

Náhodný záchyt toxického kmeňa *Corynebacterium diphtheriae*

Martina Dobříková

Klinická mikrobiológia, Medirex, a. s., Košice

Diftéria patrila v minulosti k hlavným príčinám detskej chorobnosti a úmrtnosti. Toxické kmene *Corynebacterium diphtheriae* stále cirkulujú vo svete vrátane Európy, Severnej a Južnej Ameriky, Indie, Afriky, Južnej Ázie a východného Stredomoria. Po zavedení očkovania sa celosvetovo podarilo znížiť počty prípadov ochorenia. Avšak vplyv na rozvinutie ochorenia má i strata imunity po očkovaní, zhoršovanie socioekonomických podmienok, pokles preočkovanosťi populácie, či „antivakcinačný“ trend. V súčasnosti by lekári mali brať do úvahy aj možnosť jej zavlečenia migrujúcim obyvateľstvom a utečencami z oblastí s endemickým výskytom, hlavne z rozvojových krajín, kde je vyššie percento bezpríznakového nosičstva v populácii. Vzhľadom na nárast migrácie a turizmu je potrebné udržať vysokú preočkovanosť a dôsledne monitorovať toto ochorenie.

Kľúčové slová: *Corynebacterium diphtheriae*, diftéria, toxický kmeň, očkovanie

Accidental capture of the toxic strain Corynebacterium diphtheriae

In the past diphtheria belonged to one of the main causes of childhood morbidity and mortality. Toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* are still present worldwide, including Europe, North and South America, India, Africa, South Asia and the Eastern Mediterranean. After the introduction of vaccination, worldwide cases of the disease have been reduced. However, the loss of immunity after vaccination, deterioration of socio-economic conditions and a decrease in vaccination rate or „anti-vaccination“ trend can also have an impact on disease development. Nowadays, the clinicians should consider the possibility of spreading toxigenic strains from areas with endemic prevalence, especially from developing countries with a higher percentage of asymptomatic carriage in the population and its connection with migration and refugees. Due to the increase of migration and tourism, it is necessary to maintain a high vaccination rate and to monitor diphtheria consistently.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*, diphtheria, toxic strain, vaccination

NewsLab, 2019; roč. 10 (2): 102 – 105

Úvod

Epidemiológia

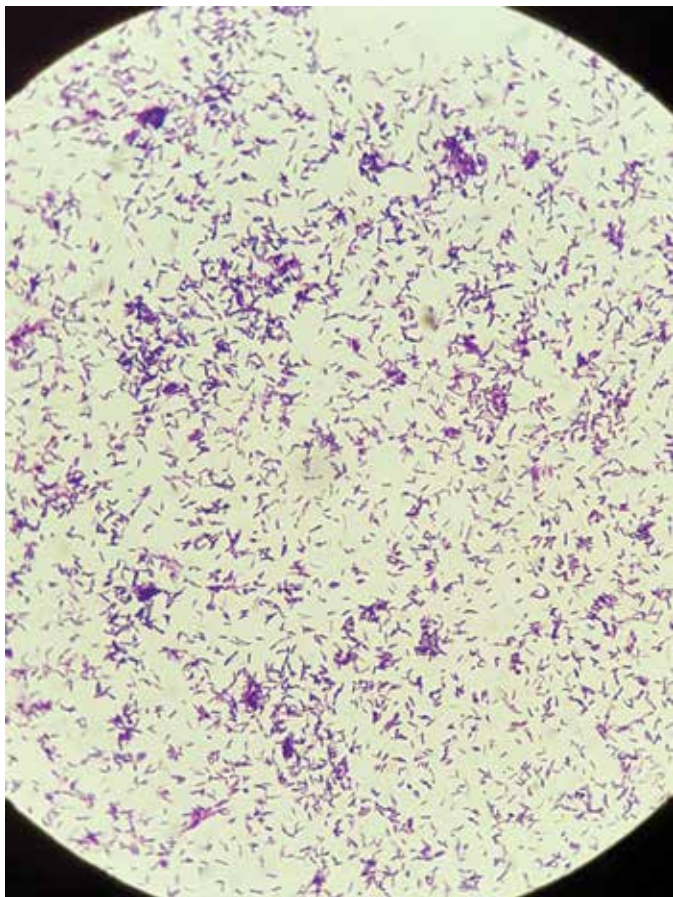
V predvakcinačnej ére bola diftéria jednou z najčastejšie sa vyskytujúcich infekčných ochorení u detí s vysokou úmrtnosťou. Po vytvorení toxoidovej vakcíny v r. 1923 a následne po zavedení povinného očkovania v roku 1946 sa toto ochorenie podarilo prakticky celosvetovo eliminovať⁽¹⁾. Avšak na konci 80. rokov vypukla vo veľkých mestách v Rusku rozsiahla epidémia, ktorá sa do roku 1995 rozšírila do všetkých postsovietskych krajín. Celkovo bolo zaznamenaných 157 000 prípadov s 5 000 úmrtiami. Príčinami boli jednak environmentálne faktory, ako migrácia obyvateľstva a pokles socioekonomických podmienok, ale aj chyby v očkovanom programe a v zásobovaní očkovacími látkami⁽²⁾. Väčšina z nakazených pacientov dosiahla vek viac ako 15 rokov. Kľúčové bolo spojenie dvoch faktorov, a to veľký počet neimunizovaných dospelých a nedostatočná vakcinácia u detí. Medzi pacientov s ťažkým priebehom patrili dospelí vo veku 40 až 49 rokov, u ktorých sa v ich detskom veku vakcinácia DTP (diftéria – tetanus – pertussis) ešte len zavádzala. U mladších pacientov sa predpokladá, že zlyhala tzv. imunologická pamäť, k čomu prispel aj vekový posun preočkovania, zo 6 na 9 rokov. Po celoplošnej imunizácii obyvateľov s odlišným režimom aplikácie vakcíny sa dosiahlo zníženie výskytu ochorenia koncom roka 2001 na 12 % a následne na 0,2 % koncom roka 2015⁽³⁾.

V súčasnosti sa úmrtnosť na diftériu napriek adekvátnej liečbe pohybuje medzi 5 – 10 % u detí mladších ako 5 rokov a u osôb nad 40 rokov dosahuje až 20 %. U neliečených pacientov je úmrtnosť až u polovice prípadov⁽²⁾. Odhaduje sa, že celosvetovo sa ročne vyskytuje približne 5 000 prípadov ochorení⁽³⁾. Na Slovensku bol posledný prípad ochorenia zaznamenaný v roku 1980⁽⁴⁾.

Pôvodca ochorenia a jeho klinické prejavy

Pôvodcom nákazy je výlučne ľudský patogén *Corynebacterium diphtheriae*, grampozitívna fakultatívne anaeróbna, pleomorfná baktéria (**obrázok 1**). Mikroskopicky je charakteristická palisádovitým usporiadaním s metachromatickými granulami v cytoplazme, ktoré možno dokázať farbením podľa Alberta alebo Neissera. Rastie na bežných pôdach s prímiesou krvi alebo séra s tvorbou hemolýzy (**obrázok 2**). Podľa vzhľadu kolónií rozlišujeme štyri biotypy: gravis, mitis, intermedius a belfanti⁽⁵⁾. Na selektívno-diagnostických pôdach so soľami telúru tvorí v dôsledku jeho redukcie čiernohnedé kolónie so sivou zónou (**obrázok 3**).

Nosičstvo tejto baktérie v nosohltane alebo na koži sa vyskytuje približne u 3 – 5 % ľudí, avšak v populácii s dostatočnou hygienou a postvakcinačnou imunitou zriedkavo vyvoláva ochorenie. Baktéria môže prežívať týždne v prachu a na kontaminovaných predmetoch. Zdrojom nákazy je chorý človek, ktorý sa infikuje vdychovaním kontaminovaného vzduchu. Ochorenie s inkubačnou dobou 2 až 5 dní môže

Obrázok 1. *Corynebacteriae diphteriae*: farbenie podľa Grama**Obrázok 2.** *Corynebacteriae diphteriae* na krvnom agare

postihovať všetky mukózne sliznice, avšak *Corynebacterium diphteriae* prevažne infikuje respiračný trakt a častá je i kožná forma⁽⁵⁾. Klinický obraz závisí od stavu imunity hostiteľa a miesta vstupu infekcie. Môže prebiehať od asymptomatickej kolonizácie cez mierne respiračné ochorenie až po fulminantnú diftériu s rozvojom myokarditídy, polyneuritídy a toxickej nefritídy⁽⁶⁾. Najčastejším miestom vstupu baktérie do organizmu sú horné dýchacie cesty, kde sa tvoria typické pseudomembrány z fibrínu, nekrotických buniek a leukocytov (**obrázok 4**). Pseudomembrány vznikajúce na sliznici

Obrázok 3. *Corynebacteriae diphteriae* na Claubergovej pôde s obsahom telúru**Obrázok 4.** Difterické pseudomembrány v tonzilách

zdroj: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Dirty_white_pseudomembrane_classically_seen_in_diphtheria_2013-07-06_11-07.jpg

dýchacích ciest sa môžu uvoľniť so vznikom mechanickej obštrukcie s následným dusením a zakrvácaním. Ochorenie je sprevádzané výrazným zdurením lymfatických uzlín a vysokou teplotou. Kožná forma diftérie sa vyskytuje prevažne v tropických krajinách, pričom klinický obraz varíruje od kožných eflorescencií až po chronické nehojace sa vredy. Baktérie sa postupne uvoľňujú z lézií, ktoré slúžia ako rezervoár pri šírení infekcie. Infekciozita pacienta s kožnou formou trvá dlhšie ako pri respiračnej forme. Táto forma diftérie postihuje prevažne ľudí s nižším socioekonomickým statusom.

Hlavným faktorom patogenity je difterický toxín, kódovaný tox génom, ktorý sa šíri prostredníctvom beta-bakteriofágu⁽⁷⁾. Na molekulovej úrovni je toxín zložený z dvoch podjednotiek (polypeptid A a B). Polypeptid B sa viaže na cytoplazmatickú membránu bunky a umožňuje polypeptidu A prechod do cytoplazmy s následnou blokádou proteosyntézy na ribozómoch⁽⁵⁾. Produkcia toxínu sa *in vitro* dokazuje precipitačnou reakciou s protilátkami, tzv. Elekovým testom a *in vivo* na morčatách. PCR test slúži len na dôkaz prítomnosti génu, nie však tvorby toxínu⁽²⁾.

Terapia a prevencia diftérie

V priebehu dvadsiatich rokov 19. storočia bola diftéria klinicky vyčlenená od iných foriem angíny. V roku 1883 Klebs dokázal, že *Corynebacterium diphtheriae* je vyvolávateľom diftérie, o rok neskôr ju Loeffler vykultivoval z nazofaryngeálnej dutiny. V roku 1888 Roux a Yersin dokázali, že hlavným faktorom patogenity je difterický exotoxín⁽⁷⁾. V roku 1923 bola vynájdená vakcína proti záškrtu, ktorá sa vo veľkom začala používať v USA a ostatných industrializovaných krajinách⁽³⁾.

Liečbou akútnej infekcie je podanie antitoxínu a antibiotickej liečba. Antitoxín neutralizuje voľný cirkulujúci toxín, avšak nepôsobí na toxín naviazaný na bunky⁽³⁾. Antibiotická liečba eliminuje baktérie, a tým zabraňuje ďalšej produkcii toxínu. Liekmi voľby sú penicilín a erytromycín⁽⁹⁾. U pacientov s alergiou na penicilín alebo netolerujúcich erytromycín sa odporúča rifampicín a klindamycín. Po 48 hodinách antibiotickej terapie sa pacient už nepovažuje za infekčného⁽¹⁰⁾.

Imunitu možno získať očkovaním alebo prekonaním ochorenia spôsobeného toxickým kmeňom. Očkovanie nechráni pred osídlením samotnou baktériou, ale bráni vzniku a rozvoju ochorenia. Podľa štatistik výraznejší ústup ochrany po očkovaní nastáva po štyridsiatke, najohrozenejší sú päťdesiatnici⁽¹¹⁾. Očkuje sa difterickým toxoidom, čo je toxín upravený formalínom, pri ktorom dochádza k strate toxicity a zachovaniu imunogenity. Toxoid vyvoláva tvorbu neutralizujúcich protilátok. Hladiny neutralizačných protilátok možno stanoviť z periférnej krvi. V minulosti sa používal kožný Shickov test, pri ktorom sa intradermálne podávalo malé množstvo difterického toxoidu so sledovaním erytému a zdurenia v mieste vpichu.

Prvá dávka očkovacej látky sa podáva deťom v kombinácii s očkovacou látkou proti ďalším piatim ochoreniam (tetanus, čierny kašeľ, vírusová hepatitída B, hemofilové invazívne infekcie, detská obrna). Základné očkovanie sa skladá z troch dávok vakcíny, podaných v 3., 5. a 11. mesiaci veku dieťaťa. Na dosiahnutie ochrannej hladiny protilátok až do dospelosti je potrebné preočkovanie detí v 6. a 13. roku života. Dvojkombináciou očkovacej látky proti tetanu a záškrtu sa preočkovávajú dospelé osoby každých 15 rokov⁽¹²⁾.

Kazuistika

Pri kultivačnom vyšetrení materiálu z horných dýchacích ciest (výter z nosa) u 14-ročného pacienta s diagnózou akútnej sínusitídy bol začiatkom decembra v roku 2018 zachytený a identifikovaný metódou hmotnostnej spektrometrie (MALDI-TOF, Bruker, Nemecko) kmeň *Corynebacterium diphtheriae*. Pre verifikáciu identifikácie a zistenie produkcie toxínu bol kmeň dňa 11. 12. 2018 zaslaný do Národného referenčného centra pre diftériu (NRC) v Košiciach. Toxicita kmeňa bola testovaná na bunkovej línii Vero, čo sú bunkové línie

Tabuľka 1. Citlivosť kmeňa *Corynebacterium diphtheriae* na antibiotiká diskovým difúznym testom, podľa EUCAST 2019⁽¹³⁾

ATB	výsledok	ATB	výsledok
penicilín	C	gentamicín	C
klindamycín	C	tetracyklín	C
ciprofloxacín	C	linezolid	C

C – citlivý

získané z epiteliálnych buniek obličiek opíc druhu makak. S výsledkom kultivačného vyšetrenia bol oboznámený obvodný pediater a regionálny epidemiológ. Vyšetrením kvalitatívnej antibiotickej (ATB) citlivosti difúznym diskovým testom (**obrázok 5**) sa zistila citlivosť kmeňa na sledované antibiotiká, t. j. penicilín, klindamycín, ciprofloxacín, gentamicín, tetracyklín a linezolid (**tabuľka 1**).

Dňa 27. 12. 2018 bol doručený výsledok vyšetrenia z NRC pre diftériu s potvrdenou identifikáciou: *Corynebacterium diphtheriae* biotyp *gravis*, s produkciou toxínu.

Od obvodného pediatra a epidemiológa bola doplnená sociálna, rodinná a cestovateľská anamnéza. Ide o 14-ročného chlapca rómskeho pôvodu s rásžtepom podnebia, u ktorého dochádza k častým recidívam akútnej sínusitídy. V našom laboratóriu boli u tohto pacienta opakovane kultivačne identifikované *Streptococcus pyogenes* a *Moraxella catharralis* s dobrou citlivosťou na testované antibiotiká. Na základe poskytnutých informácií od pediatra je pacient riadne očkovaný podľa očkovacieho kalendára, čomu zodpovedá aj plne ochranná hladina protilátok doplnená vyšetrením v NRC pre diftériu s hodnotou 0,65536 IU/ml. Pacient býva v obci Brekov (okres Humenné) s dvoma sestrami, rodičmi a so starou matkou v dobrých sociálnych podmienkach. Do Humenného dochádza k svojmu obvodnému pediaterovi. Kontakt s migrantmi epidemiológ nepovažuje za možný zdroj infekcie, keďže pacient nepochádza priamo z Humenného a cesta na stanicu sa nenachádza v blízkosti azylového centra. Kontakty v škole v Strážskom epidemiológ neprešetroval vzhľadom na chýbajúce klinické symptómy typické pre diftériu, ktoré sa nezistili ani pri otorinolaryngologickom a neurologickom vyšetrení. V cestovateľskej anamnéze pacient neudáva pobyt na Ukrajine, uvádza však vycestovanie s rodinou do Spojeného kráľovstva pred štyrmi rokmi. Kultivačné vyšetrenia ostatných členov rodiny boli negatívne. Matka a stará matka sa nepodrobili vyšetreniu z dôvodu nespolupráce. Napriek

Obrázok 5. Antibiotická citlivosť diskovou difúznou metódou



tomu, že kultivačné vyšetrenie sestier pacienta bolo negatívne, epidemiológovia predpokladajú, že ide o nosičský kmeň získaný v školskom prostredí. Kontrolné kultivačné vyšetrenia pacienta po preliečení antibiotikami boli opakovane negatívne.

Diskusia

U viacerých náchylných osôb sa vyvinie skôr prechodné nosičstvo v nazofaryngu ako samotné ochorenie, o čom svedčí opisovaný prípad. Bez pôsobenia antibiotík preživa väčšina mikroorganizmov v nosohltane približne dva týždne, pričom chronickí nosiči môžu vylučovať *Corynebacterium sp.* až 6 mesiacov. Asymptomatické nazofaryngeálne nosičstvo je pravdepodobne vzhľadom na lepší skrínigový program viac zdokumentované v endemických regiónoch ako v oblastiach, kde sa diftéria vyskytuje len sporadicky. Avšak aj pri podozrení na diftériu môže byť laboratórna diagnostika obtiažna. Je to zapríčinené tým, že *Corynebacterium diphtheriae* je ťažko rozpoznateľná na bežnom krvnom či čokoládovom agare. Navyše výtery z dýchacích ciest od asymptomatických nosičov môžu obsahovať len malé množstvo baktérií, ktoré sú po kultivácii prekryté bežnou bakteriálnou flórou horných dýchacích ciest⁽¹⁴⁾. Preto sa táto baktéria bežne nezachytáva, čo môže skresľovať reálny epidemiologický stav na Slovensku.

Imunita indukovaná vakcínou v priebehu života klesá a pri nedostatočnom preočkovaní počet vnímavých osôb stúpa. Na základe sérologickej štúdie bolo zistené, že 20 – 60 % svetovej populácie má protilátky proti diftérii pod minimálnou ochrannou hladinou⁽¹⁵⁾. V prípade, že dôjde k nárastu počtu takto náchylných obyvateľov, existuje reálne nebezpečenstvo vypuknutia epidémie. Aby sa tomu zabránilo, je nevyhnutná dobrá a rýchla spolupráca klinických lekárov, epidemiológov a sociálnych pracovníkov. Tí by mali kooperovať v rýchlej diagnostike a manažmente jednotlivých prípadov ochorenia, vo vyšetrení osôb, ktoré boli v kontakte s pacientom a imunizácii vybraných skupín obyvateľstva s cieľom predísť sekundárnym nákazám⁽¹⁶⁾.

Hrozbou pre zdravie populácie okrem toxických kmeňov sú kmene, ktoré nesú *tox* gén, avšak neprodukujú toxín.

K expresii tohto génu nedochádza v dôsledku delécie alebo inzercie nukleotidu na A podjednotke⁽¹⁷⁾. Za určitých okolností môže byť bakteriofág neaktívny (vysoká koncentrácia železa), respektíve nemusí dôjsť k expresii *tox* génu (inzercia bakteriálnej DNA v géne difterického toxínu). Po expozícii lyzátu dvoch iných netoxigénnych kmeňov sa môže stať takýto kmeň toxigénnym v dôsledku rekombinácie jeho DNA. To znamená, že prítomnosť netoxigénnych kmeňov v populácii predstavuje reálne nebezpečenstvo pre ich možnú konverziu na toxigénne kmene⁽¹⁸⁾.

Ďalším zdrojom nebezpečnej infekcie môžu byť druho- príbuzné patogény zvierat, akými sú *Corynebacterium pseudotuberculosis* a *Corynebacterium ulcerans*. Oba druhy môžu obsahovať beta-bakteriofág s *tox* génom, ktorý je schopný lyzovať všetky tri druhy a následne infikovať netoxické kmene *Corynebacterium diphtheriae*.

V súčasnosti okrem toxických kmeňov, ktoré môžu byť do našej krajiny zavlečené z endemických regiónov vrátane krajín východnej Európy, narastá výskyt netoxických, ale invazívnych kmeňov napriek vysokej zaočkovanosti. Takéto kmene sú schopné vyvolať endokarditídu, artritídu, bakteriémiu či osteomyelitídu. Na rozdiel od toxických kmeňov za vyššiu invazivitu netoxických kmeňov nie sú zodpovedné bakteriofágy nesúce gén, ale génové lokusy na chromozóme baktérie. Preto je potrebné sledovanie molekulových zmien v cirkulujúcich kmeňoch, v ktorých môže narastať invazivita a patogenita. Na základe týchto poznatkov by bolo možné následne vyvinúť novú vakcínu proti netoxickým, avšak invazívnym kmeňom⁽¹⁹⁾.

Záver

Zachytený kmeň *Corynebacterium diphtheriae* izolovaný z nazofaryngu maloletého pacienta bol identifikovaný NRC pre diftériu ako toxický. Na základe diagnózy a epidemiologickej analýzy bol tento prípad vyhodnotený ako výskyt asymptomatického nosičstva. Vzhľadom na to, že ide o rizikového pacienta s rázštepom podnebia, s pravdepodobným kontaktom s osobami z endemických oblastí a možnou klesajúcou postvakcinačnou imunitou, je vhodné sledovať tohto pacienta aj v budúcnosti.

LITERATÚRA

1. Karzon DT, Edwards KM. Diphtheria outbreaks in immunized population, *N Engl J Med* 1988; 318: 41-43.
2. Tejpratap SP T. Diphtheria, *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease (Ninth Edition)* 2013; 402-406.
3. https://www.who.int/immunization/sage/meetings/2017/april/1_Final_report_Clarke_april3.pdf
4. <http://www.uvzs.sk/en/index.php/documents/12-importance-of-vaccination>
5. Forbes BA. „Did I Hear You Correctly? The Organism Identified Was *Corynebacterium diphtheriae*?“ *Clinical Microbiology Newsletter* 2017; 39(5): 35-41.
6. Hadfield TL, McEvoy P, Polotsky Y, et al. The pathology of diphtheria. *J Infect Dis* 2000; 181(1): 116-120.

7. Sangal V, Burkovski A, Hunt AC, et al. A lack of genetic basis for bi-ovar differentiation in clinically important *Corynebacterium diphtheriae* from whole genome sequencing, *Infection, Genetics and Evolution* 2014; 21: 54-57.
8. Murphy JR. *Corynebacterium diphtheriae*. In: Baron EJ. *Medical microbiology*. Galveston, TX: University of Texas Medical Branch at Galveston 1996: 1-13.
9. American Academy of Pediatrics. Diphtheria. In: Pickering LK, Baker CJ, Long SS, McMillan JA, eds. *Red Book: 2009 Report of the Committee on Infectious Diseases*, 28th edn. Elk Grove Village: American Academy of Pediatrics; 2009: 280-283.
10. Weinbaum C. Diphtheria. In: Hamborsky J, Kroger A, Wolfe C, editors. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases*. 13th ed. Washington DC: Public Health Foundation; 2015. 10717p.