

Sledování klinických kmenů *Staphylococcus aureus* pozitivních na exfoliatin D z let 2004 – 2020 v NRL pro stafylokoky CEM SZÚ

Detection of exfoliative toxin D production in clinical strains of *Staphylococcus aureus* from 2004–2020 at the National Reference Laboratory for Staphylococci, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health

Petr Petráš, Tereza Měřínská, Radoslava Hutníková, Jana Kekláková

Souhrn • Summary

V příspěvku prezentujeme zkušenosti NRL pro stafylokoky CEM SZÚ (NRL/St) se sledováním genu *etd*, kódujícího exfoliatin typu D ve dvou souborech kmenů *S. aureus*. První zahrnoval 5 449 kmenů čerstvě izolovaných z klinického materiálu zaslaných do NRL/St v letech 2015–2020. Přítomnost *etd* genu byla potvrzena u 42 (0,8 %) kmenů. Druhým souborem byly kmeny z laboratorní sbírky NRL/St, v které bylo v letech 2004–2014 zakonzervováno 507 kmenů pozitivních na Pantonův-Valentinův leukocidin (PVL). V tomto souboru byla pozitivita *etd* zjištěna u 16 (3,2 %) kmenů.

Dále byly u těchto kmenů sledovány geny pro exfoliatiny A a B, základní enterotoxiny A–D, toxin syndromu toxického šoku TSST-1, PVL a *mecA* gen kódující rezistenci k oxacilinu. V obou souborech nepocházela naprostá většina kmenů z puchýřů, jak je to obvyklé u kmenů s produkcí exfoliatinů A a B, ale z jiného klinického materiálu. Nejčastěji to byly zhnisané rány a abscesy.

The article presents the experience of the National Reference Laboratory for Staphylococci, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health (NRL/St) with the detection of the *etd* gene encoding exfoliative toxin D in two sets of *S. aureus* strains. Set 1 included 5 449 strains freshly isolated from clinical specimens referred to the NRL/St in 2015–2020. The *etd* gene was confirmed in 42 (0.8%) strains. Set 2 consisted of 507 Pantone-Valentine leukocidin (PVL) producing strains from 2004–2014 available in the NRL/St collection. The *etd* gene was detected in 16 (3.2%) of them.

Both sets were also tested for the genes encoding exfoliative toxins A and B, basic enterotoxins A–D, toxic shock syndrome toxin TSST-1, PVL, and *mecA* encoding resistance to oxacillin. Most strains in both sets came from specimens other than blisters unlike exfoliative toxin A and B producing strains and were most often collected from purulent wounds and abscesses.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2021; 30(10): 327–330

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, exfoliatin D, toxigenita, faktory virulence

Key words: *Staphylococcus aureus*, exfoliative toxin D, toxigenicity, virulence factors

ÚVOD

Exfoliatin (též epidermální toxin) je důležitým faktorem virulence asi u 5 % kmenů *Staphylococcus aureus* izolovaných z humánního klinického materiálu [1]. Kmeny, které ho produkují, vyvolávají epidermální infekce. Nejčastější je puchýřnaté onemocnění novorozenců (pemhigus neonatorum – PON). Vyskytuje se hlavně u kojenců, ale i u mladších dětí, obvykle do 5 let věku. Projevuje se výsevem drobných puchýřů především v tříslech a v podpaží, při komplikacích dochází ke konjunktivitidám, omfalitidám a panariciím.

Vzácně se může tato infekce vyskytnout ve své nejhorší formě, kdy dochází k syndromu opařené kůže (Staphylococcal Skin Scalded Syndrome – SSSS). Tato život ohrožující dětská infekce je též označován jako Ritterova choroba podle pediatra G. R. von Rittershaina, který první popsal v r. 1878 puchýřnatá onemocnění u kojenců v dětské nemocnici nalezince v Praze na Karlově [2]. Onemocnění začíná scarlatinoformním exantémem, následuje výsev puchýřů, dochází k rozsáhlým erozím a k deskvamaci vrchní vrstvy pokožky v částech na velké části těla. Toxická epidermolýza se může vyskytnout i u imunitně kompromitovaných dospělých osob ve formě bulózního impetiga. Exfoliatin pozitivní kmeny bývají izolovány také ze stěrů zhnisaných ran, z abscesů a dalšího klinického materiálu.

Exfoliatin (ET) je poměrně jednoduchý stafylokokový exoprotein, po chemické stránce je to proteolytická serinová peptidáza. Obsahuje přibližně 220 aminokyselin, relativní

Tabulka 1: Přítomnost dalších faktorů virulence u 42 kmenů *S. aureus* pozitivních na exfoliatin typu D ze souboru 5 449 klinických kmenů *S. aureus* z let 2015–2020 (metoda PCR)

ETD *)	ETA	ETB	PVL	TSST-1	En A	En B	En C	En D	MRSA #)	celkem kmenů
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28
+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	6
+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	1
+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1
+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	3
42										

*) ETD, ETA, ETB = exfoliatiny typů D, A a B; PVL = Pantonův-Valentinův leukocidin; En A, En B, En C a En D = enterotoxiny A, B, C a D
 #) Metodou PCR byla zjišťována i přítomnost genu *mecA* kódujícího rezistenci k oxacilinu a dalším beta-laktamovým antibiotikům

molekulová hmotnost je okolo 27 kDa, tj. jako u stafylokokových enterotoxinů. Cílovým místem účinku ET je *stratum granulosum*, tenká mezivrstva mezi vrchní a spodní částí pokožky. Podle některých vlastností se exfoliatiny řadí mezi superantigeny.

U druhu *S. aureus* je známo pět typů exfoliatinů, označovaných ETA, ETB, ETC, ETD a ETE.

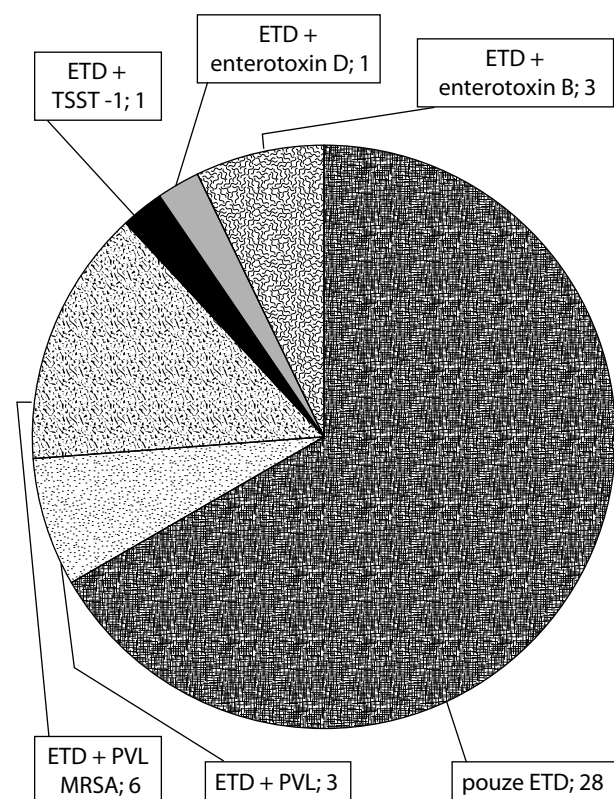
Nejdéle jsou známy typy **exfoliatiny A a B**, které byly rozpoznány v sedmdesátých letech minulého století [3, 4, 5]. Lékařské studie naznačují, že kmeny produkující ETB jsou agresivnější a relativně častěji způsobují generalizovaný

SSSS. ETB je termolabilní na rozdíl od ETA, který si zachová svou funkci i po třicetiminutovém zahřání na 60 °C [6]. Geografická distribuce je rozdílná, v Evropě a v Americe jsou mnohem častější kmeny s produkcí ETA, naopak v Japonsku převažují kmeny s ETB [6]. Kmeny mohou produkovat oba tyto typy najednou [7, 8].

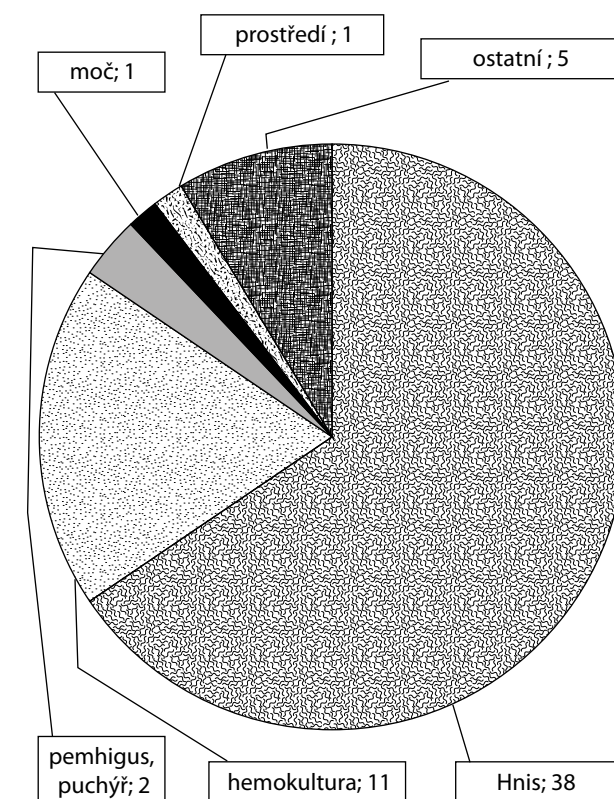
Exfoliatin C byl zjištěn v r. 1994 jako původce erozivního onemocnění kůže u koně postiženého flegmónou [9]. Je schopen vyvolat syndrom opařené kůže u jednodenních kuřat [6].

Exfoliatin D, kterému se věnujeme v tomto příspěvku, byl popsán japonskými bakteriology u kmenů *S. aureus*

Graf 1: Přítomnost dalších faktorů virulence u 42 kmenů *S. aureus* pozitivních na exfoliatin typu D (ETD) ze souboru 5 449 klinických kmenů *S. aureus* z let 2015–2020 (metoda PCR)



Graf 2: Distribuce kmenů *S. aureus* pozitivních na exfoliatin typu D celkem z obou sledovaných souborů podle materiálu



humánního klinického materiálu v r. 2002 [10]. Gen *etd*, který kóduje jeho produkci, je lokalizován na ostrovu patogenity v chromozomu společně s genem pro další exoprodukt EDIN-B. Sekvence aminokyselin ETD vykazuje 40% homologii s ETA a 59% s ETB. Podobně jako ETB je i ETD termolabilní. Již v prvních studiích se zjistilo, že kmeny s produkcí ETD, byly izolovány spíše ze zhnisaných ran než z puchýřů, jak je to obvyklé u producentů ETA a ETB.

Posledním dosud rozpoznaným je **exfoliatin E** z roku 2019. Kmeny *S. aureus*, které ho produkují, vyvolávají mastitidy u ovcí [11].

Produkce exfoliatinů není výlučnou vlastností kmenů *S. aureus*, jsou známy exfoliatiny u dalších koaguláza pozitivních kmenů *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* a *S. hyicus* [např. 12]. V r. 2020 byla zjištěna brněnskými bakteriologiy přítomnost genu kódujícího exfoliatin u kmenů *S. delphini* izolovaných od tučňáků v Antarktidě [13].

MATERIÁL

Kmeny *Staphylococcus aureus*

Ve studii jsou zpracovány výsledky sledování přítomnosti genu *etd* u 5449 kmenů *S. aureus*, které byly zaslány do NRL pro stafylokoky CEM SZÚ (NRL/St) ke zjištění toxigenity z 90 bakteriologických pracovišť celé naší republiky v letech 2015–2020. Druhým souborem, v kterém byla přítomnost genu *etd* zjišťována, bylo 507 kmenů *S. aureus* pozitivních na Pantónův-Valentinův leukocidin (PVL) z laboratorní kryosbírký NRL/St, které byly zakonzervovány v letech 2004–2014.

METODY

Identita kmenů *S. aureus* byla ověřena testem na zjištění produkce hyaluronidázy [14] a PCR reakcí detekující přítomnost genu *nuc*, který kóduje produkci termostabilní nukleázy. Od roku 2011 identifikujeme stafylokokové kmeny také metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, která dokáže kmeny *S. aureus* velice spolehlivě potvrdit.

Přítomnost genu *etd*, kódujícího exfoliatin D, byla detekována multiplex PCR reakcí [15]. Podobně byla zjišťována přítomnost genů pro další dva exfoliatiny ETA a ETB, pro základní enterotoxiny typů A, B, C a D, toxin syndromu toxického šoku TSST-1 a Pantónův-Valentinův leukocidin (PVL). Dále byl sledován *mecA* gen, kódující rezistenci k oxacilinů (původně k meticilinů) a dalším β -laktamovým antibiotikům u meticilin-rezistentních kmenů *S. aureus* (MRSA).

Tabulka 2: Přítomnost genu *etd* kódujícího exfoliatin D a *mecA* genu u 507 kmenů *S. aureus* pozitivních na Pantónův-Valentinův leukocidin (PVL) z laboratorní sbírky z let 2004–2014 (metoda PCR)

PVL	ETD	MRSA	počet kmenů (procento)
+	-	-	491 (96,8 %)
+	+	-	6 (1,2 %)
+	+	+	10 (2,0 %)
celkem			507

*) Geny pro exfoliatiny A a B, enterotoxiny A–D a toxin syndromu toxického šoku TSST-1 nebyly zjištěny

VÝSLEDKY

Ze souboru 5449 kmenů z let 2015–2020 bylo zjištěno 42 kmenů pozitivních na ETD, což činí 0,8 %. Z těch u 28 kmenů nebyly zachyceny geny dalších toxinů, 9 kmenů bylo pozitivních i na PVL, 3 kmeny produkovaly navíc enterotoxin B a po jednom kmeni byla zjištěna pozitivita také na enterotoxin D a TSST-1. Celkem 6 kmenů bylo MRSA, tyto všechny produkovaly i PVL toxin (**tabulka 1 a graf 1**).

Z 507 PVL pozitivních kmenů druhého souboru, které máme uložené v laboratorní kryosbírký z let 2004–2014, jsme gen *etd* potvrdili u 16 kmenů (3,2 %), z těch bylo 10 MRSA. U žádného z těchto kmenů jsme nenalezli přítomnost genů kódujících exfoliatiny A a B, toxin TSST-1 a základní enterotoxiny A–D (**tabulka 2**).

Celkem bylo na *etd* pozitivních 58 z 5956 sledovaných kmenů obou souborů, což činí 1,0 %. Nejistili jsme ani jeden kmen, který by vedle ETD byl pozitivní i na některý z dalších exfoliatinů ETA a ETB.

Podle materiálu, ze kterého byly kmeny z obou souborů izolovány, byly rozděleny do tří kategorií. V první, označené „hnis“ byly kmeny ze stěrů infikovaných ran, z abscesů, furunklů, píštělů, punktátů a zhnisaných spálenin. Těch bylo 38, tedy dvě třetiny z pozitivních. Další skupinu tvořily kmeny z hemokultur, kterých bylo celkem 11 (19,0 % z pozitivních). Dále bylo po jednom kmeni z pemphiga, puchýře, moče a nemocničního prostředí, 5 zbývajících z výtěrů nosů a ze sputa bylo zařazeno do skupiny „ostatní“ (**tabulka 3 a graf 2**).

Podle lokalit, z kterých nám byly ETD pozitivní kmeny zaslány, jich bylo nejvíce z Oddělení lékařské mikrobiologie v Hořovicích (20 kmenů) a po pěti kmenech z Oddělení klinické mikrobiologie FN Bulovka v Praze a z Laboratoře klinické mikrobiologie Nemocnice v Českých Budějovicích.

Tabulka 3: Distribuce kmenů *S. aureus* pozitivních na exfoliatin typu D celkem z obou sledovaných souborů podle materiálu

Hnis *)	hemokultura	pemhigus, puchýř	moč	prostředí **)	ostatní #)	celkem
38	11	2	1	1	5	58

*) hnis – stěry z infikovaných ran, z abscesů, furunklů, píštělů, punktátů a zhnisaných spálenin; **) prostředí – operační stolek; #) ostatní – výtěry nosu, sputum

DISKUZE

Výskyt kmenů s exfoliatinem D je vzácnější než s typy A a B. Z celého souboru 5956 sledovaných kmenů bylo na gen *etd* pozitivních jedno procento. U exfoliatinu A a B se v literatuře uvádí 5 % pozitivních [1], v našem souboru 9626 klinických kmenů z let 1998–2019 jsme zjistily pozitivitu na *eta a*/nebo *etb* u 9,5 % [8].

Podle přítomnosti genu *etd* ovšem nelze konstatovat, že kmen ETD produkuje. V první japonské práci [10] je prezentováno 12 producentů ETD z 18 kmenů pozitivních na *etd*. Pro porovnání můžeme uvést, že z asi 200 kmenů, u kterých jsme zjišťovali přítomnost genů *eta a*/nebo *etb* a také produkci ETA a ETB latexovým testem, byla u všech potvrzena.

Shodně s japonskými autory [10] a další literaturou jsme zjistili, že většina našich *etd* pozitivních kmenů byla izolována z jiných než puchýřnatých infekcí, nejčastěji ze zhnisaných ran a abscesů. Z 58 ETD pozitivních kmenů z obou sledovaných souborů, byl jen jeden kmen izolován z pemphiga a jeden z puchýře, ale v tom případě se jednalo o smíšenou infekci s producentem exfoliatinu A.

Vzácný nálezný společné produkce ETD a enterotoxinů A–D nebo TSST-1 je rovněž v soulase s literaturou [10], tři kmeny s kombinací ETD a enterotoxinu B pocházely z jedné lokality, je tedy možné, že se jednalo o stejný klon.

Nenašli jsme ani jediný ETD pozitivní kmen, který by obsahoval i geny pro ETA a/nebo ETB. Tuto skutečnost jsme zjistili i v naší společné předchozí práci s Oddělením genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity [7].

Z celku 58 ETD pozitivních kmenů bylo 16 MRSA (27,6 %). To je zásadní rozdíl oproti našim výsledkům s kmeny produkujícími ETA a/nebo ETB: v souboru 846 kmenů z let 2007–2020 jsme ani v jednom případě přítomnost *mecA* genu neprokázali.

ZÁVĚR

Vedle častěji se vyskytujících kmenů *S. aureus* s produkcí exfoliatinů A a B vyvolávají i kmeny pozitivní na exfoliatin D infekce kůže a měkkých tkání. V celku 5956 kmenů z našich dvou souborů kmenů z klinického materiálu zaslaných do NRL pro stafylokoky 2004–2020 jsme přítomnost genu *etd*, který exfoliatin D kóduje, zjistili u 58 (1,0 %) kmenů. Žádný z nich neprodukoval exfoliatiny A a B. Necelá polovina z pozitivních produkovala i Pantonův-Valentinův leukocidin, z nich 2/3 byly MRSA. Kombinace s toxinem TSST-1 a enterotoxiny B a D byla ojedinělá. V soulase s literaturou většina těchto kmenů pocházela z jiného klinického materiálu než z puchýřů, jak je to obvyklé u kmenů produkujících exfoliatiny A a B.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují svým bývalým spolupracovnícům, které se na této problematice podílely.

Děkujeme i všem kolegům z terénních laboratoří, kteří nám kmeny zasílají.

LITERATURA:

- [1] Alouf JE, Alouf HM. 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol* 2003; 292: 429–440
- [2] Ritter von Rittershain G. Die exfoliative Dermatitis jüngerer Säuglinge. *Zent-Ztg Kinderheilkunde*. 1878; 2: 3–23
- [3] Kapral FA, Miller MM. Product of *Staphylococcus aureus* responsible for the scalded skin syndrome. *Infect Immun*. 1971; 4: 541–545
- [4] Melish ME, Glasgow LA, Turner MD. The staphylococcal scalded skin syndrome: isolation and partial characterization of the exfoliative toxin. *J Infect Dis*. 1972; 125: 129–140
- [5] Kondo I, Sakurai S, Sarai Y. New type of exfoliatin obtained from staphylococcal strains belonging to phage groups other than group II, isolated from patients with impetigo and Ritter's disease. *Infect Immun*. 1974; 10(4): 851–861
- [6] Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 224–242
- [7] Růžičková V, Pantůček R, Petráš P, et al. Major clonal lineages in impetigo *Staphylococcus aureus* strains isolated in Czech and Slovak maternity hospitals. *Int J Med Microbiol*. 2012; 302: 237–241
- [8] Petráš P, Kečlaková J, Hutníková R. Sledování exfoliatin pozitivních kmenů *Staphylococcus aureus* v NRL pro stafylokoky v letech 1998–2019. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2020; 29(2): 69–73
- [9] Sato H, Matsumori Y, Tanabe T, et al. A new type of staphylococcal exfoliative toxin isolated from a *Staphylococcus aureus* strain isolated from a horse with phlegmon. *Infect Immun*. 1994; 62: 3780–3785
- [10] Yamaguchi T, Nishifuji K, Sakaki M, et al. Identification of the *Staphylococcus aureus etd* pathogenicity island which encodes a novel exfoliative toxin ETD and EDIN-B. *Infect Immun*. 2002; 70: 5835–5845
- [11] Imanishi I, Nicolas A, Barbosa Caetano AC. Exfoliative toxin E, a new *Staphylococcus aureus* virulence factor with host-specific activity. *Scientific Reports*. 2019; 9: article No. 16336
- [12] Iyori K, Hisatsune J, Kawakami T, et al. Identification of a novel *Staphylococcus pseudintermedius* exfoliative toxin gene and its prevalence in isolates from canines with pyoderma and healthy dogs. *FEMS Microbiol Lett*. 2010; 312: 169–175
- [13] Vrbovská V, Sedláček I, Zeman M, et al. Characterization of *Staphylococcus intermedius* group isolates associated with animals from Antarctica and emended description of *Staphylococcus delphini*. *Microorganism*. 2020; 8: 204 doi:10.3390/microorganisms 8020204
- [14] Petráš P, Měřínská T, Hutníková R. Sledování produkce hyaluronidázy u kmenů rodu *Staphylococcus* v ČR v NRL pro stafylokoky v letech 2004–2020. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(5): 145–148
- [15] Ruzickova V, Voller J, Pantucek R, et al. Multiplex PCR for Detection of Three Exfoliative Toxin Serotype Genes in *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol*. 2005; 50(6): 499–502

Petr Petráš, Tereza Měřínská
Radoslava Hutníková, Jana Kečlaková
NRL pro stafylokoky, CEM SZÚ