

Laboratorní diagnostika v NRL pro stafylokoky CEM–SZÚ v roce 2019

Laboratory diagnostics in the National Reference Laboratory for Staphylococci, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, in 2019

Petr Petráš, Jana Kekláková, Radoslava Hutníková

Souhrn • Summary

Národní referenční laboratoř pro stafylokoky CEM–SZÚ se i v roce 2019 v rámci zajištění surveillance stafylokokových infekcí věnovala podrobnému vyšetřování kmenů stafylokoků z humánního klinického materiálu. Celkem to bylo 1405 kmenů, převážně druhu *Staphylococcus aureus*, které byly zaslány asi z 80 bakteriologických pracovišť z celé České republiky. Metodou PCR byla zjišťována přítomnost genů kódujících především Pantonův-Valentinův leukocidin, toxin Syndromu toxického šoku, exfoliatiny a enterotoxiny. Informace o produkci faktorů virulence jsou důležité pro ošetřujících lékaře ke správnému stanovení diagnózy a tedy i vhodné terapie. V celém souboru bylo i 79 (5,6 %) kmenů koaguláza negativních stafylokoků. U těchto podmíněných patogenů jsme fenotypizaci 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 2019 was again on the investigation of staphylococcal strains from human clinical specimens within the surveillance of staphylococcal infections. In total, 1405 strains mostly of the species *Staphylococcus aureus* referred to the NRL by 80 bacteriological laboratories from all over the Czech Republic 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 for attending physicians in determining the right diagnosis and effective treatment. Seventy-nine strains (5.6%) 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) 2020; 29(7): 295– 299

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

Keywords: laboratory diagnostics, staphylococci, Pantone-Valentine leucocidin, TSST-1

Obdobně jako v minulých letech se Národní referenční laboratoř pro stafylokoky CEM SZÚ (NRL/St) v roce 2019 věnovala především laboratorní diagnostice v rámci zajištění surveillance stafylokokových infekcí humánního původu. Celkem nám bylo zasláno 1405 kmenů stafylokoků přibližně z 80 bakteriologických laboratoří celé naší republiky. Stejně jako vloni jsme nejvíce kmenů dostali z Oddělení lékařské mikrobiologie v Hořovicích a dále z Odd. klinické mikrobiologie a ATB centra VFN v Praze. Třetím nejčastějším dodavatelem kmenů je Oddělení klinické mikrobiologie z Nemocnice na Bulovce, a na čtvrtém místě Odd. klinické mikrobiologie ATB středisko Nemocnice Strakonice.

Podle odebraného materiálu byly nejčastěji zastoupeny kmeny z různých kožních infekcí (asi 40 % všech izolátů).

V celém souboru bylo 1322 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, výjimečně si potvrzujeme produkci TSST-1 toxinu, exfoliatinu a enterotoxinů metodou latexové aglutinace.

PANTONŮV-VALENTINŮV LEUKOCIDIN (PVL)

PVL je velice nebezpečný cytotoxin, který se uplatňuje hlavně při infekcích kůže nebo měkkých tkání. Jeho produkce byla zjištěna u 152, tj. 11,5 % ze sledovaných kmenů. Je nutno poznamenat, že stejně jako u ostatních faktorů virulence platí, že do NRL/St jsou zasílány kmeny, u nichž je pravděpodobnost toxigenity vyšší než v běžné terénní populaci. Život ohrožující jsou především abscedující pneumonie, u nichž je popisována vysoká smrtnost. V loňském roce jsme žádný kmen v souvislosti s tímto onemocněním nedostali. Kmeny pozitivní na PVL pocházely nejčastěji

z abscesů. Z celku 152 producentů PVL bylo 57 (37,5 %) MRSA a 50 izolátů (32,9 %) mělo v DNA kromě genů na PVL, i geny k produkci některého z enterotoxinů A – D, nebo toxinu TSST-1. Ze tří různých pracovišť jsme dostali vysoce toxinogenní MRSA kmen pozitivní na PVL, TSST-1 a enterotoxiny B + C. Ve čtyřech případech se jednalo o rodinný výskyt tohoto agens u rodičů a dvou dětí.

TOXIN SYNDROMU TOXICKÉHO ŠOKU TSST-1

Kmeny *S. aureus* s produkcí TSST-1 jsou původcem dalšího závažného onemocnění, stafylokokového syndromu toxického šoku (STŠ). STŠ se vyskytuje 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.

V roce 2019 nám bylo v souvislosti se STŠ zasláno 10 kmenů. U 5 z nich jsme prokázali schopnost produkovat TSST-1, u zbývajících 5 se jednalo o producenty enterotoxinu A, C nebo kombinaci A+B a A+C. U 4 pacientek to byla menstruační forma STŠ, u všech bylo v anamnéze uvedeno používání vaginálních tampónů. Ve zbývajících 6 případech byl STŠ komplikací pyogenních stafylokokových onemocnění, z toho 3x pyodermií. Jedna 76letá pacientka, u které se takto zkomplikovala původní infekce močového traktu, zemřela (tabulka 1).

Za 22 let sledování máme v letech 1998–2019 v NRL/St zaregistrováno 237 případů STŠ, menstruační formy bylo 90. Celkem zemřelo 29 osob, při vyloučení 8 případů polymorbidních pacientů zůstává 21 úmrtí, tj. smrtnost 8,8 %.

Tabulka 1: Případy stafylokokového syndromu toxického šoku registrované v NRL/St v roce 2019

Č.	pohlaví	věk (let)	nemocnice	datum	forma	izolace <i>S. aureus</i>	TSST-1	enterotoxin
1	M	4	Hradec Králové	I.2019	pyodermie	stěr morfy	–	C
2	Ž	14	Hradec Králové	II. 2019	menstruační	tampon	–	A + B
3	Ž	19	Nové Město n. M.	III.2019	menstruační	pochva	TSST-1	–
4	Ž	17	Ostrava	IV.19	menstruační	tampon	TSST-1	A
5	M	72	Ústí n. L.	V.19	ranná infekce pouřazová	rána	–	C + D
6	Ž †	76	Praha - Homolka	VII. 19	infekce močového traktu	hemokultura	–	C
7	M	19	Ústí n. L.	X. 19	pyodermie	hnis	TSST-1	A
8	Ž	12	Praha - Bulovka	X. 19	menstruační	pochva	TSST-1	–
9	Ž	24	Praha - Homolka	X. 19	pyodermie	rána na stehně	TSST-1	–
10	M	62	Boskovice	X. 19	infekce krevního řečiště	hem., moč, hnis	–	A

EXFOLIATIN (EPIDERMÁLNÍ TOXIN)

Kmeny *S. aureus* s produkcí exfoliatinu jsou etiologickým agens epidermolytických infekcí, především puchýřnatého onemocnění novorozenců (PON). V nejtěžší formě vede až k život ohrožujícímu syndromu opařené 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.

V loňském roce jsme prokázali pozitivitu na exfoliatinu u 90 kmenů (6,8 %) z celku. Nejčastěji to byly kmeny s produkcí exfoliatinu A (64), 12 kmenů bylo pozitivních na exfoliatin D. Hromadný výskyt PON jsme v r. 2019 řešit nepomáhali, exfoliatin pozitivní kmeny pocházely z různých kožních infekcí.

ENTEROTOXINY

V roce 2019 jsme nezaznamenali ani hromadný výskyt alimentární intoxikace vyvolané enterotoxinogenními kmeny *S. aureus*. Kmenů enterotoxin pozitivních bylo 480 (36,3 % ze sledovaných). Zatímco v předchozích letech byly nejčastější kmeny s produkcí enterotoxinu A, v loňském roce bylo nejvíce producentů enterotoxinu D a C. Neobvyklý byl i podíl etiologických agens STŠ, které byly pozitivní pouze na enterotoxin a nikoliv TSST-1 (pět z deseti – viz tabulka 1). V několika případech menších výskytů infekcí spojených s nemocniční péčí pomohlo k prokázání shodnosti kmenů i zjištění produkce enterotoxinů.

ZMĚNY V TAXONOMII RODU *STAPHYLOCOCCUS*

V roce 2019 přibyly do seznamu rodu dva nové druhy: *S. debuckii* – popsáný kanadskými bakteriology (4 kmeny izolované z bovinního mléka), pojmenovaný podle kanadského veterinárního bakteriologa Dr. Jeroen De Buck [1]. Fylogeneticky je nejbližší s dalšími druhy, které se obvykle izolují z potravin: *S. condimentii*, *S. piscifermentans* a *S. carnosus*.

Dále taxonomové z Velké Británie popsali nový druh *S. pseudoxylosus* (jeden kmen byl zachycen z bovinní mastitidy) [2]. Tento nový stafylokok je příbuzný s druhy *S. saprophyticus*, *S. caeli* i s antarktickým druhem *S. edaphicus*, který byl uveden do stafylokokové taxonomie českými bakteriology v r. 2018 [3]. Název napovídá, že *S. pseudoxylosus* je velice blízký druhu *S. xylosus*, se kterým má společnou schopnost utilizovat xylózu. Nicméně podle genotypových i fenotypových vlastností se jedná o samostatný druh.

Celkem je v současnosti (červenec 2020) v rodu *Staphylococcus* 55 druhů, 9 z nich má 2 poddruhy a jeden poddruh 4. Celkem je tedy 67 různých stafylokokových taxonů. Z nich 12 patří do skupiny koaguláza pozitivních (*S. hyicus* a *S. agnetis* jsou pozitivní variabilně), zbývajících 55 jsou koaguláza negativní.

Poprvé jsme vloni v NRL/St zaznamenali výskyt 4 kmenů druhu *S. argenteus*. Tento koaguláza pozitivní stafylokok byl popsán australskými a dalšími taxonomy v roce 2015 [4]. Celosvětově je považován za “emerging” původce lidských infekcí, včetně PVL pneumonií a alimentárních intoxikací. Jeho charakteristiky jsou velice těžko odlišitelné od kmenů *S. aureus*. Dobře jde identifikovat hmotnostní spektrometrií. První izolát jsme dostali již jako velmi suspektní *S. argenteus* v červenci 2019 od Mgr. R. Kukly z Ústavu klinické mikrobiologie FN v Hradci Králové. Byl izolován z aspirátu 72letého muže, který byl hospitalizován pro poruchu vědomí způsobenou rozsáhlým subdurálním hematomem. Zřejmě se jednalo o první potvrzený záchyt tohoto druhu v České republice [5]. Identifikace byla potvrzena genotypizací v brněnské sbírce CCM. Záhy jsme dostali další 3 kmeny tohoto druhu, z Oddělení klinické mikrobiologie z Nemocnice Na Bulovce, opět z nemocnice v Hradci Králové a poslední z nemocnice v Litomyšli, který byl ale od stejného pacienta, jako předchozí kmen hradecký.

V případě, že zachytíte v bakteriologické laboratoři kmen, který se jeví jako nepigmentovaný *S. aureus*, nemá *nuc* gen a nemáte možnost ověřit to MALDI-identifikací, pošlete jej do naší NRL/St. Je pravděpodobné, že jste místo „zlatého“ *S. aureus* izolovali „stříbrného“ stafylokokoka *S. argenteus*

KOAGULÁZA NEGATIVNÍ STAFYLOKOKY

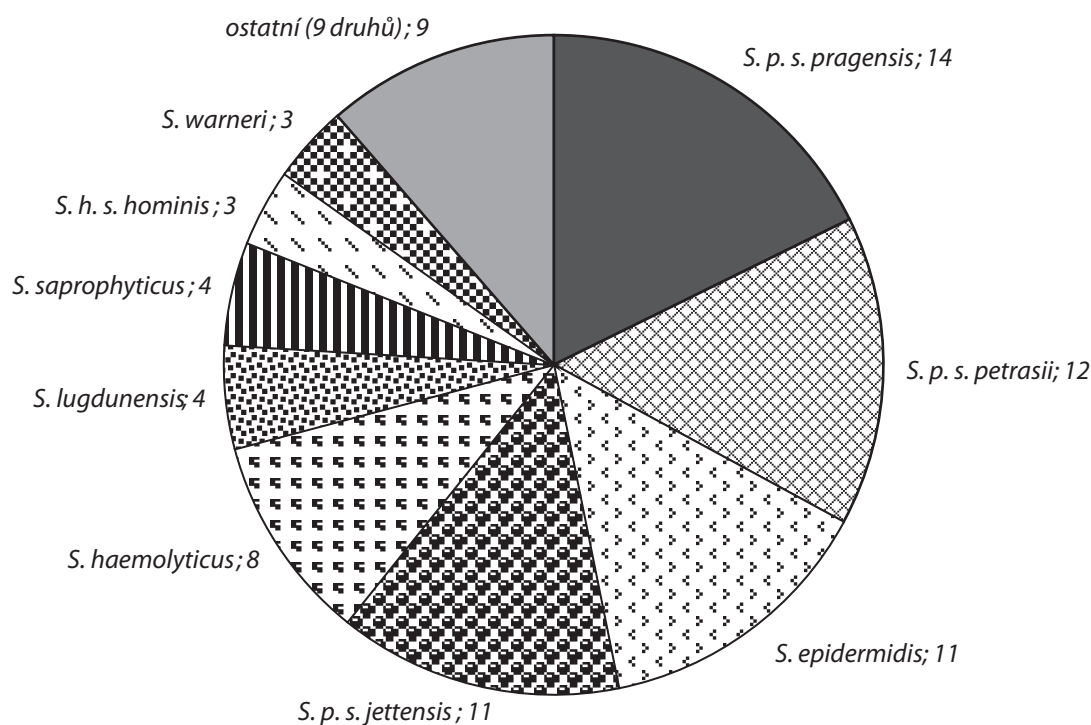
Koaguláza negativní stafylokoky (KNS) jsou dnes už jednoznačně považované za podmíněné patogeny, které mohou u imunitně oslabeného člověka vyvolat stejné onemocnění, jaké bývá vyvoláno druhem *S. aureus* (výjimkou jsou toxikózy).

Z 55 různých druhů a poddruhů KNS, je možné zachytit v humánním klinickém materiálu více jak polovinu. K identifikaci je dnes především využívána metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Většinu stafylokokových druhů umí určit velice dobře. Někdy je k přesné identifikaci (zařazení do poddruhu) potřeba použít klasické fenotypové, nebo genotypové metody. Např. při rozdělení kmenů *S. hominis* do poddruhů stačí diskový test rezistence k novobiocinu: kmeny subsp. *novobiosepticus* mají zónu inhibice při použití disku s obsahem 5 µg novobiocinu ≤ 16 mm.

Stále přibývá pracovišť, která mohou hmotnostní spektrometrii k identifikaci používat, a s tím klesá počet kmenů KNS, které jsou do NRL/St zasílány k identifikaci.

V loňském roce jsme dostali 79 kmenů KNS, které jsme zařadili do 17 druhů, resp. poddruhů (graf 1). Nejčastěji to byly kmeny *S. petrasii* subsp. *pragensis* a subsp. *petrasii*, což je dáno tím, že kolegové vědí, že stafylokoky tohoto druhu sbíráme. Nejvíce jsme jich dostali z Oddělení klinické mikrobiologie nemocnice v Karlových Varech, které předstihlo dosud nejčastějšího zasilatele Oddělení bakteriologie a mykologie ZÚ Ostrava. Chtěli bychom opět požádat o zasílání kmenů, zejména těch, jež při identifikaci hmotnostní

Graf 1: Druhy/poddruhy koaguláza negativních stafylokoků izolované v ČR z humánního materiálu a identifikované v NRL/St v r. 2019 (n = 78)



spektrometrií vyjdou při využití brukrovské databáze MBT 2018–7854 jako *Staphylococcus* [sp.1] nebo při využití loňské verze databáze MBT 2019–8468 jako *S. petrasii*. Dobrou indicií pro poddruh subsp. *petrasii* je pozitivní reakce některých kmenů na clumping-faktor s latexovými testy 3. generace, např. Pastorex*.

V pořadí četnosti byly v roce 2019 na dalších místech druhy *S. epidermidis* a *S. haemolyticus*. Nejzajímavějším izolátem byl *S. piscifermentans*, který nám poslala dr. Hásková z Hořovic z kožního defektu 87leté pacientky s aterosklerotickou gangrénou. Záchyt tohoto druhu byl poprvé popsán v r. 1992 japonskými bakteriology z fermentovaných ryb z Thajska [6]. *S. piscifermentans* je považován za nepatogenní bakterii, která bývá obvykle izolována z potravin. Čeští a slovenští kolegové ho zachytili z výkalů zdravého psa [7]. Je možné, že nález tohoto hořovického kmene 6673/KLI = NRL/St 19/896 je prvním z humánního klinického materiálu.

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.

V problematice koaguláza negativních stafylokoků pokračovala intenzivní spolupráce s Českou sbírkou mikroorganismů (CCM) a s Ústavem experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně (viz publikace 2 a 5). V současnosti se podílíme na přípravě

publikace popisující nový druh stafylokoka z klinického materiálu.

PUBLIKACE

V roce 2019 bylo otištěno s našim autorstvím, nebo spoluautorstvím 6 článků:

1. Jana Kekláková, Radoslava Hutníková, Petr Petráš. Laboratorní diagnostika v NRL pro stafylokoky CEM–SZÚ v roce 2018. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2019; 28(2): 59–63.
2. Veronika Vrbovská, Vojtěch Kovařovic, Ivana Mašlaňová, et al. *Staphylococcus petrasii* diagnostics and its pathogenic potential enhanced by mobile genetic elements. *Int J of Med Microbiol*. 2019; 309(5): 151–155.
3. Petr Petráš, Jana Kekláková, Radoslava Hutníková. *Staphylococcus argenteus* – nový druh koaguláza-pozitivního stafylokoka. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2019; 28(2): 262–263.
4. Tomáš Svoboda, Vladimír Špelina, Petr Petráš, et al. Mikrobiologický monitoring prostředí laboratorních myši v bariérovém experimentálním zařízení. *Hygiena*. 2019; 64(3): 105–111.
5. Tibor Botka, Roman Pantůček, Ivana Mašlaňová, et al. Lytic and genomic properties of spontaneous host-range *Kayvirus* mutants prove their suitability for upgrading phage therapeutics against staphylococci. *Scientific Reports*. 2019; April 9: 5475;
6. Petr Petráš, Jana Kekláková, Radoslava Hutníková. Stafylokokový syndrom toxického šoku v České republice za 36 let sledování v NRL pro stafylokoky CEM SZÚ. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2019; 28(10): 404–408.

PŘEDNÁSKY

V listopadu 2019 pořádala NRL/St ve spolupráci s NRL pro *E.coli* a shigely a NRL pro salmonely konzultační den „Laboratorní diagnostika v Oddělení stafylokokových a alimentárních bakteriálních infekcí“. Na programu byly 3 přednášky z naší laboratoře:

1. Novinky v taxonomii rodu *Staphylococcus*; předání Ceny Zlatého stafylokoka, kterou za rok 2018 dostala MUDr. Alžběta Studená z Oddělení klinické mikrobiologie a ATB centra VFN v Praze
2. Sledování kmenů *S. aureus* pozitivních na Pantonův – Valentinův leukocidin
3. Případy syndromu toxického šoku v České republice v letech 1998 – 2018

Pracovnice NRL/St účastnila Slezských dnů preventivní medicíny v Ostravici se sdělením:

4. Epidemie stafylokokové enterotoxikózy po konzumaci tortilly s kuřecím masem

Dále jsme se zúčastnili Kongresu KMINE v Olomouci:

5. Případy syndromu toxického šoku v ČR za 36 let sledování v NRL/St CEM SZÚ
6. Pět případů abscedující pneumonie v České republice za rok 2018

Dvou konferencí Společnosti mikrobiologických laborantů v Praze a ve Znojmě:

7. Aktuality v Oddělení SABI CEM
8. Nový druh koaguláza pozitivního stafylokoka

Celostátní konference „Výživa a zdraví“ v Teplicích:

9. Hromadný výskyt stafylokokové enterotoxikózy po konzumaci tortilly s kuřecím masem

Setkání uživatelů MALDI Biotyper 2019 v Praze:

10. Identifikace MALDI-TOF MS a „české“ stafylokoky.

Pracovník NRL/St se podílel na výuce lékařské mikrobiologie medikům na 2. LF UK a přednášel v Akreditovaném kvalifikačním kurzu (AKK) odborné laboratorní metody, organizovaném Institutem postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví.

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. Naushad S, Kanevets U, Nobrega D. et al. *Staphylococcus debuckii* sp. nov., a coagulase- negative species from bovine milk. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019; 69(8): 2239–2249
2. MacFadyen AC, Leroy S, Harrison EM, et al. *Staphylococcus pseudoxylosus* sp. nov. isolated from bovine mastitis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2019; 69(8): 2208–2213
3. 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(2): e01746–17
4. Tong SYC, Schaumburg F, Ellington MJ, et al. Novel staphylococcal species that form part of a *Staphylococcus aureus* – related complex: the non – pigmented *Staphylococcus argenteus* sp. nov. and the non – human primate – associated *Staphylococcus schweitzeri* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015; 65(1): 15–22
5. Kukla R, Neradová K, Petráš P, et al. První potvrzený záchyt kmene *Staphylococcus argenteus* v České republice. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2020; 69(1): 48–52.
6. Tanasupawat S, Hashimoto Y, Ezaki T, et al. *Staphylococcus piscifermentans* sp. nov., from Fermented Fish in Thailand. *Int J Syst Bacteriol.* 1992; 42(4): 577–581
7. Štětina V, Lauková A, Stropfová V, et al. Identification of *Staphylococcus piscifermentans* from dog feces. *Folia Microbiologica.* 2005; 50(6): 524–528

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