

# Laboratorní diagnostika v NRL pro stafylokoky CEM – SZÚ v roce 2021

*Laboratory diagnostics in the National Reference Laboratory for Staphylococci,  
Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, in 2021*

**Petr Petráš, Radoslava Hutníková, Michaela Šimková, Hana Pejšová**

## Souhrn • Summary

Národní referenční laboratoř pro stafylokoky CEM SZÚ se i v roce 2021, v rámci zajištění surveillancie stafylokokových infekcí, věnovala podrobnému vyšetřování kmenů stafylokoků z humánního klinického materiálu. Celkem to bylo 659 kmenů, převážně druhu *Staphylococcus aureus*, které byly zaslány asi z 90 bakteriologických pracovišť z celé České republiky. Metodou PCR byla zjišťována přítomnost genů kódujících především Pantonův - Valentinův leukocidin, toxin Syndromu toxického šoku, exfoliatiny A, B, D a enterotoxiny A–D. Informace o produkci faktorů virulence jsou důležité pro ošetřující lékaře ke správnému stanovení klinické diagnózy a tedy i vhodné terapie. V roce 2021 jsme zaregistrovali 13 případů závažného onemocnění - syndrom toxického šoku, kdy jsme mohli potvrdit původce – toxinogenní kmen *S. aureus*. Pomohli jsme řešit i hromadný výskyt puchýřnatého onemocnění novorozenců v jedné porodnici, kdy byl příčinou kmen *S. aureus* s produkcí exfoliatinu A. V celém souboru bylo i 45 (5,9 %) kmenů koaguláza negativních stafylokoků. U těchto podmíněných patogenů jsme fenotypizací a metodou hmotnostní spektrometrie kmeny identifikovali, resp. konfirmovali identifikaci zjištěnou již v terénních laboratořích.

The main focus of the National Reference Laboratory for Staphylococci (NRL) in 2020 was again on the investigation of staphylococcal strains from human clinical specimens within the surveillance of staphylococcal infections. In total, 659 strains mostly of the species *Staphylococcus aureus* referred to the NRL by 90 bacteriological laboratories from all over the Czech Republic were analysed. The strains were screened by PCR for the genes encoding Pantone-Valentine leukocidin, toxic shock syndrome toxin, exfoliative toxins A, B, and D, and enterotoxins A–D. Data on the production of virulence factors are helpful for attending physicians in determining the right diagnosis and effective treatment. In 2021, 13 cases of severe toxic shock syndrome were reported, with toxigenic strain of *S. aureus* being confirmed as the causative agent. The NRL also participated in the investigation of an outbreak of blistering skin condition in newborns in one maternity hospital where the cause of infection was an exfoliative toxin A producing strain of *S. aureus*. Fifty-eight strains (5.9%) referred to the NRL were coagulase-negative staphylococci. These opportunistic pathogens were identified or confirmed, after previous identification by field laboratories, by phenotyping and mass spectrometry.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2022; 31(5): 181–185

**Klíčová slova:** laboratorní diagnostika, stafylokoky, Pantonův - Valentinův leukocidin, TSST -1, enterotoxin, exfoliatin, koaguláza negativní stafylokoky

**Keywords:** laboratory diagnostics, staphylococci, Pantone-Valentine leukocidin, TSST-1, enterotoxin, exfoliative toxin, coagulase-negative staphylococci

Obdobně jako v minulých letech se Národní referenční laboratoř pro stafylokoky CEM SZÚ (NRL/St) v roce 2021 věnovala především laboratorní diagnostice v rámci zajištění surveillancie stafylokokových infekcí humánního původu. Celkem nám bylo zasláno **659** kmenů stafylokoků přibližně z 90 bakteriologických laboratoří celé naší republiky. Nejvíce kmenů jsme dostali z Odd. klinické mikrobiologie

a ATB centra VFN v Praze a z Oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice na Bulovce. Třetím nejčastějším dodavatelem kmenů byl Úsek klinické mikrobiologie a ATB středisko Nemocnice Strakonice, na čtvrtém místě Mikrobiologické oddělení Nemocnice Boskovice.

Podle odebraného materiálu byly nejčastěji zastoupeny kmeny z různých kožních infekcí (asi 36 % všech izolátů).

V celém souboru bylo 598 (90,7 %) kmenů *Staphylococcus aureus*, které nám byly zaslány ke zjištění faktorů virulence, tj. především produkce exotoxinů. V NRL/St v současnosti zjišťujeme přítomnost genů kódujících příslušný toxin metodou PCR, výjimečně si potvrzujeme produkci toxinu TSST-1 a enterotoxinů metodou latexové aglutinace (RPLA).

### PANTONŮV-VALENTINŮV LEUKOCIDIN (PVL)

PVL je velice nebezpečný cytotoxin, který se uplatňuje hlavně při infekcích kůže nebo měkkých tkání. Život ohrožující jsou především abscedující pneumonie, u nichž je popisována vysoká smrtnost. Zjištění pozitivita zasláního kmene na PVL produkci je jedním z nejčastějších a nejpotřebnějších požadavků na naší laboratoř. Přítomnost genů, které PVL kódují, byla zjištěna u 58, tj. 9,3 % ze sledovaných kmenů. Stejně jako u ostatních faktorů virulence platí, že do NRL/St jsou zasilány kmeny, u nichž je pravděpodobnost toxigenity vyšší než v běžné terénní populaci. Z PVL pozitivních bylo 27 (46,6 %) MRSA, ostatní byly kmeny citlivé. V kombinaci s ostatními sledovanými toxiny byly nejčastěji kmeny s enterotoxinem A (10). Podobně jako v předchozích letech se k nám dostalo 8 vysoce toxinogenních MRSA kmenů se schopností produkovat mimo PVL ještě toxin TSST-1 a enterotoxiny B a C. Pocházely ze stejných lokalit jako vloni a předloni, tj. FN Bulovka, ale také z Pardubic,

Písku a FTN v Praze Krči. Z nich 4 byly od mongolských pacientů, 4 od Čechů.

Kmeny pozitivní na PVL pocházely z abscesů a zhnisaných ran. V loňském roce jsme dostali jeden PVL pozitivní kmen z těžkého případu pneumonie. Jednalo se o 3,5letou dívku, která byla hospitalizována na JIP Dětské kliniky v Masarykově nemocnici v Ústí nad Labem pro rychle progredující pravostrannou bronchopneumonii s atelektazickými změnami. Z bronchoskopického materiálu byl izolován citlivý kmen *S. aureus*, pozitivní na PVL. Po intenzivní léčbě, včetně UPV s řízenou ventilací a řady antibiotik (mj. 3týdenní podávání klindamycinu) byla dívka po 22 dnech hospitalizace propuštěna do domácí péče.

Je možné, že případů tohoto nebezpečného onemocnění se vyskytlo více, bohužel ne všechny kmeny se k nám do NRL/St dostanou, abychom mohli tuto diagnózu potvrdit. Od roku 2007 máme v NRL/St zaregistrováno 24 případů abscedujících pneumonií, u kterých jsme prokázali původce – kmen *S. aureus* s produkcí PVL. Z nich 13 pacientů zemřelo [1].

### TOXIN SYNDROMU TOXICKÉHO ŠOKU TSST-1

Kmeny *S. aureus* s produkcí TSST-1 jsou původcem závažného onemocnění, stafylokokového syndromu toxického šoku (STŠ). STŠ se vyskytuje ve dvou formách. Menstruační syndrom toxického šoku je spojen s menses a používáním vaginálních tampónů. Druhá, nemenstruační forma může být komplikací jakéhokoliv jiného stafylokokového onemocnění. Kromě kmenů *S. aureus* s produkcí TSST-1 mohou být etiologickým agens STŠ i kmeny *S. aureus* produkující pouze některý z typů enterotoxinů. Ze sledovaných 598 kmenů byl TSST-1 zjištěn v 59 případech (9,9 %), 15 kmenů ho

Tabulka 1: Případy syndromu toxického šoku, registrované v NRL pro stafylokoky v roce 2021

Č.	sex	věk(let)	lokalita	datum	forma staf. onemocnění	izolace <i>S. aureus</i>	TSST-1	En
1	Ž	19	Brno	V. 21	menstruační STŠ	stěr tamponu	TSST-1	En A
2	M	8	Prostějov	VII. 21	zhnisaná popálenina	stěr popáleniny	TSST-1	En A
3	Ž	28	Liberec	VII. 21	zhnisaný defekt na patě	hnis z rány	TSST-1	En A
4	M	2 a půl	Tábor	VII. 21	panaricium palce PHK	hnis z rány	TSST-1	En C
5	Ž	34	Plzeň	VII. 21	menstruační STŠ	výtěr pochvy	TSST-1	-
6	Ž	17	Česká Lípa	VIII. 21	menstruační STŠ	stěr cervixu	TSST-1	En A
7	Ž	26	Hradec Králové	VIII. 21	menstruační STŠ	tampón	-	En B
8	Ž	15	Prostějov	VIII. 21	menstruační STŠ	tampón	TSST-1	En C
9	M	2 týdny	Praha	IX. 21	IMC novorozence	moč, krev *)	-	En D
10	Ž	17	Brno	X. 21	menstruační STŠ	výtěr pochvy	TSST-1	-
11	M	23	Kolín	X. 21	zhnisaná léze po tetování	hnis z léze	TSST-1	En A
12	Ž	17	Plzeň	XI. 21	menstruační STŠ	výtěr pochvy	TSST-1	-
13	Ž	12	Strakonice	XI. 21	osteomyelitida ramenního kloubu	krev	TSST-1	En A

\*) SAU s produkcí enterotoxinu D měla i jeho matka v mateřském mléku

produkovalo samostatně, zbytek v kombinaci s některým typem enterotoxinu A (nejvíce), B, C, i D. Kmeny nejčastěji pocházely z abscesů a zhnisaných ran, shodně jako u kmenů pozitivních na PVL.

V roce 2021 nám bylo v souvislosti se STŠ zasláno 13 kmenů. Z nich bylo 7 menstruálního typu STŠ a zbytek byly komplikace po zhnisané popálenině, infekci močových cest, a d. (**tabulka 1**). Mezi agens dominovaly kmeny s kombinací TSST-1 a enterotoxinu A, samotný TSST-1 produkovaly 3 kmeny. Ve dvou případech byl příčinou pouze enterotoxigenní kmen: u menstruálního případu 26leté ženy kmen s produkcí enterotoxinu B a u dvoutýdenního chlapce, kdy STŠ komplikoval průběh močové infekce, kmen s enterotoxinem D. Stejný kmen byl zjištěn i v mateřském mléku jeho matky. Všechny kmeny byly k cefoxitinu citlivé (MSSA).

Užívání vaginálních tamponů bylo v anamnéze všech 7 pacientek s menstruálním STŠ.

Celkově máme od r. 1983 registrováno 254 případů STŠ, z nich bylo 98 (38,6 %) spojeno s menzes, 39 případů (15,3 %) byly komplikace pyodermií, 31 případů STŠ byly komplikace různých ranných infekcí po úrazech a 25× zkomplikoval STŠ pooperační ranné infekce [2] – viz **graf 1**.

### EXFOLIATIN (EPIDERMÁLNÍ TOXIN)

Kmeny *S. aureus* s produkcí exfoliatinu (ET) jsou etiologickým agens epidermolytických infekcí, především puchýřnatého onemocnění novorozenců (PON). V nejtěžší

formě vede až k život ohrožujícímu syndromu opárené kůže (Staphylococcal Skin Scalded Syndrome = SSSS) s vysokou smrtností. U kmenů z humánního klinického materiálu se vyskytují tři antigenní typy exfoliatinu: A, B a D.

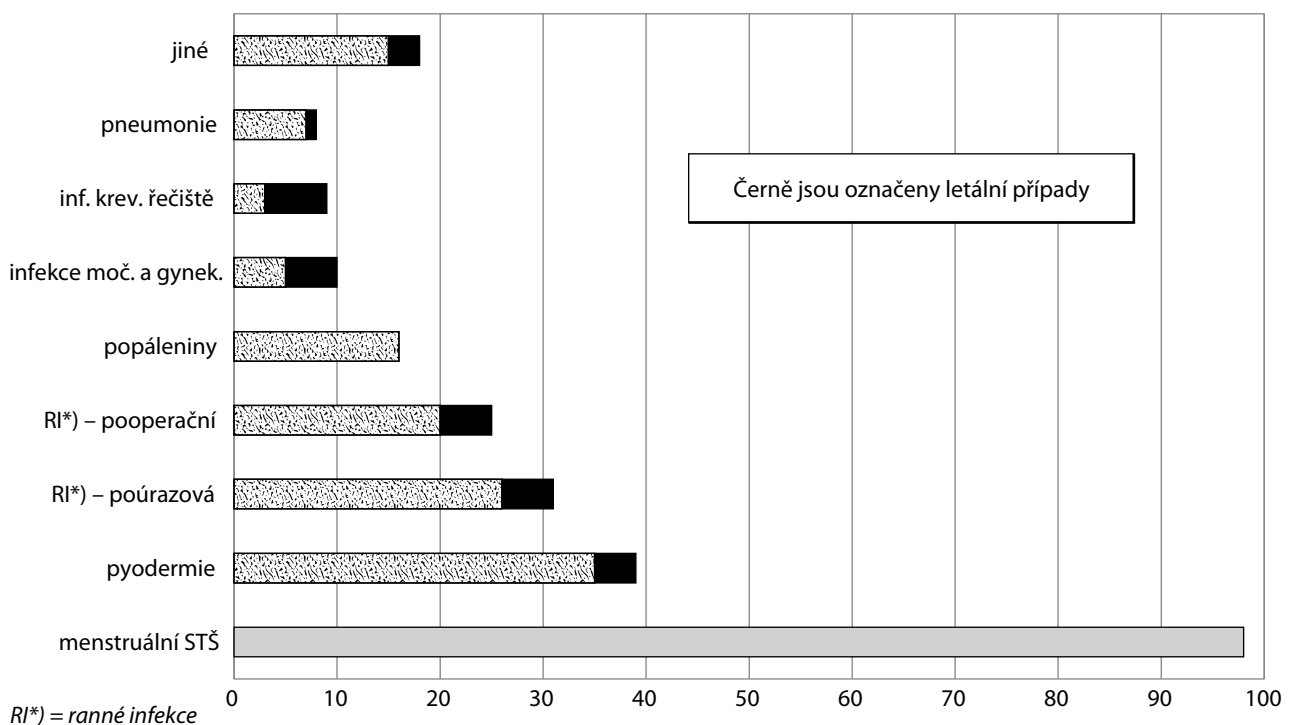
Z celku 622 kmenů *S. aureus* jsme v loňském roce prokázali pozitivitu na exfoliatinu u 33 kmenů (5,3 %). Nejčastěji to byly kmeny s produkcí exfoliatinu A (27), produkce ostatních typů ETB a ETD byla ojedinělá, včetně kombinace ETA + ETB a ETB + ETD.

V roce 2021 jsme pomáhali řešit hromadný výskyt PON na porodnickém oddělení jedné jihomoravské nemocnice. Exfoliatin A pozitivní kmeny pocházely z různých kožních infekcí novorozenců, u dvou dětí se dokonce objevovaly příznaky SSSS. Po důkladném epidemiologickém šetření personálu i prostředí byl nakonec identifikován shodný exfoliatin pozitivní kmen z mateřského mléka maminky jednoho z malých pacientů, která zřejmě infekci do porodnice zanesla.

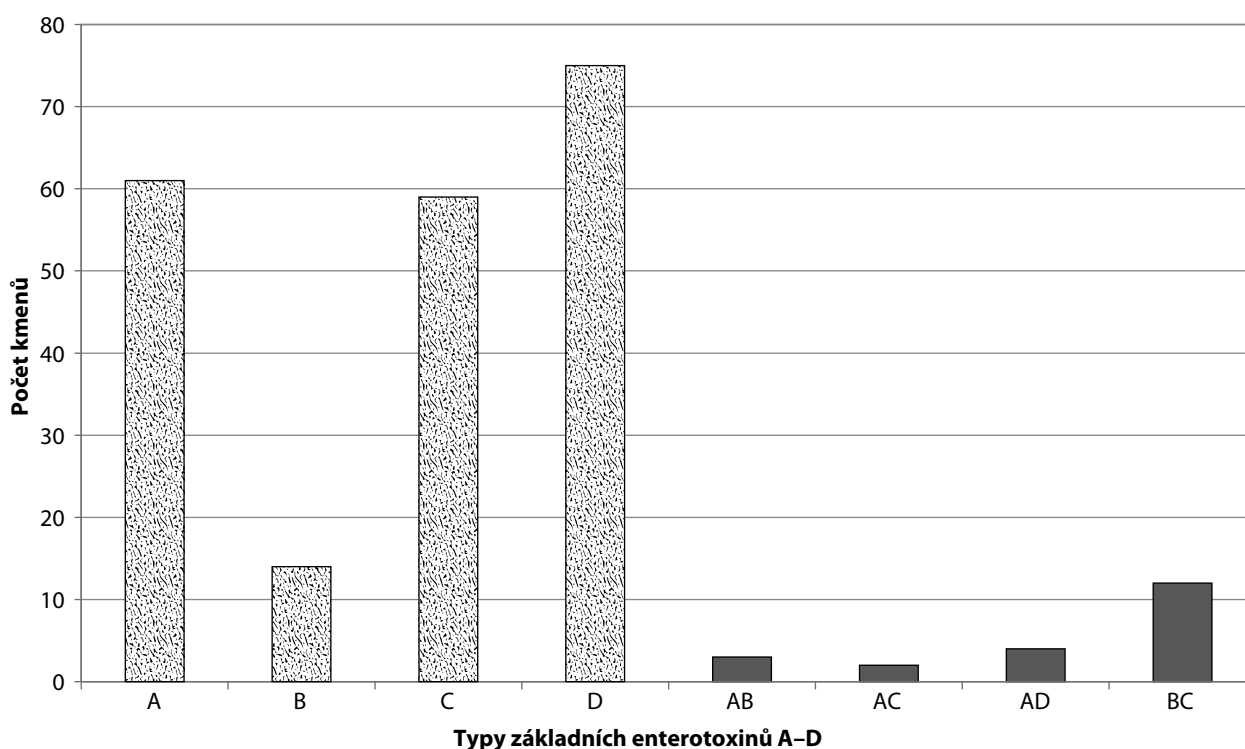
### ENTEROTOXINY

Kmenů pozitivních na základní typy enterotoxinů A–D bylo **230** (38,5 % ze sledovaných). Proti předcházejícím letům se podíly jednotlivých typů vyrovnaly, i když nejvíce opět bylo producentů enterotoxinu D a nejméně typu B – viz **graf 2**. Na různé kombinace dvou typů enterotoxinu bylo pozitivních 21 kmenů. Mezi nimi bylo 8 kmenů MRSA s kombinací enterotoxinů B a C, TSST-1 a PVL (viz odstavce o toxinu PVL). Hromadný výskyt stafylokokové enterotoxikózy jsme v roce 2021 řešit nepomáhali, v několika

**Graf 1: Forma stafylokokové infekce u 254 zaregistrovaných případů STŠ v ČR 1983–2021; černé plošky značí úmrtí, celkem zemřelo 29 pacientů**



Graf 2: Počty enterotoxigenních kmenů podle typů A–D v NRL/St v roce 2021 (celkem 230 kmenů)



případech menších výskytů infekcí spojených s nemocniční péčí pomohlo k prokázání shodnosti kmenů i zjištění produkce enterotoxinů.

Výsledky sledování enterotoxin pozitivních kmenů v NRL/St v letech 1972–2020 jsme prezentovali v lednovém čísle loňského ročníku tohoto časopisu [3].

### NON – *S. AUREUS* KOAGULÁZA POZITIVNÍ STAFYLOKOKY

Do naší sbírky přibýly 4 kmeny *S. argenteus*. To je v r. 2015 popsáný nový druh koaguláza pozitivního stafylokoka, který je blízce příbuzný s druhem *S. aureus*, ale na rozdíl od něj nemá obvyklý karotenoidní pigment (proto „stříbrný“ oproti „zlatému“). Kmeny, které nám přišly z Prostějova, FN Motol a ze Strakonice, byly izolovány ze zhnisaných ranných infekcí a z hemokultury.

Kmeny *S. argenteus* nelze biochemicky oddělit od *S. aureus*: základní diferenační testy mají shodné: volnou i vázanou koagulázu, hyaluronidázu, produkují alfa-hemolysin a jsou rezistentní k polymyxinu A. Všechna 9 kmenů ale metodou PCR postrádalo *nuc* gen, který kóduje termorezistentní nukleázu kmenů *S. aureus*. U všech vyšla i identifikace *S. argenteus* metodou MALDI-TOF MS, většinou „zeleně“ na dva křížky.

Z Nemocnice na Homolce, brněnské laboratoře Spadia a Nemocnice v Havlíčkově Brodě nám bylo zasláno po jednom kmenu *S. pseudintermedius/S. intermedius* (rozlišení této dvojice taxonů neumí ani hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a jsou zapotřebí podrobnější genetické

metody). Tyto dva druhy jsou veterinárního původu, nejčastěji u psů, u člověka mohou být izolovány obvykle po kontaktu se psem.

### KOAGULÁZA NEGATIVNÍ STAFYLOKOKY

Koaguláza negativní stafylokoky (KNS) jsou dnes už jednoznačně považované za podmíněné patogeny, které mohou u imunitně oslabeného člověka vyvolat stejné onemocnění, jaké bývá vyvoláno druhem *S. aureus* (výjimkou jsou toxikózy). Týká se to především 3 kategorií: imunitně nebo většinou oslabených osob, intravenózních narkomanů a pacientů se zavedenými nebo implantovanými pomůckami (intravenózní katetry atd.).

K identifikaci se dnes používá především metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, která většinu stafylokokových druhů umí určit velice dobře.

V roce 2021 jsme dostali **45 kmenů KNS**, které jsme zařadili do 13 druhů, resp. poddruhů. Nejčastější byl *S. pragensis*, který bývá – aspoň podle našich zkušeností – často izolován z infekcí uro-genitálního traktu (**tabulka 2**).

### ZMĚNY V TAXONOMII RODU *STAPHYLOCOCCUS*

V roce 2021 přibýly 6 nových druhů stafylokoků, z nichž dva jsou koaguláza pozitivní, ostatní KNS. Angličtí bakteriologové z města Bath popsali dva druhy, které izolovali od chovaných netopýřů. Pojmenovali je *S. lloidii* (podle veterinárního mikrobiologa D. H. Lloyda) a *S. durrellii* (podle přírodovědce G. Durrella, který založil ZOO v Jersey, kde jsou netopýři chováni). Tyto stafylokoky jsou fylogeneticky

**Tabulka 2: Počty identifikovaných kmenů KNS v NRL/St v roce 2021 (celkem 45 kmenů)**

Č.	<i>Staphylococcus</i>	počet
1	<i>S. pragensis</i>	15
2	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>	7
3	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i>	5
4	<i>S. epidermidis</i>	3
5	<i>S. haemolyticus</i>	3
6	<i>S. lugdunensis</i>	3
7	<i>S. croceilyticus</i>	3
8	<i>S. felis</i>	1
9	<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	1
10	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	1
11	<i>S. saccharolyticus</i>	1
12	<i>S. warneri</i>	1
13	<i>S. sp.</i>	1

příbuzní *S. kloosii*, konvenčními metodami je nelze ale identifikovat. Popis je založen především na celogenomové sekvenaci [4].

Další dva KNS popsali skotští taxonomové z Edinburghu od zdravých domácích psů. Z opakovaných stěrů různých míst (nozdry, axily, třísla, perineum) izolovali *S. caledonicus* (Caledonia – Skotsko). Fylogeneticky nejbližší je *S. devriesei*, který byl popsán u krav. Druhým je *S. canis* (lat. pes), který je nejbližší kočičímu druhu *S. felis* [5].

Další dva nové druhy pocházejí z humánního klinického materiálu. *S. roterodami* byl popsán na základě genetických vlastností jednoho kmene, izolovaného na Lékařské Univerzitě v holandském Rotterdamu ze zhnisané rány na noze Holanďana, který se vrátil z pobytu na ostrově Bali. Spadá do komplexu *S. aureus* (má pozitivní test volné i vázané koagulázy) a podobně jako *S. argenteus* nejde od něj klasickými konvenčními testy oddělit [6].

Posledním novým druhem popsáným v r. 2021 je *S. singaporensis* popsáný taxonomy (jak název napovídá) na univerzitní nemocnici v Indonésii v Singapuru. Opět patří do komplexu *S. aureus*, má pozitivní test volné koagulázy i latexový test s kity Staphaurex a Pastorex. Popis byl proveden na základě vlastností 6 kmenů, které se při studiu 43 kmenů komplexu *S. aureus* pomocí WGS a dalších genetických metod jasně oddělily [7]. Je příjemné poznamenat, že autoři zmiňují, že *S. aureus* má „sesterský druh“ *S. simie*, který byl poprvé českými bakteriology izolován od jihoamerických opiček kotul veverovitý v ZOO na Svatém kopečku v Olomouci [8].

## SPOLUPRÁCE S JINÝMI PRACOVIŠTI

V loňském roce jsme opět spolupracovali s Českou národní sbírkou typových kultur (CNCTC) v CEM SZÚ.

Jednak na upřesňující identifikaci starých sbírkových kultur a dále při poskytování kmenů a vyhodnocení výsledků EHK – Bakteriologická diagnostika.

I v loňském roce pokračovala v problematice koaguláza negativních stafylokoků intenzivní spolupráce s Českou sbírkou mikroorganismů (CCM) a s Ústavem experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Podařilo se nám dokončit popis nového druhu stafylokoka, který byl pojmenován *Staphylococcus rattii* (*Rattus norvegicus* = lat. potkan obecný). *S. rattii* spadá do skupiny veterinárních druhů *S. intermedius/S. hyicus*, ale je koaguláza negativní. Typový kmen byl izolován z nozder zdravého potkana při skříninku v Oddělení biomedicíny a welfare pokusných zvířat Centra toxikologie a zdravotní bezpečnosti SZÚ [9].

## Poděkování

Autoři děkují pracovníkům České sbírky mikroorganismů (CCM) a Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně za úžasnou mnohaletou spolupráci ve stafylokokové problematice.

## LITERATURA

- [1] Petráš P, Hutníková R, Kečláková J, Měřínská T. Případy PVL pneumonie registrované v NRL pro stafylokoky CEM SZÚ 2015 – 2021. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(11): 374–376
- [2] Petráš P, Hutníková R, Kečláková J, Měřínská T. Stafylokokový syndrom toxického šoku v České republice za 36 let sledování v NRL pro stafylokoky CEM. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2019; 28(10): 404–408
- [3] Petráš P, Kečláková J, Hutníková R. Sledování enterotoxin pozitivních kmenů *Staphylococcus aureus* v NRL pro stafylokoky v letech 1972 – 2020. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(1): 17–22
- [4] Fountain K, Gibbon MJ, Loeffler A, Feil EJ. Closed genome sequences of *Staphylococcus lloydii* sp. nov. and *Staphylococcus durrellii* sp. nov. isolated from pative fruit bats (*Pteropus livingstonii*). *IJSEM* 2021; 71(3): 004715
- [5] Newstead LL, Harris J, Goodbrand S., et al. *Staphylococcus caledonicus* sp. nov. and *Staphylococcus canis* sp. nov. isolated from healthy domestic dogs. *IJSEM* 2021; 71(7): 004878
- [6] Schutte AHJ, Strepis N, Zandijk WHA, et al. Characterization of *Staphylococcus roterodami* sp. nov., a new species within the *Staphylococcus aureus* complex isolated from human foot infection. *IJSEM* 2021; 71(9): 004996
- [7] Chew KL, Octavia S., Lai D, et al. *Staphylococcus singaporensis* sp. nov., a new member of the *Staphylococcus aureus* complex, isolated from human clinical specimens. *IJSEM* 2021; 71(10): 005067
- [8] Pantůček R, Sedláček I, Petráš P, et al. *Staphylococcus simiae* sp. nov., isolated from South American squirrel monkey. *IJSEM* 2005; 55(5): 1953–1958
- [9] Kovařovic V, Sedláček I, Petráš P, et al. *Staphylococcus rattii* sp. nov. isolated from a lab rat. *Pathogens* 2022; 11(1): 10.3390/pathogens11010051

Petr Petráš, Radoslava Hutníková,  
Michaela Šimková, Hana Pejšová  
NRL pro stafylokoky CEM SZÚ