

Laboratorní diagnostika v NRL pro stafylokoky CEM SZÚ v roce 2020

Laboratory diagnostics in the National Reference Laboratory for Staphylococci, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, in 2020

Petr Petráš, Radoslava Hutníková, Jana Kekláková

Souhrn • Summary

Národní referenční laboratoř pro stafylokoky CEM SZÚ se i v roce 2020 v rámci zajištění surveillancie stafylokokových infekcí věnovala podrobnému vyšetřování kmenů stafylokoků z humánního klinického materiálu. Celkem to bylo 975 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, B, D a enterotoxiny A–D. Informace o produkci faktorů virulence jsou důležité pro ošetřující lékaře ke správnému stanovení diagnózy a tedy i vhodné terapie. V celém souboru bylo i 58 (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, 975 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 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. 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) 2021; 30(7–8): 232–235.

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 2020 věnovala především laboratorní diagnostice v rámci zajištění surveillancie stafylokokových infekcí humánního původu. Celkem nám bylo zasláno 975 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 bylo Oddělení klinické mikrobiologie z Nemocnice na Bulovce, na čtvrtém místě Odd. klinické mikrobiologie ATB středisko Nemocnice České Budějovice.

Podle odebraného materiálu byly nejčastěji zastoupeny kmeny z různých kožních infekcí (asi 45 % všech izolátů).

V celém souboru bylo 916 (93,9 %) 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 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 pozitivitu zasláního kmene na PVL produkci je jedním z nejčastějších a nejpotřebnějších požadavků na naší laboratoř. Přítomnost genů, které PVL kódují, byla zjištěna u 108, tj. 11,8 % ze sledovaných kmenů. Stejně jako u ostatních faktorů virulence platí, že do NRL/St jsou zaslány kmeny, u nichž je pravděpodobnost toxigenity vyšší než v běžné terénní populaci.

Kmeny pozitivní na PVL pocházely nejčastěji z abscesů a zhnisaných ran, ale dostaly se k nám i dva kmeny z abscedujících pneumonií. Jedním z pacientů byl 72letý muž hospitalizovaný pro rozsáhlou alární pneumonii.

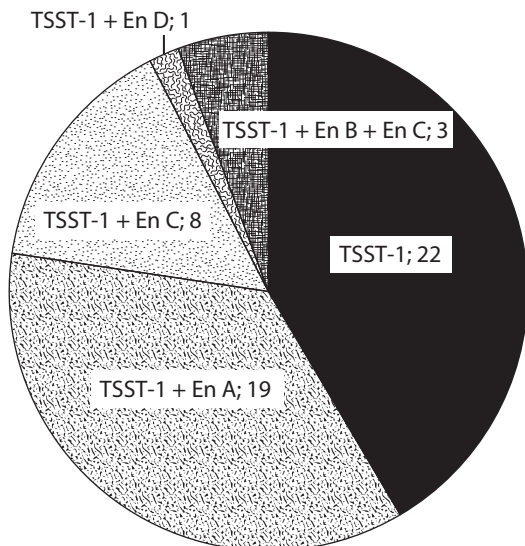
Tabulka 1: Přítomnost dalších faktorů virulence u 108 kmenů *S. aureus* pozitivních na Pantonův-Valentinův leukocidin (PVL) v roce 2020 (metoda PCR)

PVL	En A *)	En B	En C	En D	TSST-1 **)	ETD #)	MRSA ##)	celkem kmenů
+	-	-	-	-	-	-	-	54
+	-	-	-	-	-	-	+	17
+	+	-	-	-	-	-	-	19
+	-	+	-	-	-	-	-	2
+	-	+	-	-	-	-	+	6
+	-	-	-	+	-	-	-	2
+	-	-	-	+	-	-	+	3
+	-	-	-	-	+	-	-	1
+	-	-	-	-	-	+	+	1
+	-	+	+	-	-	-	+	3
celkem								108

*) En A, En B, En C a En D = enterotoxiny A, B, C a D; **) TSST-1 = toxin syndromu toxického šoku; #) ETD = exfoliatin typu D (exfoliatiny A a B nebyly u žádného PVL pozitivního kmene zjištěny); ##) Metodou PCR byla zjišťována i přítomnost genu *mecA* kódujícího rezistenci k oxalidinu a dalším beta-laktamovým antibiotikům

U kmene MSSA, izolovaného z bronchoalveolární laváže, jsme prokázali produkci PVL a enterotoxinu A. Pro postupně zhoršení stavu byl pacient přeložen na JIP, kde byla zahájena intenzivní léčba včetně úplné plicní ventilace (UPV). V medikaci byl mj. nasazen linezolid. Přes resuscitační terapii stav progredoval, došlo k multiorgánovému selhání a pacient po 9 dnech hospitalizace umírá. Druhou pacientkou s PVL infekcí byla 32letá žena hospitalizovaná s pneumonií se septickými projevy. I ona byla pro rychlé zhoršení stavu přeložena na ARK, kde byla také zahájena UPV. U kmene MSSA z aspirátu jsme prokázali pozitivitu na PVL a v medikaci byl nasazen mj. i linezolid. Přes závažnou anamnézu (i.v. narkomanka s chronickou hepatitidou C a prodělanou infekční endokarditidou) se podařilo ženu zachránit a po devíti dnech byla odeslána do spádové nemocnice.

Z celku 108 producentů PVL bylo 30 (27,8 %) MRSA a 33 izolátů (32,9 %) mělo v DNA kromě genů na PVL, i geny k produkci některého z enterotoxinů A, B a D, nebo

Graf 1: Produkce enterotoxinů u 53 kmenů *S. aureus* pozitivních na TSST-1 sledovaných v r. 2020 v NRL pro stafylokoky

toxinu TSST-1. Jeden kmen byl pozitivní na exfoliatin D (**Tabulka 1**).

Podobně jako v roce 2019 jsme dostali i vloni tři velice toxinogenní kmeny MRSA pozitivní na PVL, TSST-1 a enterotoxiny B + C. I když se jednalo o 3 různá mikrobiologická pracoviště (FTN Krč, FN Bulovka a Nemocnice v Pardubicích) i tentokrát byli pacienti vietnamské národnosti. Je zřejmé, že tento kmen v této komunitě stále koluje.

Od roku 2007 máme v NRL/St zaregistrováno 23 případů abscedujících pneumonií, u kterých jsme prokázali původce – kmen *S. aureus* s produkcí PVL. Z nich 13 pacientů zemřelo.

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 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. Z celku 916 kmenů byl TSST-1 zjištěn v 53 případech (5,8 %), 22 kmenů ho produkovalo samostatně, zbytek v kombinaci s některým typem enterotoxinu A, B, C, i D (**Graf 1**). Kmeny nejčastěji pocházely z abscesů a zhnisaných ran, shodně jako u kmenů pozitivních na PVL.

V roce 2020 nám byly v souvislosti se STŠ zaslány pouze dva kmeny. V prvním případě byl STŠ komplikací odontogenní sepse váčku u horního řezáku u 6leté dívky. Z hnisu byl vykultivován MSSA s produkcí TSST-1. Druhý kmen byl vykultivován z pochvy 14leté dívky, která onemocněla klasickým průběhem menstruačního STŠ. Citlivý kmen *S. aureus* produkoval kromě TSST-1 i enterotoxin A. V anamnéze měla pacientka použití vaginálních tampónů.

Od roku 1998 bylo v NRL/St zaregistrováno 241 případů STŠ, zemřelo 29 pacientů. Průměr činí asi 10 případů na rok

(loňský byl v tomto ohledu pozitivně výjimečný). Menstruační forma STŠ postihla 91 pacientek, vždy s úzdavou. Ve všech případech bylo v anamnéze používání menstruačních tampónů.

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 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.

Z celku 916 kmenů *S. aureus* v loňském roce jsme prokázali pozitivitu na exfoliatiny u 45 kmenů (4,9 %). Nejčastěji to byly kmeny s produkcí exfoliatinu A (29), 9 kmenů mělo kombinaci ETA + ETB, 6 kmenů bylo pozitivních na ETD a pouze jediný kmen na exfoliatin B.

Hromadný výskyt PON jsme v r. 2020 řešit nepomáhali. Exfoliatin pozitivní kmeny pocházely z různých kožních infekcí dětí i dospělých, nicméně často byly zaslány ze stejných mikrobiologických laboratoří.

Výsledky sledování exfoliatin pozitivních kmenů v NRL/St v letech 1998–2019 jsme prezentovali v únorovém čísle loňského ročníku tohoto časopisu [1].

Enterotoxiny

Kmenů pozitivních na základní typy enterotoxinů A–D bylo 354 (38,6 % ze sledovaných). Podobně jako v loňském roce byla téměř polovina producentů enterotoxinu D (170), dále typu C (82), A (68) a B (22). Na různé kombinace dvou typů enterotoxinu bylo pozitivních 12 kmenů. V několika případech menších výskytů infekcí spojených s nemocniční péčí pomohlo k prokázání shodnosti kmenů i zjištění produkce enterotoxinů.

V roce 2020 jsme zaznamenali jeden hromadný výskyt alimentární intoxikace vyvolané enterotoxinogenními kmeny *S. aureus*. V dětském táboře v Plzeňském kraji vypukla v červenci loňského roku stafylokoková enterotoxikóza, která postihla 64 dětí a 2 dospělé osoby. Klinický průběh některých postižených byl vážnější, část dětských pacientů byla převedena k ošetření Záchranou službou Plzeňského kraje, další Záchranou službou hasičského sboru. V souvislosti s tímto hromadným výskytem jsme dostali k analýze 10 kmenů stafylokoků. Z nich jsme zjistili toxinogenní kmen s typem A ve stolici jednoho pacienta, ve zhnisané ráně na ruce jednoho člena z personálu kuchyně a ze stěru nože na syrové maso.

Výsledky sledování enterotoxin pozitivních kmenů v NRL/St v letech 1972–2020 jsme prezentovali v lednovém čísle tohoto časopisu [2].

Non – *S. aureus* koaguláza pozitivní stafylokoky

Identifikovali jsme dva kmeny *S. pseudintermedius*/*S. intermedius* (rozdílení této dvojice taxonů neumí ani hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF a jsou zapotřebí podrobnější genetické metody). Jeden pocházel z Příbrami

z výtěru nosu při akutní tonsilitidě, druhý byl izolován rovněž z nosu v pražské laboratoři EUC při monitorování pacienta s nefritidou.

Dále to byl i jeden kmen druhu *S. argenteus*, který je blízké příbuzný s druhem *S. aureus*. Byl zaslán z Nemocnice na Bulovce, kde byl izolován z hemokultury 72letého pacienta.

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 věkem 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 2020 jsme dostali 56 kmenů KNS, které jsme zařadili do 14 druhů, resp. poddruhů (Tabulka 2). Nejčastěji to byly kmeny *S. petrasii* subsp. *petrasii*, a *S. haemolyticus*. Na dalších místech stejným počtem kmenů *S. lugdunensis*, *S. petrasii* subsp. *jettensis* a *S. pragensis*. Stejně jako v r. 2019 jsou tato čísla ovlivněna žádostí naší NRL/St, aby nám kolegové z terénních laboratoří tyto kmeny posílali. Nejvíce jsme jich obdrželi z Oddělení lékařské mikrobiologie v Hořovicích, z Oddělení klinické mikrobiologie nemocnice v Karlových Varech a Oddělení klinické mikrobiologie a parazitologie Oblastní nemocnice v Příbrami. Chtěli bychom Vás opět požádat o zaslání kmenů k dourčení, zejména těch, jež při identifikaci hmotnostní spektrometrií vyjdou při využití brukrovské databáze MBT 2018-7854 jako *Staphylococcus* [sp.1] nebo při využití verze databáze MBT 2019-8468 jako *S. petrasii*.

Tabulka 2: Koaguláza negativní stafylokoky z klinického materiálu v NRL pro stafylokoky v r. 2020

Č.	<i>Staphylococcus</i>	počet
1	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>petrasii</i>	10
2	<i>S. haemolyticus</i>	8
3	<i>S. lugdunensis</i>	7
4	<i>S. petrasii</i> subsp. <i>jettensis</i>	7
5	<i>S. pragensis</i>	7
6	<i>S. epidermidis</i>	4
7	<i>S. croceilyticus</i>	3
8	<i>S. warneri</i>	3
9	<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	2
10	<i>S. condimenti</i>	1
11	<i>S. ureilyticus</i>	1
12	<i>S. caprae</i>	1
13	<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	1
14	<i>S. simulans</i>	1
	celkem	56

Tabulka 3: Taxonomické změny v rodu *Staphylococcus* 2020 [Madhaiyan M, et al. lit. 5]

Původní klasifikace	hlavní zdroj	popis (první autor, rok)	nová klasifikace
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	člověk	Schleifer, 1975	<i>S. cohnii</i>
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	člověk, zvíře	Kloos, 1991	<i>S. urealyticus</i> *
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	člověk	Freney, 1988	<i>S. schleiferi</i>
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	pes	Igimi, 1990	<i>S. coagulans</i>
<i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>	jantar	Lambert, 1998	<i>S. succinus</i>
<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>	sýr	Place, 2003	<i>S. casei</i>
<i>S. petrasii</i> subsp. <i>croceilyticus</i>	člověk	Pantůček, 2013	<i>S. croceilyticus</i>
<i>S. petrasii</i> subsp. <i>pragensis</i>	člověk	Švec, 2015	<i>S. pragensis</i>
<i>S. sciuri</i>	člověk, zvíře	Kloos, 1976	<i>Mammaliococcus sciuri</i>
<i>S. lentus</i>	zvíře, člověk zřídka	Schleifer, 1983	<i>Mammaliococcus lentus</i>
<i>S. vitulinus</i>	zvíře, potravina, člověk zřídka	Webster, 1994	<i>Mammaliococcus vitulinus</i>
<i>S. fleurettii</i>	sýr z kozího mléka	Vernozy-Rozand, 2000	<i>Mammaliococcus fleurettii</i>
<i>S. stepanovicii</i>	hlodavci, hmyzožravci	Hauschild, 2012	<i>Mammaliococcus stepanovicii</i>

*) U tohoto názvu došlo ke změně samohlásky, na rozdíl od poddruhu *S. capitis* subsp. *urealyticus*, kde hláska „a“ zůstala

Změny v taxonomii rodu *Staphylococcus*

V roce 2020 byl popsán *Staphylococcus borealis* [3], podle vlastností 5 kmenů izolovaných ze stěrů lidské pokožky a hemokultury v nemocnici v norském Tromsø (borealis: mající vztah k severu). Fylogeneticky má nejblíže k druhům *S. haemolyticus* a *S. devriesei*.

Dalším navrženým novým popsáním druhem je '*Staphylococcus ursi*' – izolovaný ze zdravých černých medvědů v Národním parku Great Smoky Mountains v Tennessee [4]. Podle vlastností je příbuzný s druhy ze skupiny SIG (*S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. cornubiensis* a *S. delphini*), nicméně je koaguláza negativní. Jeho název však nebyl pro nesplnění potřebných podmínek dosud validován.

Na konci října 2020 vyšla v časopisu International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) rozsáhlá publikace indických bakteriologů s návrhem taxonomických změn v rodu *Staphylococcus*, které byly provedeny na základě analýzy výsledků celogenomového sekvenování a dalších molekulárních metod [5]. Pět poddruhů bylo reklasifikováno jako druhy a pět oxidáza pozitivních stafylokokových druhů z bývalé skupiny "*S. sciuri* group" bylo z rodu vyjmuto a přearženo do nově zavedeného rodu *Mammaliococcus* (Tabulka 3) [viz též naše články 6 a 7].

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. I v r. 2020 jsme spolupracovali na přípravě publikace popisující nový druh stafylokoků z klinického materiálu.

Spolupracovali jsme i s doc. Jiřím Řehulkou, CSc., z Oddělení zoologie Slezského muzea v Opavě [8].

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, Kečláková 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
- [2] 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
- [3] Pain M, Wolden R, Jaen-Luchoro D. *Staphylococcus borealis* sp. nov., isolated from human skin and blood. *IJSEM*. 2020; 70: 6067–6078
- [4] Perreten V, Kania SA, Bernis D. *Staphylococcus ursi* sp. nov., a new member of the "*S. intermedius* group" isolated from healthy black bears. *IJSEM*. 2020; 70: 4637–4645
- [5] Madhaiyan M, Wirth JS, Saravanan VS. Phylogenomic analyses of the *Staphylococcaceae* family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliococcus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family *Staphylococcaceae*. *IJSEM*. 2020; 70(11): 5926–5936
- [6] Petráš P, Švec P. Taxonomické změny v rodu *Staphylococcus*. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2020; 29(11): 444–446
- [7] Petráš P. Upřesnění k článku "Taxonomické změny v rodu *Staphylococcus*". *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*. 2021; 30(2): 61
- [8] Řehulka J, Marejková M, Petráš P. Staphylococcal infections of freshwater fishes in Czech Republic. *Bull Eur Ass Fish Pathol*. 2020; 40(5): 189–198

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