

Sledování exfoliatin-pozitivních kmenů *Staphylococcus aureus* v NRL pro stafylokoky v letech 1998–2019

Exfoliatin production by Staphylococcus aureus strains tested by the National Reference Laboratory for Staphylococci in 1998–2019

Petr Petráš, Jana Kekláková, Radoslava Hutníková

Souhrn • Summary

Exfoliatin je stafylokokový proteolytický exoprotein, který je vlastní příčinou epidermolytických infekcí, zejména u novorozenců a malých dětí, ale i u dospělých jedinců se sníženou imunitou. Nejčastějšími původci lidských epidermolýz jsou v naší republice kmeny *S. aureus* s produkcí exfoliatinu A a/nebo B. Sledovali jsme produkci exfoliatinu u téměř 14 000 kmenů zaslaných ke zjištění toxigenity do NRL pro stafylokoky v letech 1998–2019. Dále jsou stručně popsány vybrané hromadné výskyty puchýřnatého onemocnění novorozenců, u nichž bylo etiologické agens potvrzeno. Z celku 43 hromadných výskytů za uvedené období vyvolaly v 35 případech epidemii kmeny s produkcí exfoliatinu A, v jednom případě kmeny s produkcí exfoliatinu B. Ve zbývajících 7 výskytech byly původcem kmeny s produkcí obou těchto exfoliatinů.

Exfoliatin, a staphylococcal proteolytic exoprotein, is the cause of epidermolytic infections mainly in newborn and small children but also in immunocompromised adults. In the Czech Republic, the most common agents of human epidermolysis are exfoliatin A and/or B producing strains of *S. aureus*. The article deals with exfoliatin production in ca 14 000 strains referred to the National Reference Laboratory for Staphylococci for toxigenicity testing in 1998–2019. Selected outbreaks of neonatal blistering disease where the etiological agent was confirmed are briefly described. Of 43 outbreaks recorded in the study period, 35 were caused by exfoliatin A producing strains, one by exfoliatin B producing strain, and seven by strains producing both A and B exfoliatins.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2020; 29(2): 69–73

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, exfoliatin, puchýřnaté onemocnění novorozenců, stafylokokový syndrom opařené kůže

Key words: *Staphylococcus aureus*, exfoliatin, neonatal blistering disease, staphylococcal scalded skin syndrome

ÚVOD

Kmeny *Staphylococcus aureus* produkující exfoliativní toxin (ET), nazývaný též exfoliatin, vyvolávají kožní infekce – epidermolýzy. Exfoliatiny jsou serinové proteázy, cílovým místem účinku ET je vrstva stratum granulosum v pokožce. Toxická epidermolýza se vyskytuje převážně u dětí do 5 let. V nejmírnější podobě dojde k výsevu skarlatiniformního exantému. Nejčastější formou je puchýřnaté onemocnění novorozenců (PON – pemphigus neonatorum), kdy dochází k výsevu kožních puchýřků. Komplikací této infekce mohou být konjunktivitidy, panaricia, omphalitidy, případně až sepse a osteomyelitidy. Lokalizovaná forma epidermolytických infekcí se vyskytuje i u imunitně oslabených starších dětí nebo dospělých ve formě bulózního impetiga [1].

Je historickou zajímavostí, že PON poprvé popsal v roce 1878 pediatr baron Gottfried Ritter von Rittershain u 297 kojenců hospitalizovaných v průběhu 10 let sledování v dětské nemocnici na Karlově, která byla součástí pražského nalezince [2]. Onemocnění nazval „dermatitis exfoliativa neonatorum“, ale neznal původce. Toho popsal v roce 1891 Almquist [3]. Gram-pozitivní bakterii nazval *Micrococcus pemphigi neonatorum*. Brzo se zjistilo, že je to *Staphylococcus aureus*, který byl popsán Rosenbachem už 1884 [4].

Generalizovanou formou onemocnění je velice závažné onemocnění: stafylokokový syndrom opařené kůže, („Staphylococcal Scalded Skin Syndrom“ SSSS – též Ritterova choroba, pojmenovaná podle pražského německého pediatra). Projevuje se vznikem puchýřů, rozsáhlých erozí a odlupováním povrchových vrstev pokožky v cérech [5]. Pro úspěšnou léčbu je důležitá rychlá laboratorní diagnostika, která umožní promptní nasazení protistafylokokové antibiotické terapie. Podobně jako PON se SSSS primárně vyskytuje u kojenců a malých dětí. Mortalita se udává 4 % [18]. Může se však objevit i u dospělých, zvláště u starších osob, u kterých se uvádí mortalita větší než 60 % [18].

Shodné klinické příznaky má toxická epidermální nekrolýza (TEN) – Lyellův syndrom. Ten vzniká jako cytotoxická buněčná imunopatologická reakce na některé léky (antibiotika, sulfonamidy, barbituráty, a j.). Lyellův syndrom je vzácná, nicméně život ohrožující infekce s mortalitou až 55 %. Antibiotiky se neléčí [19].

EXFOLIATIVNÍ TOXINY

Podle literárních údajů jsou exfoliatiny produkovány asi pěti procenty kmenů *S. aureus* izolovaných z humánního materiálu [6]. Dnes je známo u *S. aureus* 5 typů ET. Lidské

epidermolýzy jsou, alespoň v Evropě, nejčastěji způsobeny dvěma sérotypy A (ETA) a B (ETB) [6]. Exfoliatin C (ETC) byl zjištěn u kmene izolovaného z kožní eroze koně postiženého flegmónou [7]. Exfoliatin D (ETD) byl popsán u kmenů z humánního materiálu v roce 2002 [8]. Hraje patogenní roli v širším spektru stafylokokových infekcí než pouze impetigo a SSSS. V loňském roce byl u kmenů *S. aureus*, které způsobily mastitidy u ovcí, popsán exfoliatin E [9].

Existence exfoliatinů byla zjištěna i u koaguláza-pozitivních stafylokoků skupiny SIG (*S. intermedius* group). V roce 1998 byla publikována přítomnost exfoliativních toxinů u druhu *Staphylococcus hyicus*. Kmeny jsou původci exudativních epidermitid u prasete domácího [10]. Některé kmeny *Staphylococcus intermedius* produkují exfoliativní toxiny, které způsobují pyodermie u psů [11]. V roce 2009 byl popsán exfoliatin EXI u kmenů *Staphylococcus pseudintermedius* [12]. Úplně recentně byla zjištěna brněnskými bakteriology přítomnost genu kódujícího exfoliatin u kmenů *S. delphini* z Antarktidy [13].

Z chemického pohledu jsou exfoliatiny jednoduché proteiny, toxin ETA je tvořen 242 aminokyselinami a ETB 246 aminokyselinami. Relativní molekulová hmotnost je přibližně 27 kDa, tj. asi jako u stafylokokových enterotoxinů. Jsou známé kompletní sekvence obou genů a jejich vzájemná sekvenní homologie je 40 % [5]. Oba sérotypy se liší odolností ke zvýšené teplotě: ETB je termolabilní, kdežto ETA si zachovává svou funkci i po třicetiminutovém zahřátí na 60 °C [5]. Oba toxiny se však vyznačují shodnými biologickými a patofyziologickými vlastnostmi, což bylo potvrzeno experimenty provedených na novorozenech myšákách. Exfoliatiny jsou proteolytické, serinové peptidázy. Jejich účinky jsou druhově specifické, působí na lidi, opice a myši, ale nikoliv na krysy, králíky, morčata a kuřata. Některé kmeny mohou produkovat oba tyto sérotypy současně. Lékařské studie naznačují, že kmeny produkující ETB jsou agresivnější, a častěji způsobují generalizovaný SSSS. Rozdílná je geografická distribuce jednotlivých ET sérotypů. Na americkém a evropském kontinentu převažují kmeny s produkcí ETA, v Japonsku převažuje výskyt producentů ETB [5].

Genetické determinanty exfoliatinů jsou lokalizovány na různých místech genomu a jsou asociovány s mobilními genetickými elementy. Gen *eta* kódující ETA je součástí profága a lokalizován na chromozomu, gen *etb* kódující ETB je umístěn na 42kb plasmidu spolu s geny kódujícími další faktory virulence, např. rezistenci ke kadmiu [1].

Některé studie řadí exfoliatiny A a B k superantigenům jako jsou stafylokokové enterotoxiny a toxin syndromu toxického šoku TSST-1 [14].

MATERIÁL A METODY

Kmeny *S. aureus*, které byly do NRL pro stafylokoky (NRL/St) zaslány ke zjištění produkce exfoliatinů, resp. přítomnosti kódujících genů, pocházely z oddělení klinické mikrobiologie nemocnic ze všech krajů ČR i ze soukromých laboratoří.

První metodou, která byla ke zjištění přítomnosti produkce ETA a ETB v NRL/St zavedena, byla reverzní pasivní latexová aglutinace (RPLA). Pracovali jsme se setem EXT- RPLA “Seiken” (Denka Seiken, Japonsko), který používá latexové partikule senzibilizované monoklonálními protilátkami proti ETA a ETB. Citlivost tohoto testu je 1–2 ng toxinu/ml.

Od roku 2016 používáme metodu PCR, pomocí které detekujeme přítomnost genů *eta*, *etb* a *etd* kódujících produkci ETA, ETB a ETD.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Produkce exfoliatinů, resp. přítomnost genů kódujících exfoliatiny

Metodou RPLA bylo v rozmezí let 1998–2016 vyšetřeno 9 626 klinických kmenů *S. aureus*. Na produkci exfoliatinů A a B bylo celkem pozitivních 918 (9,53 %) kmenů, z toho 738 (7,67 %) produkovalo ETA, 36 (0,37 %) ETB a 147 (1,50 %) kmenů bylo pozitivních na ETA a ETB dohromady (Tabulka 1). Tyto počty jsou vyšší než v literatuře udávaných 5 %, protože do NRL jsou zasílány klinické kmeny, u nichž je pravděpodobnost pozitivivity větší. V tabulce jsou uvedeny všechny vyšetřené kmeny, tzn. relativní četnost exfoliatin pozitivních kmenů v jednotlivých letech je ovlivněna počtem izolátů zaslaných z epidemií. Metodou RPLA lze semikvantitativně zjistit intenzitu produkce: u většiny kmenů, které byly zaslány z epidemií PON, se jednalo o hyperproducenta exfoliatinu.

Metodou PCR byla v letech 2016–2019 sledována přítomnost genů pro ETA, ETB a ETD u 4340 kmenů *S. aureus*. Pozitivních na exfoliatiny bylo 289, tj. 6,65 %. Z toho gen pro ETA byl prokázán u 5,0 %, pro ETB u 0,32 % a pro ETD u 0,71 %. Kombinaci *eta + etb* mělo 26 kmenů (0,6 %) (Tabulka 1).

Hromadné výskyty puchýřnatého onemocnění novorozenců

V letech 1998 až 2019 byly do NRL/St zaslány kmeny *S. aureus* ze 43 hromadných výskytů puchýřnatého onemocnění novorozenců. První zaznamenané vzplanutí toxické epidermolýzy nastalo hned v roce 1998 na porodnicko-novorozeneckém oddělení nemocnice v Moravskoslezském kraji. Z epidemie

jsme dostali kmeny od 16 pacientů s příznaky PON a dále řadu kmenů z kontrolních odběrů personálu a z prostředí. Podle poskytnutých informací bylo touto infekcí celkem postiženo asi 30 novorozenců. Jako etiologické agens byly u všech pacientů a u řady výtěrů personálu i stěru z prostředí potvrzeny kmeny *S. aureus*, jejichž společnou vlastností byla produkce exfoliatinů ETA i ETB dohromady. Vybrané kmeny byly v Oddělení genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně (doc. Vladislava Růžičková) podrobeny analýze makrorestrikčního spektra *Sma*I fragmentů genomové DNA, s využitím pulzní elektroforézy (PFGE). Touto analýzou a dalšími genotypovými metodami bylo prokázáno, že u všech ETA+ETB pozitivních kmenů se jedná o stejný genotyp [15,16].

Ve stejném měsíci vypukla epidemie PON v nemocnici v Jihomoravském kraji. Od pacientů bylo zasláno 20 kmenů (nemocných dětí bylo asi 40), u kterých byla prokázána produkce exfoliatinu ETA. Genetické metody opět zařadily exfoliatin produkující kmeny do stejného klonu [15,16]. Epidemiologickou zajímavostí je, že se po delší době podařilo zachytit nosičku tohoto kmene z řad pomocného personálu, která jednou týdně nosila na oddělení sterilní povlečení do postýlek.

Na přelomu let 2001–2002 došlo k hromadnému výskytu PON v jedné brněnské porodnici. Celkem bylo ve dvou časově ohraničených obdobích postiženo 45 novorozenců. V první etapě (1. 12. 2001–12. 1. 2002) onemocnělo 26 dětí. Do NRL jsme od nich dostali 11 kmenů a dále kmeny z prostředí a od personálu. Produkce ETA byla prokázána u všech dětských pacientů, ze všech (6) stěrů z prostředí a také byla zachycena jedna nosička – sestra z porodního oddělení. Provoz porodnice byl zastaven, provedena dezinfekce a sestra přeléčena. Po týdnu byl provoz porodnice znovu zahájen. Po dvou týdnech vypukla druhá vlna PON, v které onemocnělo dalších 19 novorozenců. U některých z nich byl průběh PON komplikován (panariciem, pemphigus) [17]. Při opakovaném vyšetření personálu byla na producenta ETA pozitivní opět stejná sestra a následně byl tentýž kmen zachycen i u jejího partnera.

Nejdelší výskyt případů PON jsme zaznamenali v jedné porodnici v Libereckém kraji.

Od května roku 2004 až do listopadu roku 2011 nám byly zaslány kmeny *S. aureus* s produkcí ETA od pacientů

Tabulka 1: Produkce exfoliatinu ETA a ETB (1998–2016) a přítomnost genů *eta*, *etb* a *etd* (2016–2019) u kmenů *S. aureus*

Období	metoda	ETA/ <i>eta</i>	ETB/ <i>etb</i>	<i>etd</i>	ETA + ETB/ <i>eta + etb</i>	ET pozitivní	ET negativní	celek všech sledovaných
1998–2016	RPLA	738	36	nd	144	918	8 708	9 626
2016–2019	PCR	218	14	31	26	289	4 051	4 340
Celkem 1998–2019		956	50	31	170	1 207	12 759	13 966
	%	6,83	0,36	0,71 *)	1,21	8,64		

Legenda – RPLA: reverzní pasivní latexová aglutinace; PCR: polymerázová řetězová reakce; nd: netestováno; *): jen z let 2016–2019

Tabulka 2: Případy stafylokokového syndromu opařené kůže (SSSS) v České republice 1999–2019

č.	rok	měsíc	kraj	nemocnice	pohlaví	věk	agens	poznámka
1	1999	II.	ULK	Most	M	3 roky	ETA + ETB	
2	1999	VI.	MSK	Opava	M	4 měsíce	ETA + ETB	
3	2010	IV.	PLK	Rokycany	M	novorozenec	ETA	těžký případ SSSS, včetně pobytu na ARO
4	2010	VIII.	Praha	Praha – VFN	M	novorozenec	ETA	
5	2010	XI.	Praha	Praha, TN Krč	Ž	10 měsíců	ETA	celotělová epidermolýza, pobyt na JIP, залечена
6	2011	III.	Praha	Praha – VFN	M	4 měsíce	ETA	smrtelný případ SSSS
7	2015	VIII.	ZLK	Zlín	Ž	novorozenec	ETA	smrtelný případ SSSS
8	2016	XII.	PLK	Plzeň	Ž	7 měsíců	ETA	
9	2018	XI.	HKK	Hradec Králové	Ž	17 měsíců	ETA + ETB	mírnější průběh SSSS, po týdnu terapie OXA + CLI propuštěna domů
10	2019	XI.	HKK	Hradec Králové	Ž	1 měsíc	ETA + ETB	nedonošená, propuštěna po 2 měsících hospitalizace a měs. léčby SSSS (OXA + CLI) v dobrém stavu.

s PON, maminek a též od personálu a z prostředí. Celkem to bylo 244 kmenů. Z nich bylo 146 pozitivních na ETA, dva kmeny produkovaly oba typy ETA a ETB. Od dětských pacientů bylo ze 166 kmenů pozitivních na ETA 134 (80,7 %), ze 13 kmenů pocházejících od matek produkovalo ETA 8 kmenů, 3 pozitivní kmeny byly ze 60 výtěrů od personálu a 3 z 5 kmenů z prostředí novorozeneckého oddělení. Celkem 29 ETA pozitivních kmenů bylo podrobena makrorestrikční analýze. Z nich 4 kmeny měly odlišný pulzotyp, zbývajících 25 izolátů z celého období z puchýřů dětí, od maminek, výtěrů personálu i z prostředí bylo shodných.

Pomáhali jsme řešit dvě epidemie PON i ve slovenských nemocnicích. Z jedné porodnice v Trnavském kraji nám bylo zasláno z dlouhodobého výskytu v průběhu let 2003–2007 celkem 21 kmenů od novorozenců. Z druhé porodnice, rovněž v Trnavském kraji, bylo v únoru 2018 zasláno 24 patientských kmenů a řada dalších kmenů z prostředí porodnice a personálu. V obou případech byla epidemie vyvolaná producentem ETA.

Z celku 43 epidemií byl u 35 (81 %) původcem *S. aureus* s produkcí ETA, u sedmi (16,7 %) produkoval původce oba typy ETA + ETB. Pouze u jedné epidemie v Královéhradeckém kraji, v které onemocnělo minimálně 15 novorozenců, byl etiologickým agens kmen produkující exfoliatin ETB.

Případy stafylokokového syndromu opařené kůže (SSSS)

V letech 1999–2019 se do NRL/St dostaly kmeny v souvislosti s těžkým průběhem syndromu opařené kůže. Byly to kmeny od 10 pacientů, dále kmeny od kontaktů zdravotnického personálu a rodičů. Věk dětí se pohyboval od několika dnů do 3 let, pět bylo děvčat, 5 chlapců. U většiny byl popisován těžký průběh nemoci, 4letý chlapec a novorozená holčička onemocnění nepřežili. Jako příčina byl u 6 dětí prokázán kmen s produkcí exfoliatinu ETA (včetně obou úmrtí), u zbývajících 4 pacientů se jednalo

o kmen *S. aureus*, který produkoval dva typy exfoliatinů, ETA + ETB (Tabulka 2).

Infekce vyvolané exfoliatinem ETD

Přítomnost genů kódujících produkci ETD zjišťujeme metodou PCR až od roku 2016. Gen *etd* byl do konce roku 2019 potvrzen u 31 kmenů *S. aureus*, jednou v kombinaci s *eta* (Tabulka 1). Většina kmenů pocházela ze stěrů abscesů, žádný nebyl etiologickým agens PON ani SSSS.

ZÁVĚR

Stafylokokový exfoliatin je jedním z hlavních faktorů virulence u kmenů *S. aureus*. Kmeny, které ho produkuje, jsou obávanou nozokomiální bakterií na novorozeneckých odděleních. Výsledky sledování toxigenity a genotypizace těchto kmenů pomáhají při epidemiologických řešeních hromadných výskytů tohoto nepříjemného onemocnění. Při podrobné genotypizaci těchto kmenů bylo zjištěno, že izoláty zachycené z puchýřů nemocných dětí, z výtěrů nosů personálu a též z prostředí jsou identické. Některé epidemie jsou velice dlouhodobé a táhnou se i několik let, než se je podaří zastavit. Většinou se jedná o skrytého nosiče (nosičku) z řad odborného nebo pomocného personálu.

Děkujeme všem spolupracujícím laboratorům za zaslání kmeny i za informace o hromadných výskytech puchýřnatého onemocnění novorozenců. Doc. Vladislavě Růžičkové z Oddělení genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně a jejímu kolektivu děkujeme za provedení makrorestrikční analýzy u kmenů z prvních sledovaných epidemií. Děkujeme všem bývalým kolegyním, které v naší laboratoři pracovaly.

Tato práce byla podpořena projektem MZ ČR – RVO („Státní zdravotní ústav – SZÚ, 75010330“).

LITERATURA

1. Iandolo J J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol*. 1989; 43: 375–402
2. Ritter von Rittershain G. Die exfoliative Dermatitis jüngerer Säuglinge. *Zent-Ztg Kinderheilkunde*. 1878; 2: 3–23.
3. Almquist E. Pemphigus neonatorum, bakteriologisch und epidemiologisch beleuchtet. *Z Hyg Infectioskr*. 1891; 10: 253.
4. Rosenbach FJ. Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. J. F. Bergmann, Wiesbaden. 1884; pp. 1–122.
5. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. 1999. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12: 224–242.
6. Alouf JE, and Alouf HM. 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. *Int J Med Microbiol*. 2003; 292: 429–440.
7. Sato, H., Y. Matsumori, T. Tanabe, 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.
8. 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.
9. 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
10. Andersen LO. Differentiation and distribution of three types of exfoliative toxin produced by *Staphylococcus hyicus* from pigs with exudative epidermitis. *Imunol and Med Microbiol*. 1998; 20: 301–310.
11. Terauchi R, Sato H, Hasegawa T, et al. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. *Vet Microbiol*. 2003; 94: 19–29.
12. Futagawa-Saito K., Makino S, Sunaga F, et al. Identification of first exfoliative toxin in *Staphylococcus pseudintermedius*. *FEMS Microbiol Lett*. 2009; 301: 176–180.
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/microorganisms8020204
14. Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins* 2010; 2: 1148–1165.
15. Růžičková V, Petráš P. Exfoliatiny *Staphylococcus aureus* – původci epidermolytických infekcí. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2003; 12(4): 171–174.
16. Růžičková V, Pantůček R, Petráš P, Doškař J, Sedláček I, Rosypal S. Molecular typing of exfoliative toxin-producing *staphylococcus aureus* strains involved in epidermolytic infections. *Int J Med Microbiol*. 2003; 292: 541–545.
17. Heyduková S. Závěrečná zpráva o hromadném výskytu kožního puchýřnatého onemocnění novorozenců v nemocnici Milosrdných bratří, Brno. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2002; 11(4):164–168.
18. Patel GK, Finlay AY. Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis a management. *Am J Clin Dermatol*. 2003; 4(3): 165–175.
19. Abela C, Hartmann CEA, De Leo A, et al. Toxic epidermal necrolysis (TEN): The Chelsea and Westminster Hospital wound management algorithm. *J Plast Recon Aesthetic Surgery*. 2014; 67(8): 1026–1032.