УДК 579:61

ВЗАИМОСВЯЗЬ ВНУТРИВИДОВОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ ПАТОГЕННОСТИ СТАФИЛОКОККОВ КОЖИ

[1]Фалова О.Е., [2]Потатуркина-Нестерова Н.И., [3]Ильина Е.Н.

[1]ФГОУ ВПО «Ульяновский государственный технический университет», Ульяновск, e-mail: falova@rambler.ru;

[2]ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск;

[3]ФГБУ НИИ «Физико-химической медицины ФМБА России», Москва

Произведена оценка состояния микрофлоры кожи людей на фоне различных хронических дерматозов. Выявлены значительные изменения в составе микробиоценоза кожи в виде преобладания грамположительной флоры, в частности, представителей *Staphylococcus spp*. Исследование проводили на пораженных и интактных участках кожи. Обнаружена высокая частота встречаемости золотистого стафилококка как на пораженных участках кожи, так и интактных. С целью установления идентичности исследуемых штаммов стафилококков проведено типирование международным набором бактериофагов и определена частота встречаемости наиболее частых фаговаров. Методом полимеразно-цепной реакции исследованы генетические детерминанты некоторых свойств патогенности стафилококков. Выявлена частота встречаемости генов, детерминирующих энтеротоксины золотистого стафилококка и представителей коагулазоотрицательных стафилококков. Обсуждается возможная взаимосвязь различных фаговариантов стафилококков с их генетическими детерминантами патогенности.

Ключевые слова: микрофлора кожи, стафилококки, фаготипирование, генотипирование стафилококков, хронические дерматозы

INTERRELATION OF INTRASPECIFIC VARIETY AND GENETIC DETERMINANTS OF SKIN'S STAPHYLOCOCCUS PATHOGENICITY

[1]Falova O.E., [2]Potaturkina-Nesterova N.I., [3]Ilina E.N.

[1]Ulyanovsk state technical university, Ulyanovsk, e-mail: falova@rambler.ru;

[2]Ulyanovsk state university, Ulyanovsk;

[3]Physical and chemical medicine research institute, Moscow

This article deals with assessment of people's skin microflora with various chronic dermatoses. Considerable changes in microbiocenosis skin's structure in the form of grampozitive flora prevalence, in particular, representatives of *Staphylococcus spp*. are revealed. Research on the struck and intact skin sites was conducted. High frequency of *Staphylococcus aureus* on the struck skin, and intact skin is found. For the purpose to identify studied staphylococcus strains the tipirovaniye is carried out by the international set of bacteriophages. The frequency of the most frequent fagotypes is determined. By the polimerazno-chain reaction, method genetic determinants of some properties of *Staphylococcus spp.* pathogenicity were investigated. Frequency of *Staphylococcus aureus* enterotoxin's genes determinants and koagulazonegative staphylococcus representatives is revealed. The possible interrelation of various staphylococcus phages types with their pathogenicity genetic determinants is discussed.

Keywords: skin microflora, staphylococcus spp., genotyping, phagotyping, chronic dermatoses

В настоящее время доказан факт смещения микробного равновесия микробиоценозов кожи при различных хронических дермопатологиях [6]. Определены основные ключевые сочлены таких видоизмененных микробных сообществ, в качестве которых выступают бактерии рода *Staphylococcus ssp*. [2, 4]. Причем отмечается обсемененность как пораженных патологическим процессом участков кожи, так и прилегающих здоровых участков [8]. Особая роль при этом отводится коагулазоположительным и коагулазоотрицательным стафилококкам. В ряде работ показано, что при псориазе происходит вытеснение облигатных представителей микрофлоры транзиторными сочленами микросообщества [6]. При экземе отмечен значительный рост грамположительной кокковой флоры, представленной в основном бактериями рода *Staphylococcus*, в меньших количествах – *Streptococcus* [7]. Показано, что патогенные микроорганизмы *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes* вытесняют представителей резидентной микрофлоры [8]. При атопическом дерматите (АД) некоторыми авторами установлено, что у 75 % обследованных высевается *S. aureus в* титрах Iog_{10} 5,2 ± 1,2 КОЕ/см^2, а при тяжелом течении АД – только *S. aureus в* титрах Iog_{10} 5,7 ± 0,8 КОЕ/см^2 [1, 8].

Значительное внимание уделяется факторам патогенности и вирулентности, обуславливающим длительное персистирование стафилококков. К таким факторам относят гемолитическую, лецитовителлазную, лизоцимную и антилизоцимную активности и др. [3].

С учетом тяжести течения перечисленных кожных дерматозов и их невыясненной

до настоящего времени этиологии остается актуальным изучение микрофлоры кожи и ее патогенетической роли в развитии кожных дерматозов.

В связи с этим **целью настоящей работы** явилось изучение частоты встречаемости генов, детерминирующих патогенность стафилококков, выделенных с кожи людей при хронических дерматозах, и анализ возможной взаимосвязи внутривидового разнообразия стафилококков с их генетическими детерминантами патогенности.

Материалы и методы исследования

Исследованы смывы с кожи, полученные от 250 лиц в возрасте от 18 до 80 лет, находящихся в стационаре областного кожно-венерологического диспансера г. Ульяновска с хроническими дерматозами: псориаз (43,1%), экзема (38,6%), атопический дерматит (18,1%). Контрольную группу составили 80 практически здоровых человек, репрезентативных по полу и возрасту.

Забор исследуемого материала производили с пораженных и интактных участков кожи ватным тампоном, смоченным 0,85% раствором хлористого натрия. Смывы в количестве 0,1 мл засевали на питательные среды, через 48 часов подсчитывали количество выросших колоний и пересчитывали на 1 $см^2$ кожи по Иванову (1984). Идентификацию микроорганизмов осуществляли по стандартным методам. Качественное и количественное исследование микробиоценозов кожи осуществляли на базе бактериологической лаборатории Городской клинической больницы № 1 г. Ульяновска (зав. лабораторией – Волгина Т.И.).

Фаготипирование выделенных стафилококков проводили Международным набором бактериофагов по методике, рекомендуемой инструкцией, прилагаемой к набору фагов.

Выделение геномной ДНК стафилококков проводили с использованием набора «Политуб» (ТУ-9398-410-17253567-97) (ООО НПФ Литех, Россия) в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Для установления наличия генов, детерминирующих синтез стафилококковых энтеротоксинов (гены *sea – sed*, *sei – sej*), применена традиционная ПЦР с использованием предложенных ранее праймеров [11, 12, 13, 14].

Все полученные данные подвергали статистической обработке с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007. Производили подсчет средних арифметических, отклонений от среднего, достоверность различий определяли по критерию t по Стьюденту. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Из всех обнаруженных на пораженных участках кожи микроорганизмов 79,8% составляли стафилококки, на интактных участках частота встречаемости стафилококков составила 81,3% случаев. Причем на долю золотистого стафилококка приходилось 43,8% случаев в количественном значении 806,7 ± 139 КОЕ/$см^2$ на пораженных участках и 22,2% (141,2 ± 64,3 КОЕ/$см^2$) – на интактных ($p < 0,05$).

В результате работы установлено, что 56,3% штаммов от общего количества выделенных культур типировались Международным набором бактериофагов, что согласуется с данными, имеющимися в литературе [9].

Была проанализирована принадлежность выделенных штаммов *S. aureus* к фагогруппам в зависимости от источника их выделения (пораженные участки кожи и интактные). Как показывают результаты, штаммы, выделенные с пораженных участков кожи, типировались бактериофагами в 60,7% случаев, а выделенные с интактных участков – в 58,8% случаев ($p > 0,05$).

Следует отметить, что фагопейзаж стафилококков, выделенных из смывов с кожи лиц с хроническими дерматозами, характеризовался значительным разнообразием. Наибольшую чувствительность изученные штаммы проявили к бактериофагам третьей фагогруппы, составив 37,0% случаев от числа типируемых штаммов. Значительно большее количество штаммов принадлежало к смешанной группе – 55,5% случаев, и менее всего штаммы проявили чувствительность к бактериофагам второй фагогруппы – 3,7% случаев. Анализ фагомозаики изученных штаммов в зависимости от участка кожи, с которого они были выделены, показал, что, штаммы, выделенные с интактных участков кожи, в основном принадлежали к смешанной фагогруппе (60,0%), в то время как выделенные с пораженных участков кожи относились к смешанной фагогруппе в 52,5% ($p < 0,05$). Следует отметить, что лизис штаммов третьей фагогруппой отмечен в 41,2% на пораженной коже и в 30% случаев – на интактных участках ($p < 0,05$). Чувствительность к фагам первой группы с интактной кожи проявили штаммы стафилококка в 10% случаев. К пятой фагогруппе относились только 5,8% штаммов, выделенных с пораженной кожи. Проведенное исследование не обнаружило фаговары других групп.

Фаготипирование дает возможность выявить принадлежность стафилококков к тому или иному фаговару вследствие специфичности используемых бактериофагов, что позволяет судить об эпидемиологической роли и значимости стафилококков. Исследование же генетической гетерогенности штаммов возможно при применении современных молекулярно-генетических методов исследования структуры ДНК. Так, определение генетических детерминант патогенности позволяет на генетическом уровне охарактеризовать патогенный потенциал микроорганизмов [10]. В связи с этим основу анализа составили гены, детерминирующие синтез энтеротоксинов A, B, C и др., т.е. те гены, продукты которых могут оказать влияние на состояние иммунореактивности

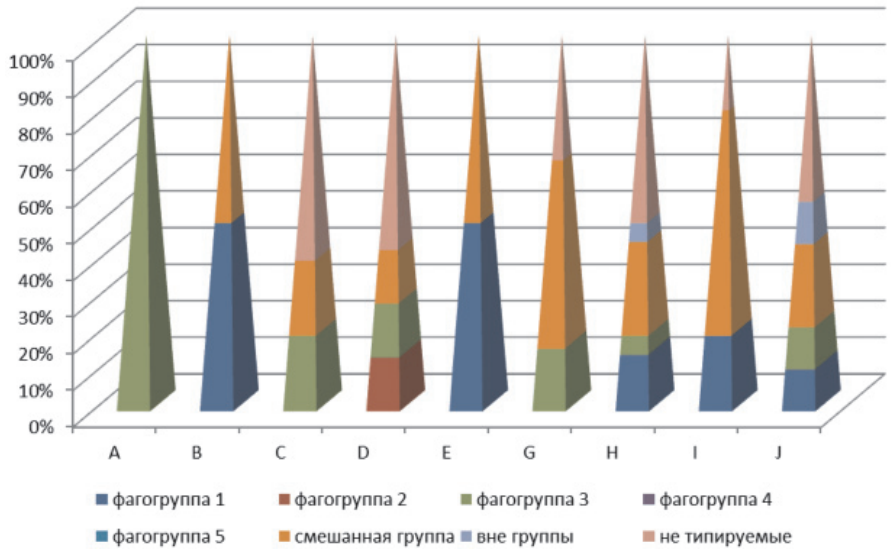
макроорганизма [5]. Результаты проведенных исследований показали наличие генов, детерминирующих токсинообразование стафилококков у 40,5% изученных штаммов. Следует отметить, что частота встречаемости указанных генов у штаммов *S. aureus* составила 86,7%, а у коагулозоотрицательных штаммов – 13,3% случаев.

Обнаружена значительная вариабельность в наборе генов, детерминирующих синтез этих токсинов у клинических изолятов стафилококков. Так, изученные штаммы имели от одного до четырех генов в различных сочетаниях. В геноме 35 изолятов обнаружен только один ген из *sea – sei*. У 20 штаммов преобладали по два гена и у 20 штаммов – от трех до четырех генов. В целом из общего количества генетических детерминант токсинообразования преобладали гены *seg* – 26,8%, *seh* – 17,1% случаев.

Исходя из значительной видовой вариабельности грамположительной флоры в микробиоценозе кожи исследуемых лиц, была проанализирована частота встречаемости генов, определяющих токсинообразование стафилококков в зависимости от видовой принадлежности штаммов.

Наибольшим разнообразием генов обладали штаммы золотистого стафилококка, среди которых преобладал ген *seg*. В связи с тем, что среди коагулазоотрицательных штаммов стафилококков наибольшую частоту встречаемости показали гемолитический и эпидермальный стафилококки, а доля остальных оказалась незначительна, то анализ генов, детерминирующих токсинообразование, осуществляли только у этих видов стафилококков, что показало у *S. haemolyticus* наличие только генов *seb u sed,* у эпидермального стафилококка только *seh*.

Следующим этапом была проанализирована взаимосвязь встречаемости генетических детерминант патогенности стафилококков и обнаруженных фаговаров (рисунок).



Соотношение генетических детерминант энтеротоксигенности стафилококков с принадлежностью к фаговарам

Как видно из рисунка, соотношение двух исследуемых признаков «энтеротоксигенность – фаговар» представляет достаточно мозаичную структуру для изученных культур стафилококков. Для тех штаммов стафилококков, которые относились к третьей и смешанной фагогруппам, обнаружено наличие генетических детерминант энтеротоксинов *seb, see, seh*. Наличие же таких генов, как *sec, sed,* принадлежало стафилококкам, которые не типировались международным набором бактериофагов. Выявлена корреляция признаков между фаговариантом штаммов стафилококков и частотой обнаружения гена токсигенности *seh* ($r = 0,83$), *sec* ($r = 0,9$), *sed* ($r = 0,82$), *seg* ($r = 0,93$).

Выводы

В ходе проведенного исследования выявлено, что на фоне хронических дерматозов происходят изменения состояния микропейзажа кожи. Отмечено превалирование грамположительной кокковой флоры в составе сочленов микробиоценоза, причем основная доля отводится бактериям рода *Staphylococcus spp*. С целью установления внутривидовой идентификации штаммов, колонизирующих пораженные и интактные участки кожи, проведено типирование международным набором бактериофагов. Результаты показали, что 60,7 и 58,8% штаммов с пораженных участков и интактных участков кожи типировались набором

бактериофагов. Вследствие чего выявлено, что штаммы в основном относились к смешанной фагогруппе, т.е. типировались одновременно более чем двумя бактериофагами.

Молекулярно-генетический анализ по обнаружению генетических детерминант патогенности показал, что частота обнаружения генов энтеротоксигенности у изученных штаммов стафилококков составила 40,5 % случаев. Показана значительная вариабельность в наборе этих генов у изученных штаммов в зависимости от принадлежности к коагулазоположительным и коагулазонегативным стафилококкам. Анализ возможной взаимосвязи выделенных фаговаров стафилококков с генами энтеротоксигенности показал, что эта структура крайне разнообразна, коэффициент корреляции для различных фаговаров и генов детерминант энтеротоксигенности составляет от 0,82 до 0,93, что свидетельствует о наличии прямой сильной взаимосвязи между парами рассматриваемых признаков «фаговар-ген энтеротоксигенности».

Список литературы

1. Баязитова Л.Т. Вирулентные свойства стафилококковой микрофлоры кожи при атопическом дерматите: автореф. дис. … канд. мед. наук. – Уфа, 2009. – 24 с.

2. Баязитова Л.Т. Фенотипические особенности кокковой микрофлоры кожи в норме и при атопическом дерматите / Л.Т. Баязитова, Р.С. Фассахов, Ю.А. Тюрин, Е.О. Сукманская, Е.Б. Круглова, С.Н. Куликов, О.Ф. Тюпкина, Д.А. Долбин // Российский аллергологический журнал. 2007. – № 4. – С. 48-52.

3. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий: теория и практика // Журнал. Микробиол. – 2000. – № 4. – С. 4–7.

4. Воронина В.Р. Особенности микробиоценоза кожи больных атопическим дерматитом и терапия его осложнений / Воронина В.Р., Пампура А.Н., Феденко Е.С. // Российский аллергологический журнал. – 2007. – № 3. – С. 3–11.

5. Метициллинрезистентные Staphylococcus aureus возбудители внутрибольничных инфекций: идентификация и генотипирование. Методические рекомендации (утв. Роспотребнадзором 23.07.2006).

6. Нестеров А.С. Микробный фактор в развитии хронических дерматозов // Вестник дерматологии и венерологии. – 2007. – № 4. – С. 18–20.

7. Никонова И.В. Состояние биоценоза кожи при микробной экземе / И.В. Никонова, Е.В. Орлов, П.Е. Коннов // Практическая медицина. – 2011. – № 49. – С. 80–83.

8. Текучева Л.В. Мониторинг стафилококковой микрофлоры кожи у больных атопическим дерматитом / Л.В. Текучева, Е.В. Зайцева, В.Г. Арзуманян, Р.М. Темпер // Вестник дерматологии и венерологии. – 2006. – № 5. – С. 69–72.

9. Емкужева Д.З. Характеристика нормальной микрофлоры влагалища у здоровых женщин репродуктивного возраста / Д.З. Емкужева, С.Б. Хадзегова // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 6. – С. 50–51.

10. Немова И.С. Определение фрагментов ДНК FIM A, HLY A, B, C, и PAP, используемых для выявления адгезинов, гемолизинов, манноза-резистентных гемагглютининов у генитальных штаммов Escherichia coli, выделенных у женщин при воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта // Вестник брянского государственного университета. – 2012. – Т. 4. – № 4. (2) – С. 198–201.

11. Ito T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant Staphylococcus aureus N315. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1449–1458

12. Katayama Y., T. Ito, and K. Hiramatsu. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1549–1555.

13. Ito T., Y. Katayama, K. Asada et al. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 45:1323–1336.

14. Ito T., X. X. Ma, F. Takeuchi et al. 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. Antimicrob. Agents Chemother.

References

1. Bayazitova L.T. Virulentnye svoystva stafilokokkovoy mikroflory kozhi pri atopicheskom dermatite: avtoref. Diss… kand. Med. Nauk. Ufa, 2009. pp. 24.

2. Bayazitova L.T. Fenotipicheskie osobennosti kokkovoy mikroflory kozhi v norme I pri atopicheskom dermatite / Bayazitova L.T., Fassakhov, Turin U.A., Sukmanskaya E.O., Kruglova E.B., Kulikov S.N., Nupkina O.F., Dolbin D.A. // Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal. 2007. no. 4. pp. 48–52.

3. Bukharin O.V. Persistentsiya patogennykh bakteriy: teoriya I praktika // zhurnal mikrobiologii. 2000. no. 4. pp. 4–7.

4. Voronina V.R. Osobennosti mikrobiotsenoza kozhi bolnykh atopicheskim dermatitom I terapiya ego oslozhneniy / Voronina B.R., Pampura A.N., Fedenko E.S. // Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal. 2007. no. 3. pp. 3–11.

5. Metitsillinrezistentnye *Staphylococcus aureus* vozbuditeli vnutribolnichnykh infektsiy: identifikatsiya I genotipirovanie. Metodicheskie pekomendatsii (utv. Rospotrebnadzorom 23.07.2006).

6. Nesterov A.S. Mikrobnyy factor v razvitii khronicheskikh dermatozov // Vestnik dermatologii I venerologii. 2007. no. 4. pp. 18–20.

7. Nikonova I.V. Sostoyanie biotsenoza kozhi pri mikrobnoy ekzeme / Nikonova I.V. Orlov E.V., Konnov P.E. // Prakticheskaya meditsina. 2011. no. 49. pp. 80–83.

8. Tekuchova L.V., Zaiceva E.V., Arzumanyan V.G., Temper R.M. Monitoring stafilokokkovoi mikroflory kozhi u bolnykh atopicheskim dermatozom. – vestnik dermatologii i venerologii. 2006. no. 5. pp. 43–45.

9. Ekmuzheva D.Z. Kharakteristika normalnoy mikr5oflory vlagalischa u zdorovykh zhenschin reproduktivnigo vozrasta // Ekmuzheva D.Z., Khadzegova S.B. // Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2003. no. 6. pp. 50–51.

10. Nemova I.S. opredelenie DNK FIM a, HLY a, B, C, I PAP, ispolzuemykh dlya vyyavleniya adgezinov, gemolizinov, mannoza-rezistentnykh gemagglutininov u genitalnykh schtammov *Escherichia coli,* vydelennykh u zhenschin pri vocpalitelnykh zabolevaniyakh reproduktivnogo trakta // Vestnik bpyanskogo gocudarstvennogo univerciteta. 2012. T.4. no. 4. (2). pp. 198–201.

11. Ito, T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu. 1999. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. Antimicrob. Agents Chemother. 43:1449–1458.

12. Katayama, Y., T. Ito, and K. Hiramatsu. 2000. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 44:1549–1555.

13. Ito, T., Y. Katayama, K. Asada et al. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 45:1323–1336.

14. Ito, T., X. X. Ma, F. Takeuchi et al. 2004. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. Antimicrob. Agents Chemother.

Рецензенты:

Нестеров А.С., д.м.н., профессор, зав. циклом «Кожные и венерические болезни» кафедры инфекционных и кожно-венерических болезней медицинского факультета, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск;

Ильина Н.А., д.б.н., профессор, проректор по научной работе, ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет» им. И.Н. Ульянова, г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 30.11.2013.