

Laboratorní diagnostika v NRL pro stafylokoky CEM – SZÚ v roce 2018

Laboratory diagnostics in the National Reference Laboratory for Staphylococci, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, in 2018

Jana Kekláková, Radoslava Hutníková, Petr Petráš

Souhrn • Summary

Hlavní náplní činnosti Národní referenční laboratoře pro stafylokoky CEM, SZÚ bylo i v roce 2018 v rámci zajištění surveillance stafylokokových infekcí vyšetřování kmenů stafylokoků z humánního klinického materiálu, které byly do NRL zaslány z bakteriologických pracovišť z celé České republiky. Celkem to bylo 1 246 kmenů, převážně druhu *Staphylococcus aureus*. U kmenů byla metodou PCR zjišťována přítomnost genů kódujících především Pantonův-Valentinův leukocidin, toxin syndromu toxického šoku, exfoliatiny a enterotoxiny. Informace o produkci faktorů virulence jsou důležité pro ošetřujícího lékaře ke správnému stanovení diagnózy a tedy i vhodné terapie. Pomohli jsme při řešení několika hromadných výskytů stafylokokových onemocnění na základě zjištění shodných charakteristik původců. Asi desetina zaslaných kmenů byly koaguláza-negativní stafylokoky. U těchto podmíněných patogenů jsme metodou hmotnostní spektrometrie kmeny identifikovali, resp. konfirmovali identifikaci určenou již v terénních laboratořích.

*The main focus of the National Reference Laboratory for Staphylococci (NRL) in 2018 was again on the investigation of staphylococcal strains from human clinical specimens referred to it by bacteriological laboratories from all over the Czech Republic within the surveillance of staphylococcal infections. In total, 1 246 strains mostly of the species *Staphylococcus aureus* were analysed. The strains were screened by PCR for the genes encoding Pantone-Valentine leucocidin, toxic shock syndrome toxin, exfoliatins, and enterotoxins. Data on the production of virulence factors are helpful in determining the right diagnosis and effective treatment. The NRL contributed to the investigation of several staphylococcal outbreaks by establishing the characteristics of the pathogens. About one in ten strains referred to the NRL were coagulase negative staphylococci. These opportunistic pathogens were identified or confirmed, after previous identification by field laboratories, by mass spectrometry.*

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2019; 28(2): 59–63

Klíčová slova: laboratorní diagnostika, stafylokoky, Pantonův-Valentinův leukocidin, TSST-1

Key words: laboratory diagnostics, staphylococci, Pantone-Valentine leucocidin, TSST-1

Národní referenční laboratoř pro stafylokoky CEM SZÚ (NRL/St) se v roce 2018 věnovala v rámci zajištění surveillance stafylokokových infekcí vyšetřování kmenů stafylokoků izolovaných z humánního klinického materiálu. Celkem bylo za loňský rok zasláno 1 246 kmenů stafylokoků z bakteriologických laboratoří celé naší republiky. Nejvíce kmenů jsme dostali z Oddělení lékařské mikrobiologie v Hořovicích, dále z Odd. klinické mikrobiologie a ATB centra VFN v Praze, z Ústavu lékařské mikrobiologie FN v Praze Motole a z Odd. klinické mikrobiologie a ATB střediska Nemocnice Strakonice. Bylo nám zasláno i 36 kmenů z jedné slovenské nemocnice. Podle odebraného materiálu byly nejčastěji zastoupeny kmeny z různých kožních infekcí a z hemokultur.

V celém souboru bylo 1 168 kmenů *Staphylococcus aureus*, které nám byly zaslány ke zjištění faktorů virulence,

tj. především produkce toxinů. V NRL/St v současnosti zjišťujeme přítomnost genů kódujících příslušný toxin metodou PCR.

PANTONŮV-VALENTINŮV LEUKOCIDIN (PVL)

Tento velice nebezpečný cytotoxin se uplatňuje při infekcích kůže nebo měkkých tkání, jako jsou furunkly, kožní abscesy, nekrotické kožní infekce a nehojící se pístěle. Jeho produkce byla zjištěna u 104, tj. 8,9 % ze sledovaných kmenů. Tato hodnota je vyšší, než se udává v běžné populaci: do NRL/St jsou zasílány kmeny, u nichž je pravděpodobnost toxigenity vyšší. Život ohrožující jsou především abscedující pneumonie, které probíhají velice dramaticky a je u nich popisována vysoká smrtnost. Onemocnění se často vyskytují u zdravých jedinců po prodělané chřipce, nebo jiném virovém respiračním infektu.

V r. 2018 jsme dostali 5 kmenů, které pocházely z abscedujících pneumonií a u kterých jsme prokázali PVL. Jednalo se o pacienty v rozmezí 17–69 let, kteří prodělali několikadenní respirační virózu, po které se sekundárně rozvinula oboustranná pneumonie. Po několika hodinách hospitalizace 4 z nich umírají (viz tabulka 1).

Tabulka 1: Případy PVL pneumonie zaznamenané v NRL/St v roce 2018

č	pohlaví	věk (let)	odebraný materiál	nemocnice	hospitalizace	konec?	MRSA/ MSSA
1	muž	47	sputum	Tábor	5 hodin	úmrtí	MSSA
2	muž	69	tracheální aspirát	Brno	7 hodin	úmrtí	MSSA
3	žena	40	výpotek	Praha – VFN	minim. 14 dní	přežití	MRSA
4	muž	17	plicí (sekce)	Hradec Králové	10 hodin	úmrtí	MSSA
5	muž	59	hemokultura, sputum	Ostrava	asi 3 hodiny	úmrtí	MSSA

Od roku 2007, kdy metodou PCR zjišťujeme přítomnost genů kódujících produkci toxinu PVL, máme zaznamenáno 21 případů tohoto závažného onemocnění. Z nich – přes veškerou snahu lékařů, většinou na oddělení ARO, 12 skončilo úmrtím. V 5 případech byl původcem kmen MRSA, ve zbylých to byl kmen k oxacilinu citlivý.

Rozpoznání stafylokokové etiologie a zjištění, zda kmen *S. aureus* je pozitivní na PVL, je zásadní informací pro ošetřujícího lékaře ke stanovení správné diagnózy a tím i odpovídající terapie. Jako lék volby se v těchto případech doporučuje linezolid, který inhibuje syntézu PVL, má dobrý průnik do plicního parenchymu a je účinný i na kmeny MRSA. U většiny přeživších pacientů z našeho souboru bylo toto antibiotikum k terapii použito. V NRL/St jsme při optimálních podmínkách schopni zjistit tuto vlastnost původce do 4 hodin po dodání izolovaného kmene na petriho misce.

TOXIN SYNDROMU TOXICKÉHO ŠOKU TSST-1

Kmeny *S. aureus* s produkcí TSST-1 jsou původcem dalšího závažného onemocnění, stafylokokového syndromu toxického šoku (STŠ). Toto onemocnění je charakterizováno především čtyřmi příznaky: náhlým zvýšením teploty (> 38,9 °C), skarlatinoformním nebo jiným typem vyrážky,

poklesem krevního tlaku a následným olupováním vrchních vrstev pokožky končetin, obličeje i trupu. Kromě těchto základních příznaků se může vyskytnout řada dalších systémových abnormalit (zvracení, průjem, překrvení sliznic, bolest svalů, poruchy CNS, aj.). Onemocnění se vyskytuje ve dvou formách. Menstruační syndrom toxického šoku je spojen s menses a používáním vaginálních tampónů. Nemenstruační forma je komplikací jakéhokoliv jiného stafylokokového onemocnění. Kromě kmenů *S. aureus* s produkcí TSST-1 mohou být etiologickým agens i kmeny *S. aureus* produkující pouze některý z typů enterotoxinů.

V roce 2018 nám bylo v souvislosti se STŠ zasláno 14 kmenů, kdy jsme mohli prokázat schopnost produkovat TSST-1 (v 8 případech v kombinaci s enterotoxinem A). U 10 pacientek se jednalo o menstruační formu STŠ, u všech bylo v anamnéze uvedeno používání vaginálních tampónů. Ve zbývajících 4 případech byl STŠ komplikací pyogenních stafylokokových onemocnění, kdy měl kmen *S. aureus* možnost se namnožit, naprodukovat toxin a způsobit stejné onemocnění jako u žen s menzes. Zajímavý byl případ u 18letého mladíka, kterému zhnisala rána po operaci nosního septa. Nos byl tamponován a po 24 hodinách došlo u pacienta k rozvoji syndromu toxického šoku se všemi příznaky jako u klasické menstruační formy (tabulka 2).

Tabulka 2: Případy Syndromu toxického šoku registrované v NRL/St v roce 2018

č.	pohlaví	věk (let)	nemocnice	datum	forma	odebraný materiál	TSST-1	enterotoxin
1	žena	21	Plzeň	I. 2018	menstruační	tampon	TSST-1	A
2	žena	17	Prostějov	I. 2018	menstruační	tampon	TSST-1	–
3	žena	14	Plzeň	II. 2018	menstruační	tampon	TSST-1	A
4	žena	20	Č. Budějovice	VI. 2018	menstruační	tampon	TSST-1	A
5	žena	15	Č. Budějovice	VI. 2018	menstruační	pochva	TSST-1	–
6	žena	15	Olomouc	VI. 2018	menstruační	moč	TSST-1	–
7	žena	35	Hradec Králové	VI. 2018	menstruační	pochva	TSST-1	A
8	žena	26	Č. Budějovice	IX. 2018	menstruační	kroužek IUD	TSST-1	A
9	muž	9	Praha – FTN	X. 2018	pyodermie	stěr z buly na kolenu PDK	TSST-1	A
10	muž	0	Hradec Králové	XI. 2018	pyodermie	absces na hýždi	TSST-1	A
11	žena	4	Hradec Králové	XI. 2018	popálenina	zhnisaná popálenina	TSST-1	–
12	muž	18	Praha – Homolka	XI. 2018	pooperační RI	stěr rány v nose	TSST-1	–
13	žena	16	Č. Budějovice	XII. 2018	menstruační	hemokultura	TSST-1	A
14	žena	21	Praha – ÚVN	XII. 2018	menstruační	pochva	TSST-1	–

EXFOLIATIN (EPIDERMÁLNÍ TOXIN)

Kmeny *S. aureus* s produkcí exfoliatinu jsou etiologickým agens epidermolytických infekcí u dětí, především puchýřnatého onemocnění novorozenců (PON). Je to obávané onemocnění v porodnicích, většinou se jedná o hromadné výskyty. V nejtěžší formě vede až k život ohrožujícímu syndromu opášené kůže (Staphylococcal Skin Scaled Syndrom – SSSS) s vysokou smrtností. Epidermální infekce se může vyskytnout i u dospělých pacientů ve formě bulózního impetiga. U lidí se vyskytují tři antigenní typy A, B a D.

V loňském roce jsme prokázali pozitivitu na exfoliatiny u 92 kmenů (8,1 %) ze sledovaných. Nejčastěji se jednalo o kmeny ze stěrů puchýřků u PON, a dále různé kožní afekce. Pomohli jsme řešit dvě epidemie PON, jednu v jihočeské nemocnici a jednu na Slovensku. Původcem obou epidemií byly kmeny s produkcí exfoliatinu A. Z různých lokalit jsme dostali 5 kmenů s produkcí exfoliatinu B, 10 kmenů s kombinací exfoliatinu A + B a z jedné středočeské nemocnice 7 kmenů *S. aureus* s produkcí exfoliatinu D.

V listopadu nám byl zaslán kmen *S. aureus*, který vyvolal mírnější průběh syndromu opášené kůže u 17měsíční dívky. Po zahájení antibiotické terapie (oxacilin + klindamycin) se ložiskové léze postupně zhojily a dívka byla po 7 dnech hospitalizace propuštěna do domácího léčení. Stejný kmen s produkcí exfoliatinu A byl izolován z impetiga její matky.

ENTEROTOXINY

Stafylokokovou enterotoxikózu vyvolávají enterotoxinogenní kmeny *Staphylococcus aureus*.

Vlastní příčina, samotný toxin, je poměrně jednoduchý polypeptid (rel. mol. hmotnost cca 30 kDa), který je díky jednoduché chemické struktuře velice chemorezistentní i termorezistentní. Stafylokokový enterotoxin je řazen do skupiny superantigenů. Dnes je známo 24 antigenních typů, které lze rozdělit do 3 skupin. V první je 5 „klasických“ enterotoxinů A, B, C, D a E. Podle našich výsledků nejčastěji vyvolávají enterotoxikózu kmeny s produkcí typu A, dále D, C a B. Kmeny produkující typ E jsou velice vzácné, za celou dobu 46 let evidujeme jedinou menší epidemii u jihočeského vojenského útvaru. Kmeny s produkcí dalších 6 typů (G, H, I a R, S, T) jsme jako agens v literatuře popisovaného průjmového onemocnění v naší laboratoři dosud nezachytili. Poslední skupinu tvoří tzv. „enterotoxiny-like“ (SE/IJ až SE/IY), u kterých zatím nebyly emetické aktivity popsány [1, 2].

V červnu jsme pomáhali epidemiologům řešit alimentární intoxikaci v Hradci Králové pod označením „kebabová epidemie“. Celkem bylo evidováno 82 postižených, kteří konzumovali tortillu s kuřecím masem ve stejné provozovně rychlého občerstvení. Průběh onemocnění byl středně těžký a vyžádal si hospitalizaci 44 osob. Do NRL/St bylo celkem zasláno 31 kmenů *S. aureus*: 15 kmenů od pacientů, 8 kmenů z potravin, 5 kmenů od personálu

a 3 kmeny z prostředí inkriminované provozovny. Většina těchto kmenů byla pozitivní na enterotoxin A. Kmeny byly podrobeny makrorestrikční analýze s využitím pulzní gelové elektroforézy. Bylo potvrzeno, že epidemie byla způsobena shodným kmenem *S. aureus* s produkcí enterotoxinu A. Makrorestrikční analýza je genotypová metoda vhodná k objasnění epidemiologických souvislostí v určitém hromadném výskytu onemocnění.

KOAGULÁZA-NEGATIVNÍ STAFYLOKOKY

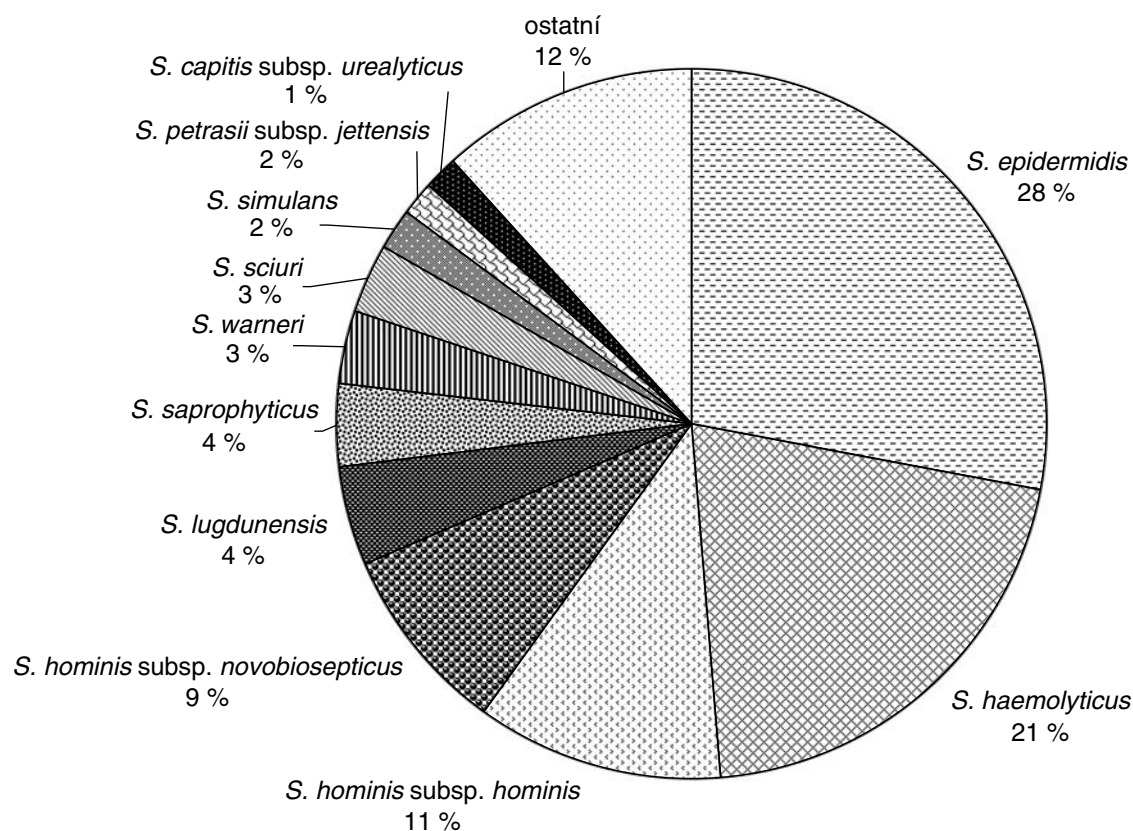
Koaguláza-negativní stafylokoky (KNS) jsou podmíněnými patogeny, které mohou u oslabeného člověka vyvolat prakticky jakékoliv onemocnění (s výjimkou toxikóz), jaké vyvolává druh *S. aureus*. Zejména u imunitně nebo věkem oslabených pacientů, u dlouhodobě hospitalizovaných pacientů a u intravenózních narkomanů. Časté jsou infekce krevního řečiště, zvláště v souvislosti se zdravotní péčí. Původci bývají rezistentní k řadě antibiotik. Důležitým faktorem virulence je u nich schopnost produkovat sliz, který jim dovolí vytvořit bakteriální biofilm. Ten jim umožní uchycení na různých přírodních i umělých povrchích a do značné míry je chrání i před působením antibiotik a před imunitní reakcí pacienta.

V současnosti existuje 52 různých druhů a poddruhů KNS, z nichž více jak polovinu lze zachytit v humánním klinickém materiálu. Podle našich dlouhodobých tabulek jsou to nejčastěji kmeny *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* a dva poddruhy *S. hominis*, subsp. *hominis* a subsp. *novobiosepticus* (graf 1). V identifikaci stafylokoků nám velice pomáhá MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Většinu stafylokokových druhů umí určit velice dobře, někdy je k přesné identifikaci zapotřebí použít i klasické fenotypové, nebo genotypové metody.

Řada terénních laboratoří hmotnostní spektrometrii používá, takže počet kmenů KNS, které jsou k nám zasílány k identifikaci, výrazně poklesl. V loňském roce jsme dostali 91 kmenů, které jsme zařadili do 18 druhů, resp. poddruhů. Nejčastěji to byly kmeny *S. petrasii* subsp. *pragensis* a subsp. *jettensis*, což je dáno tím, že kolegové vědí, že stafylokoky tohoto druhu sbíráme. Nejvíce jsme jich dostali z Oddělení bakteriologie a mykologie ZÚ Ostrava, kdy nám posílají kmeny dokonce osekvenované, z Oddělení klinické mikrobiologie nemocnice v Karlových Varech a OKM a ATB střediska Nemocnice Strakonice. Rádi bychom Vás touto cestou požádali o zasílání kmenů, zejména těch, jež při identifikaci hmotnostní spektrometrií vyjdou při využití standardní databáze jako *Staphylococcus* sp[1]. Na dalším místě byly v roce 2018 kmeny *S. haemolyticus* (graf 2).

Nejzajímavějšími izoláty byly dva kmeny druhu *S. condimenti* (lat. condimentum = koření). Původní kmeny v popisné práci byly izolovány ze směsi k přípravě sojových omáček a byly považovány za nepatogenní. V roce 2014 byl poprvé popsán případ katétrové

Graf 1: Nejčastější druhy/poddruhy koaguláza-negativních stafylokoků izolované v ČR z humánního materiálu a identifikované v NRL/St v letech 1998–2018 (n=4559)



sepsy vyvolané tímto koaguláza-negativním stafylokokem u 17leté dívky v Japonsku [3]. Rovněž v naší laboratoři jsme mohli v r. 2017 potvrdit kmen tohoto druhu, který byl původcem sepsy u onkologického pacienta [4]. V loňském roce nám *S. condimenti* poslali kolegové z Oddělení klinické mikrobiologie Nemocnice na Bulovce a z Oddělení bakteriologie a mykologie Zdravotního ústavu Ostrava. První byl z hnisu píštěle 81letého muže, druhý z hemokultury od 78letého pacienta s dušností. Raritní byly i tři „kočičí“ kmeny *S. felis*. Z humánního materiálu je nám poslali bakteriologové z Oddělení klinické mikrobiologie a parazitologie Oblastní nemocnice v Příbrami a z pražského Aeskulabu.

SPOLUPRÁCE S JINÝMI PRACOVÍŠTI

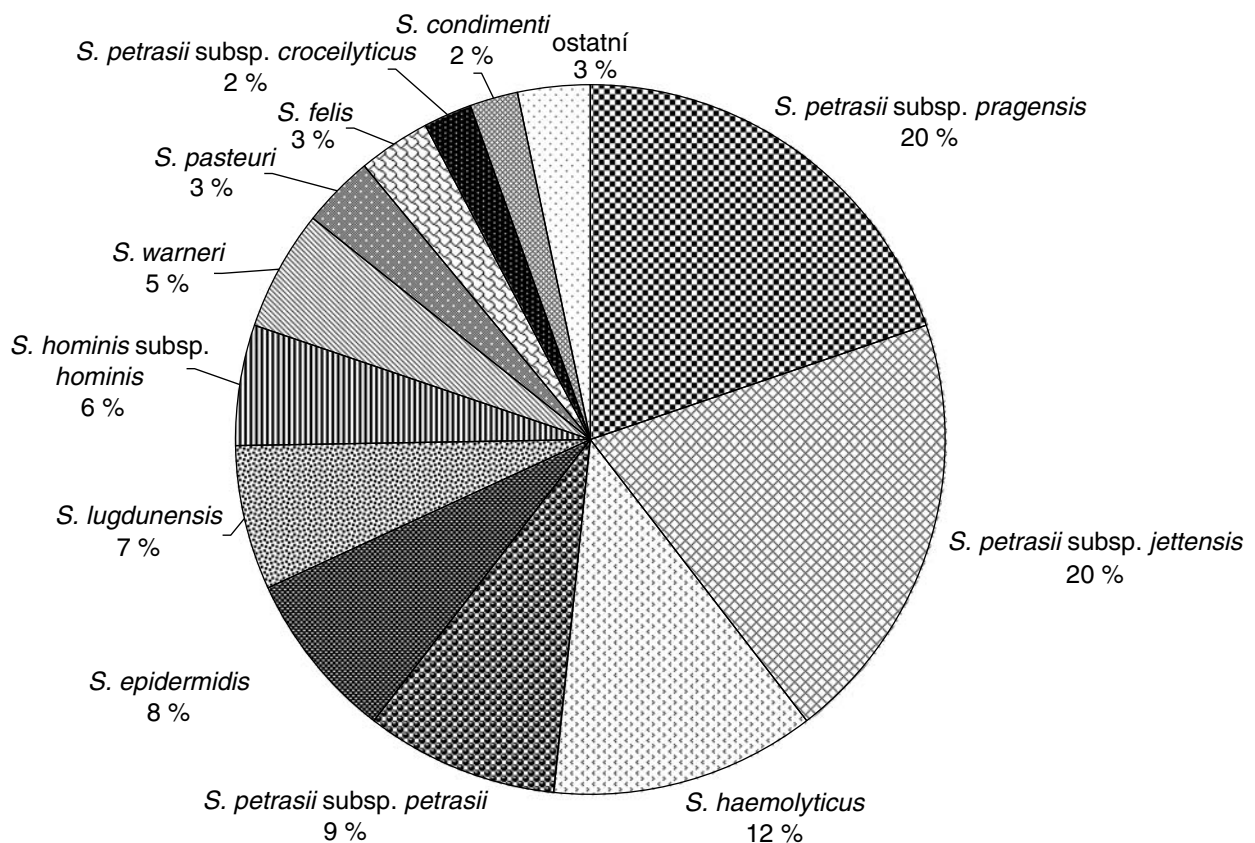
V loňském roce jsme úzce spolupracovali s NRL pro antibiotika v problematice přesného určení kmenů, které byly dosud v České národní sbírce typových kultur (CNCTC) a v laboratorní sbírce NRL/St zařazeny jako *S. intermedius*. V roce 2005 byl popsán *S. pseudintermedius*, který je fenotypovými metodami neodlišitelný. Podle literárních zdrojů patří velká většina dříve uváděných kmenů *S. intermedius* do nového druhu *S. pseudintermedius*. To se potvrdilo i v této studii, kdy ze souboru 59 kmenů, z nichž 44 bylo humánního původu, byly metodou restriční analýzy RFLP potvrzeny pouze dva kmeny jako pravý *S. intermedius*, všechny ostatní se

zařadily do druhu *S. pseudintermedius* [5]. Je to prakticky jediný další koaguláza-pozitivní stafylokok, který může být v humánním klinickém materiálu zachycen. Nejčastěji to bývá ve zhnisané ráně po kousnutí psem.

Intenzivní spolupráce v problematice koaguláza-negativních stafylokoků pokračovala i s brněnskou sbírkou kultur (CCM) a s Ústavem experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity. Podíleli jsme se na charakterizaci dvou kmenů, které byly izolovány z abiotického prostředí kamenné drtě a písku na ostrově Jamese Rosse v Antarktidě. Novobiocin-rezistentní, oxidáza-negativní stafylokoky jsou podle fylogenetických vlastností nejbližší druhu *S. saprophyticus*. Kmeny byly podrobeny fenotypovým i genotypovým analýzám a bylo potvrzeno, že se jedná o dosud nepopsaný druh, který byl nazván *S. edaphicus* (řecky „edaphos“ = půda). Zajímavým zjištěním byla rezistence těchto kmenů ke všem testovaným betalaktamovým antibiotikům. *S. edaphicus* je již desátý stafylokok popsán českými taxonomy [6].

S brněnskými pracovišti jsme spolupracovali i na charakterizaci 7 kmenů nových makrokoků. Rod *Macroccoccus* patří do čeledi *Staphylococaceae*, v roce 1998 se od stafylokoků vyčlenil. Makrokoky se nacházejí obvykle na kůži různých druhů zvířat (koňů, krav, lam a psů), ale byly již zachyceny v humánním klinickém materiálu. Byly u nich zjištěny geny rezistence *mecA* nebo

Graf 2: Druhy/poddruhy koaguláza-negativních stafylokoků izolované v ČR z humánního materiálu a identifikované v NRL/St v roce 2018 (n=91)



mecC a nově byl popsán gen *mecD*. Fenotypovými i genotypovými studii se soubor kmenů rozdělil do několika klastrů, které reprezentují nové druhy: *Macroccoccus goetzii*, *M. epidermidis*, *M. bohemicus*, a nový poddruh *Macroccoccus caseolyticus* subsp. *hominis*. Spolupráce byla završena otištěním publikace v časopise *Frontiers in Microbiology* [7].

LITERATURA

- Hennekinne JA, Ostin A, Guillier F, et al. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized? *Toxins*. 2010; 2 (8): 2106–2116
- Fisher E L, Otto M, Cheung G Y C. Basis of Virulence in Enterotoxin-Mediated Staphylococcal Food Poisoning. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 436.
- Misawa Y, Yoshida A, Okugawa S, Moriya K. First reported case of *Staphylococcus condimentii* infection associated with catheter-related bacteraemia. *New Microbes New Infect.* 2014; 3: 18–20.
- Vítková I, Lengerová M, Kratochvíl M. *Staphylococcus condimentii* jako původce sepse u oslabeného pacienta – kazuistika. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2017; 26(4): 150–152.
- Mališová L, Šafránková R, Kekláková J, et al. Correct species identification (reclassification in CNCTC) of strains of *Staphylococcus intermedius* – group can improve an insight into their evolutionary history. *Folia Microbiol.* 2019; 64 (2): 231–236. doi.org/10.1007/s12223-018-0647-7.
- Pantůček R, Sedláček I, Indráková A, et al. *Staphylococcus edaphicus* sp. nov., Isolated in Antarctica, Harbors the *mecC* Gene and Genomic Islands with a Suspected Role in Adaptation to Extreme Environments. *Appl Environ Microbiol.* 2018; 84: e01746–17.
- Mašláňová I, Wertheimer Z, Sedláček I, et al. Description and comparative genomics of *Macroccoccus caseolyticus* subsp. *hominis* subsp. nov., *Macroccoccus goetzii* sp. nov., *Macroccoccus epidermidis* sp. nov., and *Macroccoccus bohemicus* sp. nov., novel macrococci from human clinical material with virulence potential and suspected uptake of foreign DNA by natural transformation. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1178.

Podpořeno částečně MZ ČR – RVO („Státní zdravotní ústav – SZÚ, 75010330“).

Jana Kekláková, Radoslava Hutníková, Petr Petráš
NRL pro stafylokoky CEM, SZÚ