, njegova kvantitativna i kvalitativna distribucija, određena semikvantitativnom gradacijom, vrlo je prikladan postupak i za svakodnevni rad, koristan infektologu i drugom praktičaru koji se sučeljava sa streptokoknim infektom, ali je i poticaj za daljnje znanstvenoistraživačke studije.

ZAKLJUČAK

1. Važnost nalaza BHS u brisu ždrijela nije izdvojena iz ukupne koncepcije o streptokoknoj bolesti u promatrane osobe. Taj nalaz može biti, s jedne strane, uvjerljiva potvrda kliničke dijagnoze, a s druge strane, samo izraz kliconošta, čije je epidemiološko značenje ispred kliničkog.

2. Kvantitativno promatranje porasta kulture BHS upućuje na značajne razlike u distribuciji broja izoliranih sojeva različitih seroloških grupa unutar svakog pojedinog stupnja semikvantitativne gradacije.

3. Utvrđene značajne razlike u odnosu pojedinih sojeva BHS različitih seroloških grupa olakšavaju kvantitativnu i kvalitativnu diferencijaciju BHS i upućuju na znanstveni i sasvim praktički značaj ove diferencijacije za ocjenu kliničkih manifestacija bolesti, kao i za njena epidemiološka obilježja u bolesnoj i zdravoj populaciji.

4. Ne može se izbjeći pitanje da li je prisustvo ovih BHS u respiratornom traktu znak kliconošta ili prave etiologije bolesti. Odgovor na to pitanje olakšat će praktičaru ispravan pristup streptokoknom infektu i s kliničkog i s epidemiološko-preventivnog aspekta, te daljnju znanstvenu obradu prezentiranog pitanja.

LITERATURA

1. Adanja B, Vlajinac K, Čanić M. Distribucija grupa beta-hemolitičkih streptokoka u periodu od 1973—1977. godine. *Srp Arh Celok Lek* 1981;109:125—33.
2. Bobinac E, Petras I, Gmajnički B. Streptokokno kliconošta sa stanovišta kliničara. *Med Vjesn (Sisak)* 1982;8:11—7.
3. Breese BB, Disney FA, Talpey WB, Green JL. Beta-hemolytic streptococcal infection. *Amer J Dis Child* 1970; 119:18—26.
4. Colman G. Diagnosis of streptococcal sore throat in children. U: Application of biotechnology to the rapid diagnosis of infectious diseases. London: Royal Society of Medicine Services Ltd, 1987:13—20. (Series No 113).
5. Facklam RR. Specificity study of kits for detection of group A streptococci directly from throat swabs. *J Clin Microbiol* 1987; 25:504—8.
6. Fahmestock SR, Alexander P, Nagle J, Filipula D. *J Bacteriol* 1986;167:870—80.

7. Ferrieri P, Blair LL. Pharyngeal carriage of group B streptococci: detection by three methods. *J Clin Microbiol* 1977;6:136—9.
8. Fertally SS, Facklam R. Comparison of physiologic tests used to identify non-beta-hemolytic aerococci, enterococci and streptococci. *J Clin Microbiol* 1987;25:1845—50.
9. Finch RG, Aveline A, Graup G streptococcal septicaemia: a clinical observation and laboratory studies. *J Infect* 1984;9:126—33.
10. Gmajnički B, Kuzmanović N. Nova selektivna podloga u izolaciji beta-hemolitičkog streptokoka iz brisa ždrijela. U: Zbornik na trudovi ot VI-ot intersekciskih sastanaka na infektolozite na SR Makedonija i SR Bosna i Hercegovina. Mavrovo, 1977. Infektološka sekcija društva ljekara SR BiH, 167—9.
11. Gmajnički B, Breitenfeld V, Jagić H, Bobinac E, Kovačić V, Sekula I. Naša prva iskustva sa streptokokom grupe C. *Arhiv za št majke djeteta* 1981;25:235—43.
12. Graham L, Meier F, Centor RM, Garner BK, Dalton HP. Effect on medium on cultivation conditions on comparison between latex agglutination and culture detection of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1986;24:644—6.
13. Hadfield SG, Petts DN, Kennedy P, Lane A, McIlmurray B. Novel colour test for rapid detection of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1987;25:1151—4.
14. Hoffman S. The throat carriage rate of group A and other beta-hemolytic streptococci among patients in general practice. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (B)* 1985;93:347—51.
15. Hoffman S, Henrichsen J. Detection of a group A streptococcal antigen from throat swabs by use of a latex agglutination test kits in general practice. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand (B)* 1987;95:89—94.
16. Kaplan EI, Top FH, Dudding BA, Wannamaker LW. Diagnosis of streptococcal pharyngitis: differentiation of active infection from the carrier state in the symptomatic child. *J Infect Dis* 1971;123:490—501.
17. Krajinović S, Nastasović M, Stefanović N. Tipovi beta-hemolitičkog streptokoka u šarlahnih bolesnika. U: Zbornik radova II naučnog sastanka infektologa Jugoslavije. Portorož, 1968; 589—600.
18. Laban P, Chastel C. Technique simple et rapide groupage des streptocoques. *Ann Biol Clin (Paris)* 1976;34:229—32.
19. Mabel SY, Facklam RR. New test system for identification of aerococcus, enterococcus and streptococcus species. *J Clin Microbiol* 1986;24:607—11.
20. Popović-Uroić T, Gmajnički B, Bobinac E. Istraživanje distribucije seroloških grupa beta-hemolitičkog streptokoka. *Rad Med Fak Zagreb* 1987; (u štampi).
21. Schwabe LD, Small MT, Randall EL. Comparison of test pack strep A test kit with culture technique for detection of group A streptococci. *J Clin Microbiol* 1987;25:09—311.
22. Slifkin M, Cumbie R. Identification of group B streptococcal antigen with lectin-bound polystyrene particles. *J Clin Microbiol* 1987;25:1172—5.
23. Slifkin M, Cumbie R. Serogrouping single colonies of beta-hemolytic streptococci with achromopeptidase extraction. *J Clin Microbiol* 1987;25:1555—6.
24. *Strepto-Kit*. Directions for use. BioMerieux. Marcy l' Etoile. France.
25. *Streptosecs*. Directions for use. Organon Teknika. B. V. Oss. Holland.
26. Svava V, Tambić T, Beus I. Povodom prvih dokazanih slučajeva infekcije beta-hemolitičkim streptokokima grupe B u djeteta. *Arh za št majke djeteta* 1972;16:219—27.
27. Tappall JW. Relationship between pigment production and haemolysin formation by Lancefield group B streptococci. *J Med Microbiol* 1987;24:83—7.
28. Uzunović S. Identifikacija beta hemolitičkih streptokoka ispitivanjem utjecaja glukoze i deoksiribonukleinske kiseline na njihovo hemolitičko djelovanje. (Magistarski rad). Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1988;98.
29. *World Health Organization*. WHO Meeting on streptococcal diseases complex. Geneva, 15—18. November 1983. Geneva, 1985. (BVI/Strep/85.1.)

Abstract

SEMIQUANTITATIVE ANALYSIS OF BETA-HEMOLYTIC STREPTOCOCCI SEROGROUPS ISOLATED FROM THE THROAT SWABS

Tatjana Popović-Uroić, Emil Bobinac, Miroslav Đurašinić, Marina Mošnjac
Faculty of Medicine Zagreb, Faculty of Medicine Tuzla

The prospective semiquantitative analysis of beta-hemolytic streptococci serogroups A, B, C and G isolated from the throat swabs of in- and out-patients at the University Hospital of Infectious Diseases »Dr Fran Mihaljević« was carried out over a six year period (1982—1987).

Significant differences in proportions of separate serogroups of BHS within particular semiquan-

titative gradation were established. BHS-A was more frequently isolated in more than 50 colonies or in the pure culture (83%), than BHS of other serogroups ($p < 0.01$). In 56% of the throat swabs where BHS-B was revealed there were less than 50 colonies and only 12% of the swabs revealed BHS-B in pure culture.

Over one half of BHS-C and BHS-G strains (59% and 56% respectively) were isolated in more than 50 colonies but still the proportion was significantly lower the respective one in BHS-A strains ($p < 0.01$).

Key words: beta-hemolytic, streptococci, semiquantitative analysis, streptococcal disease or carriage

Received: May 7, 1988