

576.851.214.073.3

ZVÝŠENÍ ZÁCHYTNOSTI BETA HEMOLYTICKÝCH STREPTOKOKŮ PŘI KULTIVACI VE VF BUJÓNU

Major MUDr. Josef VANČUŘÍK, major MUDr. František VÝMOLA

Snaha zvýšit záchytnost beta hemolytických streptokoků především u klinických diagnos – angína, revmatická horečka a skarlatina neustává ani dnes při vyspělé kultivační technice. Je tomu tak proto, že u těchto klinických diagnos máme oprávněné důvody tvrdit, že původcem je převážně beta hemolytický streptokok, i když ho kultivačně nezachytíme. Proto se řada laboratorních pracovníků snaží již delší dobu zavést takový způsob pěstování a sestavit kultivační medium, které by umožnilo zachytit beta streptokoky, pokud možno vždy, jsou-li při odběru zachyceny na tampónu.

Tak se doporučuje přidávat do pomnožovacích půd pro pyogenní beta streptokoky glukosu (8,12). Přes své výhody má však i nedostatky. Při inkubaci delší 24 hod. se tvoří příliš mnoho kyselin a streptokoky zacházejí. Ve snaze zabránit přílišnému okyselení půdy přidávají se fosfátové nárazníky. Jinou nevýhodou glukosy je, že omezuje tvorbu hemolysinu (4) u streptokoků skupiny A, i když mnozí autoři tuto okolnost neuznávají. Velmi nepříznivou překážkou pro růst beta hemolytických streptokoků jsou zejména alfa hemolytické streptokoky, kde jde pravděpodobně o účinek peroxydasy, a dále pyogenní stafylokoky. Tyto mikroby se v bujónu výtečně a rychle pomnožují a potlačují tak růst pyogenních streptokoků. Proto se řada autorů snažila připravit selektivní půdy, které by zvýšily záchytnost beta streptokoků. Cesta vedla přes anilinová barviva a později přes natrium-azid v obohacené pomnožovací půdě podle Pike a Fashena (9). Pomocí této známé, ale

ne běžně užívané metody u nás, byla záchytnost u vybraných případů po kultivaci v jejich bujónu 42 procent, ve srovnání se záchytností v primokultuře na krevním agaru (14 %). Bylo použito králičí a lidské krve, při čemž na agaru s lidskou krví byla největší záchytnost, což odporuje často uváděné námitce, že lidská krev není vhodná pro přítomnost O-anti-streptolysinu. Podle zkušeností našich vlastních i jiných (1) má i tato metoda některé nevýhody, zejména proto, že prvních 18 hod. roste streptokok sice sám, ale přidaná bakteriostatika potom již nestačí zabránit růstu ostatních zárodků. Selektivní účinek se tedy v průběhu času značně mění. Tato skutečnost bude na překážku v těch případech, kdy půjde o zasílání materiálu přímo v této pomnožovací půdě.

Jiní autoři využili inhibičního účinku sulfonamidů na přidruženou bakteriální flóru, zejména alfa streptokoky. Přikládali na půdu papírky smočené v sulfonamidu (aristamid) (5,6) a v okolí jim vyrůstaly beta streptokoky. Zvýšená záchytnost tak činila 23 % (6). Ostatně jak podle literatury, tak i podle našich vlastních zkušeností, získaných při práci se sulfathiazolovými disky se zdá, že zde nejde o jednoduchý inhibiční účinek, ale o stimulaci růstu streptokoků minimálními dávkami, podobně jako je tomu u penicilinu (13).

Rovněž anaerobní pěstování materiálu podezřelého z přítomnosti beta hemolytických streptokoků se již dříve doporučovalo; dávalo rozdílné výsledky. Jones a spol. (7) došli k závěru, že polovina hemolytických streptokoků z hrdla se zachytí pouze za an-

aerobních podmínek. Pike a Fashena (9) naproti tomu nepozorovali žádné úspěchy při použití anaerobiosy. Nedostatek jejich práce je však v tom, že srovnávali anaerobní primokulturu se selektivními pomnožovacími půdami. V poslední době použil této metody Burkhardt a Legler (5). Materiál inokulovali přímo na krevní plotny, které ukládali do anaerostatu. Jejich záchytnost se zvýšila o 24,6 %, ale nevýhoda spočívala ve ztrátě typičností růstu různých mikrobu za anaerobních podmínek. Bajocchi (2) použil této metody při současném obohacování tuhých a tekutých půd hovězím sérem a hemolysovanou krví s bakteriostatiky (krystal-violet a natrium-azid). Zvýšil tak u svých případů záchytnost o 30 % ve srovnání s primokultivací na krevní agar. Rovněž Gierhake (6) v uvedené práci měl větší záchytnost za anaerobiosy; cituje některé autory (Vystavel, Fry), kteří při anaerobní kultivaci přinutí nehemolysující streptokoky k produkci hemolysinu. Také Wagner (11) potvrzuje, že anaerobiosa stupňuje tvorbu hemolysinu v krevním agaru. Bernheimer a Rodbart (3) zjistili, že přidání natrium thioglykolátu do půdy zlepšuje tvorbu streptolysinu. Souhrn o anaerobně rostoucích streptokokích podává ve své práci Roemer (10).

Proti vyjmenovaným pracím, jež se týkají anaerobní kultivace, užíváme od začátku r. 1957 celkem jednoduchého kultivačního media – regenerovaný VF bujón s glukosou pro anaerobní kultivaci (složení půdy uvedeno v Mikrobiologických vyšetřovacích metodách 1958), VFB – na místo běžně užívaného játrového bujónu (JB). Byli jsme k tomu vedeni snahou získat podrobnější zprávy o roli anaerobních mikrobu v chorobných procesech horních dýchacích cest a kromě toho jsme chtěli zachytit etiologického původce u těch případů, které zůstaly negativní při aerobní kultivaci. Tehdy jsme měli na mysli i literární údaje o vlivu anaerobiosy na kultivovatelnost pyogenních streptokoků.

Naše výsledky:

Záchytnost beta hemolytických streptokoků jsme hodnotili u klinických diagnos – angína, revmatická horečka a skarlatina. Úkolem tohoto sdělení bylo srovnat, které kultivační medium je nejvhodnější pro růst beta hemolytických streptokoků. Tabulka č. 1 vyjadřuje číselně, o kolik je vypěstovaných streptokoků navíc v játrovém bujónu (JB) a VF bujónu (VFB) než v primokultuře. Tabulka č. 2 ukazuje totéž v procentech. Tabulka č. 3 udává v procentech, o kolik je větší záchytnost beta streptokoků v pomnožovacích půdách ve srovnání s primokultivací. Z této tabulky je také patrna výhodnost použí-

Tab. 1

Klinická diagnosa	Počet případů	v primokultuře	po pomnožení v		po pomnožení navíc v	
			VFB	JB	VFB	JB
Angina	3046	1898	2620	2098	722	194
Febris rheumat.	444	298	406	332	108	34
Scarlatina	64	52	62	56	10	4

Tab. 2

Klinická diagnosa	v primokultuře	po pomnožení v		po pomnožení navíc v	
		VFB	JB	VFB	JB
Angina	62,3 %	82,7 %	68,6 %	20,4 %	6,3 %
Febris rheumatica	76 %	91 %	74,7 %	24 %	7,7 %
Scarlatina	81 %	96 %	87,8 %	15 %	6,8 %

Tab. 3

Klinická diagnosa	v primokultuře	po pomnožení v		v % po pomnožení větší záchytnost v	
		VFB	JB	VFB	JB
Angina	1898	2620	2092	38	10,2
Febris rheumatica	298	406	332	36,2	11
Scarlatina	52	62	56	19,2	7,6

vání VFB jako pomnožovací půdy pro anaerobní kultivaci.

Podle dosažených výsledků možno uzavřít:

1. VF bujónem lze zachytit mnohem více beta hemolytických streptokoků než primokultivací a běžně užívaným játrovým bujónem.
2. Výhodnost užití VFB je zřetelná především u angíny. Je tomu tak pravděpodobně proto, že při této chorobě bývá v mnoha případech více smíšené ústní mikroflóry než u spály a revmatické horečky. Jsou tedy beta streptokoky ohroženy více přerostem.
3. VF bujónem možno beta streptokoky zachytit konstantně ve větším množství než na krevním agaru. Tomu tak není při užití JB, který vykazuje sice také větší záchytnost než krevní agar, ale často beta streptokoky vyrostou pouze na krevním agaru.
4. VFB nevyžaduje dalších identifikačních subkultur.

Podáváme-li tuto zprávu, činíme tak proto, abychom doporučili zavést VFB do běžné praxe. Dosažené výsledky ukazují na zřejmý vztah mezi růstem a metabolismem beta hemolytických streptokoků a sníženým oxydoredukčním potenciálem. Vliv této okolnosti, zejména na tvorbu streptolysinu u skupiny A je dobře známý. Zvýšení záchytnosti při anaerobní kultivaci lze vysvětlit stimulací hemolysy, která jinak mnohdy chybí, takže beta streptokoky, jsou-li ojedinělé, se nedignostikují. Při našem postupu, kdy streptokoky se pěstují na běžném krevním agaru po předchozí anaerobní kultivaci na VFB, jde zřejmě o přímý vliv sníženého oxydoredukčního potenciálu na množení streptokoků. Nedostatek kyslíku znamená pro ně lepší životní podmínky, což je charakterisuje jako fakultativní anaeroby, jimž chybí katalasa a ostatní železité dýchací fermenty.

Souhrn

Autoři poukázali na výhodnost použití VF bujóny pro pomnožení a zachycení beta hemolytických streptokoků. Převážně většinu v literatuře uvedených půd a metod pro složitost přípravy, citlivost, časovou náročnost a nedostupnost chemikálií se běžně rutinně neužívá a je omezena jen na několik málo laboratoří.

Autoři upozorňují proto na celkem jednoduchou kultivační půdu, mající teoretické opodstatnění, použitelnou v každé laboratoři, bez zatížení provozu. Při užití této půdy se nepotlačuje ostatní mikroflóra, která by mohla přijít v úvahu jako patogenní činitel, kolonie si zachovávají své typické morfologické projevy, dají se snadno diagnostikovat, takže není třeba dalších identifikačních subkultur.

Záchytnost beta-hemolytických streptokoků je při užití VF bujónu vyšší v průměru o 19–38 % než u primokultivace.

Резюме

Авторы указывают на выгоду применения VF-бульона для выращивания и обнаружения бета-гемолитических стрептококков. Подавляющее большинство приведенных в литературе питательных сред и методов бактериологического исследования из-за сложности приготовления, чувствительности, трудности (в смысле большой затраты времени) и недоступности химических веществ неприменимы в повседневной рутинной работе и ими пользуются только в некоторых лабораториях.

Авторы поэтому и обращают внимание на простую в общем питательную среду, теоретически обоснованную, которой можно пользоваться в каждой лаборатории без особого ее обременения. При употреблении этой питательной среды не угнетается остальная микрофлора, которая могла бы быть возможным патогенным фактором, колонии сохраняют свою типичную морфологию, их легко

диагностировать, так что не требуется выращивать для идентификации новые субкультуры.

VF-бульон позволяет выявлять бета-гемолитических стрептококков в среднем на 19–38 % чаще, чем при первичной культивации.

Summary

The advantage of using VF broth for the cultivation and identification of beta hemolytic streptococci is stressed. Most of the culture media and methods, reported in medical literature are used only in very few laboratories, because their preparation is complicated, delicate and lengthy, the chemicals often unobtainable. The authors recommend therefore the use of a simple culture medium, which has theoretical foundation and which can be easily used in every laboratory. When using this medium the other microflora, which may be taken into consideration as pathogenic, is not suppressed, the colonies keep their typical morphologic shape, and therefore it is very easy to recognize them without the help of further identification subcultures. Isolation of beta hemolytic streptococci obtained from VF broth is by 19–38 % higher than when using primocultivation.

Písemnictví

1. Andrieu, G., Enjalbert, L., Lapchine, L.: Ann. Inst. Past. No 5, 1954.
2. Bajocchi, E.: Acta pat. et microbiol. Scand. XL, 2, 1957.
3. Bernheimer, A. W., Rodbart, M.: J. Exp. Med. 88, 149, 1948.
4. Bierkowski, E.: Zentralblatt f. Bakt., I. Abt. Orig. 69, 165, 1956.
5. Burkhardt, F., Legler, F.: Archiv f. Hyg. u. Bakt. 6, 140, 1956.
6. Gierhake, F. W.: Klin. Woch., 32, 292, 1954.
7. Jones, M., Holmer, L. F., Hale, W. M.: J. Bact. 42, 139, 1941.
8. Málek, I., Wagner, V.: Mikrobiol. vyš. metody a stručná diagnostika v praxi, náklad SLČ, 89, 1948.
9. Pike, R. M., Fashena, G. H.: Am. J. Pub. Health, 36, 611, 1946.