

DOI: 10.15690/vramn695

А.П. Пикина<sup>1</sup>, А.Н. Шкопоров<sup>1</sup>, Е.В. Кулагина<sup>2</sup>, Е.В. Хохлова<sup>1</sup>, А.В. Чаплин<sup>1</sup>,  
Н.Н. Володин<sup>3</sup>, Л.И. Кафарская<sup>1</sup>, Н.Г. Короткий<sup>1</sup>, Б.А. Ефимов<sup>1</sup><sup>1</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,  
Москва, Российская Федерация<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Российская Федерация<sup>3</sup> Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва,  
Москва, Российская Федерация

# Сравнительное генетическое типирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных с поверхности кожи, из носовой полости и кишечника у детей, страдающих атопическим дерматитом

**Обоснование.** Кожные покровы больных, страдающих atopическим дерматитом, с большой частотой колонизированы бактериями, принадлежащими виду *Staphylococcus aureus*. Топическая антибактериальная и противовоспалительная терапия часто оказываются недостаточно эффективными, что проявляется реколонизацией кожных покровов золотистым стафилококком и обострением аллергического процесса. **Цель исследования:** определить частоту колонизации *S. aureus* кожных покровов, слизистых оболочек носовой полости и кишечника у детей, страдающих atopическим дерматитом, провести сравнительный анализ выделенных из различных биотопов штаммов *S. aureus*, используя методы генетического типирования, и на основании полученных результатов оценить вероятность миграции стафилококков между биотопами. **Методы.** Выделение *S. aureus* проведено у 38 детей с atopическим дерматитом. Осуществлялись видовую идентификацию стафилококков при помощи биохимических (API Staph) и масс-спектрометрических (MALDI-TOF MS) методов. Генетическое типирование выделенных штаммов *S. aureus* проводилось методами анализа длин участков между генами 16S рРНК и 23S рРНК в многокопийных рРНК-оперонах и высокоразрешающего анализа плавления региона X гена *sra*. **Результаты.** При помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии были успешно идентифицированы 99% выделенных штаммов *S. aureus*: у 31,6% детей — из всех изучаемых биотопов, у 42% — с поверхности кожи и из носовой полости, у 2,6% — с кожи и из кишечника, у 10,5% — только с кожи, у 2,6% — из носовой полости и кишечника, у 2,6% — только из носовой полости. У 8% детей *S. aureus* не был обнаружен ни в одном из биотопов. Генотипирование позволило выявить 17 отличающихся генотипов *S. aureus*. Генотипы *S. aureus*, выделенные из носовой полости и кишечника, были в 88 и 61% случаев соответственно идентичны генотипу *S. aureus*, обнаруженному на кожных покровах. **Заключение.** Высокая частота совпадений генотипов свидетельствует о возможности миграции *S. aureus* между биотопами в организме человека и об отсутствии выраженной специализации штаммов *S. aureus* к колонизации какого-либо одного из них.

**Ключевые слова:** atopический дерматит, *Staphylococcus aureus*, генетическое типирование.

**(Для цитирования:** Пикина А.П., Шкопоров А.Н., Кулагина Е.В., Хохлова Е.В., Чаплин А.В., Володин Н.Н., Кафарская Л.И., Короткий Н.Г., Ефимов Б.А. Сравнительное генетическое типирование изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных с поверхности кожи, из носовой полости и кишечника у детей, страдающих atopическим дерматитом. *Вестник РАМН*. 2016;71(5):367–374. doi: 10.15690/vramn695)

## Обоснование

Атопический дерматит — хроническое рецидивирующее заболевание кожи, характеризующееся нарушением целостности эпидермального барьера, снижением гидратации рогового слоя, воспалением; сопровождающееся выраженным психоэмоциональным воздействием на пациента и членов его семьи. По данным разных источников, частота встречаемости atopического дерматита у детей составляет 15–30% [1]. В течение последних десятилетий отмечается прогрессивный рост распространенности atopического дерматита в развитых странах, в том числе в России [1, 2].

В основе патогенеза atopического дерматита лежит конвергенция генетической предрасположенности к заболеванию с воздействием на организм разнообразных внешних факторов, в совокупности приводящих к глубокому и стойкому нарушению важнейших функций кожного покрова, включая проницаемость кожи и антимикробного барьера [3].

Негативные изменения антимикробного барьера при atopическом дерматите часто сопровождаются колонизацией поврежденной и неповрежденной кожи золотистым стафилококком (*Staphylococcus aureus*), что отражается в существенном различии качественных и количественных показателей, характеризующих обсеменение кожи больных бактериями этого вида по сравнению с кожей практически здоровых лиц [4].

В то время как в норме кожа редко (2–25%) колонизирована *S. aureus* (за исключением здоровых хронических носителей *S. aureus* в эндемичных районах), частота колонизации кожи больных с atopическим дерматитом, по разным данным, варьирует от 76 до 100% [5].

Ранее в серии непрерывных исследований по изучению микробной обсемененности кожных покровов у 26 детей в возрасте от 4 до 16 лет с диагнозом atopического дерматита мы обнаружили колонизацию (в средней концентрации  $4,0 \pm 1,4$  lg КОЕ/см<sup>2</sup>) пораженных участков кожи *S. aureus* в 88,5% случаев. С меньшей частотой выявлялись другие виды стафилококков: *S. epidermidis*,

*S. hominis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*. На участках неповрежденной кожи, хотя и в меньшей степени, но также определялся патогенный штамм *S. aureus* (23,1% случаев) в концентрации до  $3,2 \pm 0,8 \lg$  КОЕ/см<sup>2</sup> кожного покрова [4].

При изучении параметров обсемененности микрофлоры кожи 14 клинически здоровых детей *S. aureus* не выявлены, а видовой состав стафилококков у них включал только *S. epidermidis* и *S. hominis* в низкой концентрации [6].

Штаммы *S. aureus*, изолированные с кожи больных atopическим дерматитом, как правило, хронически колонизируют покровы тела, и могут быть повторно изолированы даже спустя месяцы после лечения [7].

К непосредственным причинам, вызывающим стойкую колонизацию кожи больных *S. aureus*, относят, прежде всего, нарушение целостности рогового слоя кожи, изменение pH в щелочную сторону, экссудацию фибриногена из плазмы, повышение синтеза фибронектина под действием интерлейкина 4 и снижение синтеза антимикробных пептидов кератиноцитами [8].

Колонизируя кожу, *S. aureus* могут вырабатывать эксфолиатины, альфа-гемолизин, а также другие токсины и ферменты, которые вызывают повреждение кератиноцитов. Некоторые штаммы *S. aureus* синтезируют суперантигены, что вызывает поликлональную активацию Т лимфоцитов, обуславливающую гиперпродукцию провоспалительных цитокинов и усиление воспалительной реакции. Таким образом, суперантигены, ассоциированные с *S. aureus*, выступают также и в роли аллергенов [5, 8].

Антибактериальная терапия приводит к снижению тяжести течения atopического дерматита, хотя ее эффек-

тивность ниже ожидаемой вследствие высокой скорости реколонизации пораженных участков кожи. Поскольку у больных atopическим дерматитом колонизация *S. aureus* с высокой частотой обнаруживается на слизистой оболочке носовой полости, высказано предположение, что именно она является резервуаром патогенных микроорганизмов [9].

Одним из подтверждений того, что можно говорить о переносе бактерий в организме с кожи в носовую полость, могло бы служить обнаружение генетической идентичности штаммов *S. aureus*, выделенных из разных областей тела у одного больного. Этот же факт мог бы указывать на преимущественную независимую колонизацию конкретного пациента определенными генотипами бактерий внутри вида *S. aureus*.

Генетическое типирование штаммов *S. aureus*, выделенных с пораженных участков кожи, а также носовой полости и кишечника больных детей, проводили с использованием двух молекулярно-генетических методов. Первый заключался в сравнительном высокочувствительном анализе кривых температур плавления (High Resolution Melting Analysis, HRM), продуктов амплификации фрагмента хромосомной ДНК *S. aureus*, кодирующего аминокислотную последовательность гиперварибельного региона X белка A (*spa*), полученных при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) [10]. Другой метод подразумевал сравнительный анализ длин продуктов амплификации, также полученных при помощи ПЦР, спейсерных участков, располагающихся между генами 16S рPHK и 23S рPHK, многокопийных рPHK-оперонов хромосомной ДНК *S. aureus*. Показатель уровня внутривидовой варибельности длин спейсерных участков и

A.P. Pikina<sup>1</sup>, A.N. Shkoporov<sup>1</sup>, E.V. Kulagina<sup>2</sup>, E.V. Khokhlova<sup>1</sup>, A.V. Chaplin<sup>1</sup>,  
N.N. Volodin<sup>3</sup>, L.I. Kafarskaya<sup>1</sup>, N.G. Korotkiy<sup>1</sup>, B.A. Efimov<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>3</sup> D. Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology,  
Moscow, Russian Federation

## Comparative Genotyping of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Skin Lesions, Nasal Cavities, and Feces of Children with Atopic Dermatitis

**Background:** The lesion of skin of the majority atopic dermatitis patients is chronically colonized by bacteria belonging to the species *Staphylococcus aureus*. Topical antibacterial and anti-inflammatory therapy treatment are often ineffective due to fast recolonization by *S. aureus* and exacerbation of allergic process. **Aims:** Our aim was to determine a frequency of *S. aureus* colonization in skin lesions, mucous membranes of the nasal cavity and intestine of children with atopic dermatitis, to compare the genotypes of *Staphylococcus aureus* strains isolated from different biotopes of atopic dermatitis patients, and to clarify whether the intestinal and nasal cavities microbiota may act as a source of *S. aureus* recolonization of skin lesions. **Materials and methods:** Bacteriological examination of fecal samples, skin, and nasal swabs was conducted in 38 atopic dermatitis patients. The pure bacterial cultures of *S. aureus* were identified using API Staph (Biomerieux, France) and Vitek 2 MS (Biomerieux, France). Isolates of *S. aureus* were subjected to genotyping by analysis of rRNA internal 16S-23S rRNA spacer regions and high resolution melting analysis (HMR) of polymorphic *spa* X-regions. **Results:** 99% *S. aureus* strains were successfully identified using MALDI-TOF mass-spectrometry. *S. aureus* cultures were isolated from all biotopes in 31,6% of children, from skin and nasal cavities — in 42% of cases, from skin and feces — in 2,6% of cases, only from skin — in 10,5%, from nasal cavities and feces — in 2,6%, and only from nasal cavities — in 2,6% of cases. In 8% of children, *S. aureus* was not detected in any of the biotopes. Genotyping of the isolates enabled the detection of 17 different genotypes. A match between the genotypes of skin and nasal strains, and skin and fecal strains was observed in 88% and 61% of the cases respectively. **Conclusions:** The observed a high-frequency matching genotypes suggests the possibility of migration of *S. aureus* strains inside biotopes in humans and the absence of specialization to colonization of any of the niches.

**Key words:** atopic dermatitis, *Staphylococcus aureus*, genotyping.

**(For citation):** Pikina AP, Shkoporov AN, Kulagina EV, Khokhlova EV, Chaplin AV, Volodin NN, Kafarskaya LI, Korotkiy NG, Efimov BA. Comparative Genotyping of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Skin Lesions, Nasal Cavities, and Feces of Children with Atopic Dermatitis. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2016;71(5):367–374. doi: 10.15690/vramn695

числа рРНК-оперонов ранее с успехом был использован для типирования и сравнения клинических изолятов *S. aureus* [11, 12].

**Цель исследования:** определение частоты колонизации *S. aureus* кожных покровов, слизистых оболочек носовой полости и кишечника детей, страдающих atopическим дерматитом, проведение с помощью методов генетического типирования сравнительного анализа выделенных из различных биотопов штаммов *S. aureus* и оценка вероятности миграции стафилококков между биотопами.

## Методы

### Дизайн исследования

Проведено одномоментное наблюдательное моноцентровое исследование.

### Критерии соответствия

В исследование включали детей младше 18 лет, страдающих atopическим дерматитом.

### Условия проведения

Исследование проведено на базе кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова (Москва).

### Продолжительность исследования

Биоматериал брали однократно; наблюдений за состоянием обследуемых или исследования в динамике в рамках данной работы не проводили. Включение пациентов в исследование и набор материала проходили в течение 2008–2012 гг.

### Исходы исследования

Выделяли *S. aureus* с кожи, из носовой полости и кишечника у детей с atopическим дерматитом. Проводили генетическое типирование выделенных штаммов. Определяли частоту совпадения генотипов штаммов *S. aureus* из различных ниш организма.

### Методы регистрации исходов

Материалом для бактериологического исследования служили смывы с 1 см<sup>2</sup> пораженных участков кожи, смывы из носовой полости и фекалии обследуемых. Тампоны со смывами участков кожи помещали в транспортные пробирки, содержащие 2 мл стерильного физиологического раствора. Тампоны со смывами из носовой полости помещали в пробирки с транспортной питательной средой. Фекалии собирали стерильным шпателем и помещали в транспортный контейнер. Для определения количества *S. aureus* в образцах кожных смывов и фекалий в бактериологической лаборатории из этого материала готовили серийные разведения в стерильном физиологическом растворе. Посев материала на селективную питательную среду проводили из разведений исследуемого материала в 10<sup>1</sup> и 10<sup>3</sup> раз. Определение обсемененности носовой полости проводили только качественно — путем посева исследуемого материала с тампонов непосредственно на питательную среду.

Для выделения стафилококков использовали селективную питательную среду Staphylococcus Medium 110 (Difco, США). После посева чашки Петри инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C, на этой среде микроорганизмы вида *S. aureus* образуют колонии с желтой пигментацией. Морфологию бактерий изучали микроскопиче-

ское, окрашенных по Граму. Определение родовой и видовой принадлежности выделенных микроорганизмов проводили на основании изучения каталазной активности и теста на плазмокоагуляцию. Для биохимической идентификации использовали тест-систему API-20 Staph (BioMerieux, Франция).

Кроме этого, для видовой идентификации микроорганизмов использовали метод MALDI-TOF MS (Matrix assisted laser desorption/Ionization time-of-flight Mass Spectrometry), основанный на времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбцией-ионизацией при содействии матрицы [13, 14]. Масс-спектрометрия была проведена с использованием прибора Vitek 2 MS (BioMerieux, Франция). Анализ спектров осуществляли с использованием программного обеспечения Saramis (BioMerieux, Франция).

Все штаммы бактерий, принадлежащие к виду *S. aureus*, были получены в чистой культуре сначала на плотной питательной среде, а затем в жидкой питательной среде ВНИ (BBL) для последующего приготовления лиофилизированных стоков. Лиофилизацию чистых культур бактерий проводили в растворе сахарозы (10%) и желатина (1%) в лиофильной сушке SBI (Chemlab, Англия). Все последующие манипуляции с чистыми культурами стафилококков осуществляли после их выделения из лиофилизированных стоков.

Геномную ДНК из чистых культур стафилококков получали путем двухминутного кипячения суспензии бактериальных клеток в ТЕ-буфере и последующего центрифугирования лизата клеток. Супернатант использовали в качестве образцов ДНК в ПЦР.

Аmplификацию фрагмента ДНК, кодирующего аминокислотную последовательность гипервариабельного региона X белка A *S. aureus*, проводили в приборе BioRad C 100 с оптическим модулем CFX-96 с использованием готовых ПЦР-смесей (Синтол, Россия), содержащих флуоресцентный краситель EvaGreen (QIAGEN, Германия). Реакционные смеси объемом 25 мкл содержали 0,2 мкл образцов ДНК и специфичные для исследуемой области праймеры 1095F (5'-AGACGATCCTTCCGGTGAGC-3') и 1517R (5'-GCTTTTGCAATGTCATTACTG-3') в финальной концентрации 0,2 мкМ каждого. Программа ПЦР в реальном времени состояла из начальной денатурации при 94°C в течение 15 с и 30 циклов амплификации, включавших отжиг праймеров при 60°C в течение 20 с и элонгацию при 72°C в течение 20 с. Затем проводили один цикл программы HRM для построения графиков кривых плавления продуктов амплификации, заключавшейся в линейном повышении температуры реакционной смеси от 75 до 95°C с одновременной регистрацией данных, характеризующих флуоресценцию на каждом шаге повышения температуры на 0,1°C. Время каждого этапа измерения составляло 5 с [10].

Для анализа кривых плавления использовали собственное программное обеспечение прибора BioRad C 100 (версия Precision Melt analysis), которое позволяет пользователю несколькими способами визуализировать данные в HRM и на этом основании распределить анализируемые последовательности на HRM-кластеры с вычислением уровня достоверности их принадлежности к соответствующему кластеру.

Идентичность ПЦР-продуктов, полученных при амплификации специфического участка ДНК из штаммов стафилококков, выделенных из смывов носовой полости и испражнений (опытные образцы), ПЦР-продуктам, полученным при амплификации ДНК из штаммов, выделенных из смывов кожи (контрольный образец) соот-

ветствующих пациентов, определялась по результатам анализа кривых плавления.

Для визуализации данных HRM-анализа были использованы сгенерированные программой кривые:

- кривая зависимости отрицательной производной функции флуоресценции (F) от температуры (T) ( $df/dt$ ), которая главным образом отображает температуру плавления ( $T_m$ ) продукта амплификации;
- нормализованная исходная кривая, показывающая зависимость уменьшения флуоресценции от повышения температуры;
- разностные кривые, которые отображают определяемую пользователем кривую в качестве базисной линии (т.е. как ось X) и изображают другие нормализованные кривые по отношению к этой базисной линии.

Критерием признания кривых плавления продуктов амплификации опытных и контрольных образцов как «одинаковые» или «отличающиеся» служило определение их принадлежности к тому или иному HRM-кластеру. В соответствии с этим кривые плавления, характеризующие опытные штаммы, считались одинаковыми с выбранным контрольным штаммом, если они относились к одному и тому же кластеру. Кроме того, для признания HRM кривой опытного образца такой же, как кривая контрольного образца, следовала двухступенчатая процедура. Во-первых, проводился сравнительный анализ нормализованной HRM кривой для опытного образца с нормализованными профилями контрольного образца. Во-вторых, HRM профиль контрольного образца выбирался в качестве контроля для разностного графика, и сравнение разностных кривых использовалось для определения, был ли опытный штамм одинаковым с контрольным или же отличался от него.

Для анализа количества и размера спейсерных участков между генами 16S рPHK и 23S рPHK производилась ПЦР с праймерами IX (5'-GGTGAAGTCGTAACAAG-3') и II (5'-TGCCAAGGCATCCACC-3') [11, 12]. Состав ПЦР-смеси: SE-буфер AS (СибЭнзим, Россия), доведенный до 1x; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,4 mM смеси нуклеотидов; 0,5 мкM каждого праймера; 1 ед. Таq ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия), 0,2 мкл выделенной ДНК. Программа ПЦР состояла из начальной денатурации при 94°C в течение 2 мин, 30 циклов (денатурация — 1 мин при 94°C, отжиг праймеров — 1 мин при 55°C, элонгация — 40 с при 72°C) и завершающей элонгации в течение 4 мин при 72°C. Для визуализации продуктов амплификации применялся электрофорез в 2% агарозном геле.

В данном исследовании штаммы признавались одинаковыми в том случае, если характеристики температур плавления продуктов амплификации специфического участка гена белка A не отличались между собой по HRM-профилю, и электрофоретические картины, характеризующие их межгенные спейсерные участки, были неотличимы.

**Таблица.** Источники выделения, температура плавления ( $T_m$ ), HRM и 16S-23S рPHK спейсер генотип штаммов *S. aureus*, выделенных от детей, страдающих atopическим дерматитом

№ п/п	№ штамма	Источник выделения <i>S. aureus</i>	$T_m$ (HRM)	HRM Генотип	Генотип по спейсеру 16S-23S рPHK	Генотип по совокупности HRM + спейсер 16S-23S рPHK
1	1	Смыв с кожи	85.6	4	1	1
	2	Носовая полость	85.6	4	1	1
	3	Кишечное содержимое	85.6	4	1	1
2	4	Смыв с кожи	85.4	8	2	2
	5	Носовая полость	85.4	8	2	2
	6	Кишечное содержимое	85.4	8	2	2

### Этическая экспертиза

В соответствии с заключением Этического комитета РНИМУ им. Н.И. Пирогова данное исследование не подлежит этической экспертизе согласно СОП ЭК РНИМУ им. Н.И. Пирогова.

### Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки: размер выборки предварительно не рассчитывали.

Методы статистического анализа данных: частота совпадения генотипов штаммов *S. aureus* оценивалась с помощью пермутационного теста [15].

## Результаты

### Объекты (участники) исследования

Изучение параметров колонизации кожных покровов, слизистой оболочки носовой полости и толстой кишки бактериями вида *S. aureus* проведено у 38 детей обоего пола, страдающих atopическим дерматитом. Возраст обследуемых составлял от 1,5 до 17 лет (средний возраст 6 лет). У наблюдаемых детей в анамнезе количество обострений основного заболевания составляло 2–3 раза в год. Обострения заболевания в большинстве случаев были связаны с нарушениями в питании. Суммарная продолжительность обострений atopического дерматита в год в среднем составляла 2–3 нед. У всех пациентов имелись родственники первой степени родства с atopическими заболеваниями.

### Основные результаты исследования

Проведенные исследования показали, что участки пораженной кожи у детей, страдающих atopическим дерматитом, были колонизированы *S. aureus* в 33 (86,8%) случаях из 38. С применением MALDI-TOF масс-спектрометрии были успешно идентифицированы 99% выделенных штаммов *S. aureus*: у 12 (31,6%) детей — из всех изученных ниш, у 16 (42,1%) — с поверхности кожи и из носовой полости, у 1 (2,6%) — с кожи и из кишечника, у 4 (10,5%) — только с кожи, у 1 (2,6%) — из носовой полости и кишечника, у 1 (2,6%) — только из носовой полости. У 3 (7,8%) детей *S. aureus* не были обнаружены ни в одной из ниш.

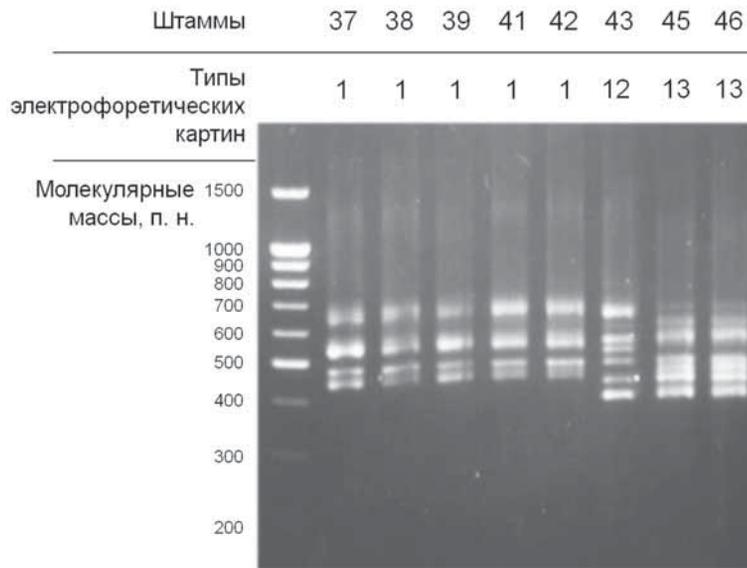
Средняя концентрация *S. aureus* на коже составила  $4,6 \pm 1,4$  КОЕ/см<sup>2</sup>. В 3 случаях из образцов смывов с кожи было выделено 2 отличающихся по совокупности фенотипических свойств штамма *S. aureus* (по биохимическим свойствам и чувствительности к антибиотикам). Средняя концентрация *S. aureus* в кишечнике составила  $4,6 \pm 0,87$  КОЕ/г исследуемого материала.

Всего было выделено 159 штаммов *S. aureus*.

Для сравнительного генотипирования был отобран 51 штамм, выделенный с поверхности кожи, из носовой полости и испражнений 18 обследованных детей (табл.).

Таблица. Источники выделения, температура плавления ( $T_m$ ), HRM и 16S-23S рРНК спейсер генотип штаммов *S. aureus*, выделенных от детей, страдающих атопическим дерматитом (Окончание)

№ п/п	№ штамма	Источник выделения <i>S. aureus</i>	$T_m$ (HRM)	HRM Генотип	Генотип по спейсеру 16S-23S рРНК	Генотип по совокупности HRM + спейсер 16S-23S рРНК
3	8	Смыв с кожи	82.9	7	4	3
	9	Носовая полость	82.9	7	4	3
	10	Кишечное содержимое	84.4	1	5	4
4	17	Смыв с кожи	84.4	1	9	5
	18	Смыв с кожи	84.8	6	8	6
	19	Носовая полость	84.4	1	9	5
	20	Кишечное содержимое	84.4	1	9	5
5	21	Смыв с кожи	83.9	2	6	7
	24	Носовая полость	83.9	2	6	7
6	25	Смыв с кожи	83.8	2	6	7
	26	Носовая полость	83.8	2	6	7
7	30	Смыв с кожи	84.1	10	13	8
	31	Носовая полость	85.0	11	2	9
	32	Кишечное содержимое	84.3	5	3	10
8	34	Смыв с кожи	84.1	10	13	8
	35	Носовая полость	84.1	10	13	8
	36	Кишечное содержимое	84.1	10	13	8
9	11	Смыв с кожи	84.4	1	5	4
	12	Смыв с кожи	83.7	2	7	11
	13	Носовая полость	83.8	2	7	11
	14	Кишечное содержимое	85.6	4	15	17
10	38	Смыв с кожи	85.6	4	1	1
	39	Носовая полость	85.6	4	1	1
	41	Кишечное содержимое	85.6	4	1	1
11	43	Смыв с кожи	84.4	1	12	12
	45	Носовая полость	84.8	6	10	13
	46	Кишечное содержимое	84.8	6	10	13
12	47	Смыв с кожи	84.1	10	13	8
	48	Носовая полость	84.1	10	13	8
13	49	Смыв с кожи	85.1	3	11	14
	50	Носовая полость	85.1	3	11	14
14	51	Смыв с кожи	85.1	3	11	14
	52	Носовая полость	85.1	3	11	14
	53	Кишечное содержимое	85.1	3	11	14
15	54	Смыв с кожи	84.5	1	9	5
	55	Кишечник	84.5	1	9	5
16	56	Смыв с кожи	84.4	5	3	10
	57	Носовая полость	84.4	5	3	10
17	60	Смыв с кожи	85.6	4	1	1
	61	Носовая полость	85.6	4	1	1
	62	Кишечное содержимое	83.9	2	14	15
18	63	Смыв с кожи	85.4	8	1	16
	64	Смыв с кожи	85.7	4	1	1
	65	Носовая полость	85.7	4	1	1
	66	Кишечное содержимое	85.7	4	1	1



**Рис.** Агарозный электрофорез наборов участков между генами *16S* рРНК и *23S* рРНК в многокопийных рРНК оперонах. На первой дорожке представлен ДНК-маркер 100 bp + 1.5 Kb (СибЭнзим), на дорожках 2–10 — ПЦР-продукты, полученные из ДНК различных штаммов *S. aureus*.

372

У данной группы детей *S. aureus* был выделен из 2 или 3 биотопов. В смывах из носовой полости этих детей *S. aureus* был обнаружен в 17 (94,4%) случаях из 18 обследованных детей, а в фекалиях — в 13 случаях (72,2%).

Температуры плавления продуктов амплификации участка ДНК, кодирующего гипервариабельный регион X белка A *S. aureus*, полученные при помощи HRM-анализа, находились в диапазоне от 83,4 до 85,7°C. В соответствии с вышеуказанными критериями, по 51 нуклеотидной последовательности *sra* было сгенерировано 11 различных типов HRM.

При анализе характеристик спейсерных участков между генами *16S* рРНК и *23S* рРНК было выявлено 15 вариантов электрофоретических картин (рис.). Суммарно при использовании двух методов генотипирования было выделено 17 отличающихся генотипов *S. aureus*, причем кожные покровы детей были колонизированы 13 различными генотипами, носовая полость — 11, кишечник — 10. С наибольшей частотой среди обследованных пациентов были распространены штаммы *S. aureus*, отнесенные нами к генотипам 1 и 8: бактерии этих генотипов были обнаружены в различных анатомических областях у 4 и 3 детей соответственно. Генотипы 4, 5, 7, 10 и 14 *S. aureus* встречались каждый у двух разных пациентов. Только штаммы 10 генотипов (2, 3, 6, 9, 11, 12, 13, 15, 16 и 17) *S. aureus* колонизировали по одному ребенку.

В 15 (88,2%) случаях из 17 генотипы *S. aureus*, колонизирующие носовую полость и кожные покровы детей, совпадали. В 8 (61,5%) случаях из 13 генотип *S. aureus*, колонизировавший кишечник, был идентичен генотипу стафилококков, колонизирующих кожные покровы. Подобная высокая частота совпадений свидетельствует о возможности миграции *S. aureus* между биотопами в организме человека и отсутствии выраженной специализации штаммов к колонизации какому-либо одному из них. Для установления статистической значимости полученной частоты совпадений был применен пермутационный тест [16]: генотипы штаммов подвергались 10 000 случайных перемешиваний, после чего считалась частота совпадений генотипов штаммов между биотопами организма. В результате, случайная частота совпадения генотипов в сравнении «кожа-носоглотка» составила 9,6±6,8%, в сравнении «кожа-кишечник» — 10,0±8,0%. Таким об-

разом, в обоих случаях наблюдаемая частота совпадений (88,2 и 61,5% соответственно) значительно отличались от частоты, которая бы наблюдалась при случайных совпадениях ( $p < 0,0001$ , пермутационный тест).

## Обсуждение

### Резюме основного результата исследования

По результатам исследования показана высокая частота колонизации *S. aureus* поврежденных участков кожных покровов, слизистой оболочки носовой полости и кишечника детей, страдающих atopическим дерматитом. Генетическое типирование выделенных штаммов *S. aureus* позволило выявить 17 отличающихся генотипов, обладающих высоким уровнем специфичности колонизации индивидуального организма. В большинстве случаев генотипы *S. aureus*, колонизирующие носовую полость и кишечник детей, страдающих atopическим дерматитом, были идентичны генотипу микроорганизмов, обнаруженных на их кожных покровах.

### Обсуждение основного результата исследования

Атопический дерматит является наиболее распространенным хроническим воспалительным дерматозом. Заболевание характеризуется ранним началом, обычно в детском возрасте, кожным зудом, хронизацией с рецидивами и ремиссиями, наличием других сопутствующих atopических заболеваний (астма, сенная лихорадка), семейным анамнезом atopии и типичными изменениями вовлеченной в патологический процесс кожи. Кожа пациентов с atopическим дерматитом часто колонизирована *S. aureus*, причем как само наличие, так и количественный уровень колонизирующих кожу *S. aureus* коррелирует с усилением тяжести течения заболевания [6].

Временная эрадикация *S. aureus* путем применения антибиотикотерапии или антисептиков, даже когда кожа не имеет клинических признаков инфицирования, часто приводит к клиническому улучшению течения atopического дерматита. Однако эффективность антибактериальной терапии оказывается ниже ожидаемой из-за высокой скорости реколонизации пораженных участков кожи штаммами *S. aureus* [7, 17]. Проведенные ранее исследо-

вания показали, что возможными причинами реколонизации кожных покровов у больных atopическим дерматитом могут быть устойчивость бактерий к применяемым антибактериальным препаратам, интраназальное и/или подногтевое носительство стафилококков и микробная контаминация лекарственных препаратов, используемых для местной терапии [7, 16]. В другом исследовании с применением молекулярных методов генетического типирования штаммов *S. aureus* в качестве одного из потенциальных источников реколонизации кожных покровов у детей с atopическим дерматитом идентифицировали носительство *S. aureus* в носовой полости у родителей больных детей [17]. Так, в исследовании было показано, что по крайней мере один из родителей больного ребенка в 65% семей являлся носителем *S. aureus* в носовой полости. При этом 84% штаммов *S. aureus*, выделенных от детей и их родителей, обладали схожим генотипом. Исследований, посвященных сравнительному генетическому типированию штаммов стафилококков, выделенных из испражнений детей, страдающих atopическим дерматитом, ранее не проводилось. В то же время известно, что течение atopического дерматита часто сопровождается выраженным зудом. При расчесывании кожи бактерии вместе с эпителиальными клетками попадают на руки пациента и в подногтевое пространство, что в свою очередь может вести к контаминации ротовой и носовой полости либо прямо, либо опосредованно через предметы окружающей среды, например игрушки, к которой прикасается ребенок обсемененными руками и затем берет ее в рот. Контаминация ротовой полости может приводить к проникновению бактерий в носовую полость или в кишечник больного ребенка. Также существует вероятность того, что дети, страдающие atopическим дерматитом, контактным или воздушно-капельным механизмом могут загрязнять колонизирующими их штаммами стафилококков тесно контактирующих с ними людей, а те в свою очередь за счет тех же механизмов способны возвращать эти бактерии обратно детям. Кроме того, колонизирующие кишечник штаммы *S. aureus* с каловыми массами могут загрязнять перианальную область кожи и далее контактным механизмом распространяться на другие участки кожной поверхности. Однако эти предположения должны быть подвергнуты тщательному научному исследованию.

В нашем исследовании мы провели оценку частоты одновременного обнаружения *S. aureus* у детей с atopическим дерматитом на коже, в носовой полости и в испражнениях. Кроме того, было проведено генетическое типирование выделенных штаммов *S. aureus* с целью подтверждения роли слизистых оболочек носовой полости и кишечника как вероятных источников реколонизации кожных покровов *S. aureus*.

Результаты бактериологического исследования подтвердили высокую частоту колонизации *S. aureus* поврежденных участков кожных покровов детей, страдающих atopическим дерматитом. Так, кожа 86,8% обследованных детей была колонизирована *S. aureus*. Кроме того, при бактериологическом исследовании смывов из носовой полости и образцов испражнений детей бактерии вида *S. aureus* были обнаружены в 79 и 37% случаев соответственно.

Генетическое типирование *S. aureus* позволило выявить 17 отличающихся генотипов *S. aureus*, причем кожные покровы 18 детей были колонизированы 13 различными генотипами этих бактерий, носовая полость — 11, кишечник — 10. Интересно, что только два из идентифицированных генотипов (генотипы 1 и 8) *S. aureus* были обнаружены более чем у двух обследованных детей. В

частности, *S. aureus* этих генотипов были обнаружены на коже, слизистой оболочке носа и в кишечном содержимом, каждый — у трех разных детей. Еще у одного ребенка стафилококки генотипа 1 были выделены только с поверхности кожи и из носовой полости. Генотипы 4, 5, 7, 10 и 14 были обнаружены каждый у 2 детей. Штаммы *S. aureus* оставшихся 10 генотипов (2, 3, 6, 9, 11, 12, 13, 15, 16 и 17) колонизировали только по одному ребенку. Эти данные свидетельствуют о высоком уровне специфичности колонизации *S. aureus* детей, страдающих atopическим дерматитом, что выражается в индивидуальной склонности организма больного ребенка к контаминации определенными, характерными только для него генотипами *S. aureus*.

Кроме того, было установлено, что в 88% случаев генотип *S. aureus*, колонизирующий носовую полость, и в 61% случаев генотип *S. aureus*, колонизирующий кишечник детей, страдающих atopическим дерматитом, был идентичен генотипу *S. aureus*, обнаруженных на их кожных покровах. С учетом возможности сенсibilизации организма аллергенами *S. aureus* их длительная персистенция в указанных биотопах может влиять на течение как непосредственно кожного процесса, так и провоцировать возникновение воспалительных процессов в кишечном тракте, а также аллергического ринита, возникающего впоследствии как этап atopического марша.

#### Ограничения исследования

Основным ограничением исследования является анализ параметров колонизации различных биотопов у детей, страдающих atopическим дерматитом, только стафилококками, относящимися к виду *S. aureus*.

Из 159 выделенных штаммов *S. aureus* для сравнительного генотипирования использовали 51 штамм стафилококков, выделенных с поверхности кожи, из носовой полости и испражнений у 18 из 38 детей. У данной группы детей *S. aureus* выделялся из 2 или 3 биотопов.

#### Заключение

Высокая частота совпадений генотипов штаммов *S. aureus*, выделенных из носовой полости, кишечника и с поверхности кожных покровов, свидетельствует о возможности миграции *S. aureus* между различными биотопами организма и отсутствии выраженной специализации штаммов *S. aureus* к колонизации какого-либо одного из них. Исходя из этого, поиск оптимальных методов предупреждения перекрестной микробной контаминации у детей, страдающих atopическим дерматитом, должен вестись с учетом их эффективности в отношении *S. aureus* во всех биотопах.

#### Источник финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова.

#### Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие финансовой поддержки исследования/конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

## ЛИТЕРАТУРА

- Семенов В.Ю., Руголь Л.В., Матвеев Э.Н. По возрасту показатели нуждаемости детского населения в специализированной стационарной медицинской помощи на примере Московской области // *Социальные аспекты здоровья населения*. — 2010. — Т.16. — №4 — С. 10. [Semenov VYu, Rugol LV, Matveev EN. Age-related indicators of children population's needs in the specialized stationary medical care by an example of the Moscow region. *Sotsial'nye aspekty zdorov'ya naseleniya*. 2010;16(4):10. (In Russ).]
- Bieber T. Atopic dermatitis. *Ann Dermatol*. 2010;22(2):125–137. doi: 10.5021/ad.2010.22.2.125.
- Leung DY. New insights into atopic dermatitis: role of skin barrier and immune dysregulation. *Allergol Int*. 2013;62(2):151–161. doi: 10.2332/allergolint.13-RAI-0564.
- Ефимов Б.А., Короткий Н.Г., Постникова Е.А. и др. Изучение качественного состава стафилококков кожи у больных atopическим дерматитом // *Стерилизация и госпитальные инфекции*. — 2007. — Т.3. — №5 — С. 17–20. [Efimov BA, Korotkii NG, Postnikova EA, et al. Izuchenie kachestvennogo sostava stafilocokkov kozhii u bol'nykh atopicheskim dermatitom. *Sterilizatsiya i hospital'nye infektsii*. 2007;3(5):17–20. (In Russ).]
- Mempel M. *Staphylococcus aureus and atopic eczema*. In: Ring JPB, Przybilla B, Ruzicka T, editors. *Handbook of atopic eczema*. Berlin: Springer Science & Business; 2006. p. 406–409.
- Park HY, Kim CR, Huh IS, et al. Staphylococcus aureus colonization in acute and chronic skin lesions of patients with atopic dermatitis. *Ann Dermatol*. 2013;25(4):410–416. doi: 10.5021/ad.2013.25.4.410.
- Gilani SJ, Gonzalez M, Hussain I, et al. Staphylococcus aureus recolonization in atopic dermatitis: beyond the skin. *Clin Exp Dermatol*. 2005;30(1):10–13. doi: 10.1111/j.1365-2230.2004.01679.x.
- Elias PM, Schmuth M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2009;9(4):265–272. doi: 10.1007/s11882-009-0037-y.
- Arisawa T, Arisawa S, Yokoi T, et al. Endoscopic and histological features of the large intestine in patients with atopic dermatitis. *J Clin Biochem Nutr*. 2007;40(1):24–30. doi: 10.3164/jcbn.40.24.
- Stephens AJ, Inman-Bamber J, Giffard PM, Huygens F. High-resolution melting analysis of the spa repeat region of Staphylococcus aureus. *Clin Chem*. 2008;54(2):432–436. doi: 10.1373/clinchem.2007.093658.
- Gürtler V, Barrie HD, Mayall BC. Use of denaturing gradient gel electrophoresis to detect mutation in VS2 of the 16S-23S rDNA spacer amplified from Staphylococcus aureus isolates. *Electrophoresis*. 2001;22(10):1920–1924. doi: 10.1002/1522-2683(200106)22:10<1920::aid-elps1920>3.0.co;2-0.
- Saruta K, Matsunaga T, Kono M, et al. Rapid identification and typing of Staphylococcus aureus by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;146(2):271–278. doi: 10.1016/s0378-1097(96)00487-9.
- Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854(6):528–537. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.022.
- Zhu W, Sieradzki K, Albrecht V, et al. Evaluation of the Biotype MALDI-TOF MS system for identification of Staphylococcus species. *J Microbiol Methods*. 2015;117:14–17. doi: 10.1016/j.mimet.2015.07.014.
- Good P. Permutation tests: a practical guide to resampling methods for testing hypotheses. Springer series in statistics. New York: Springer Science & Business Media; 2013. 228 p.
- Kim BS, Park JY, Song CH, et al. Clarifying the transmission route of Staphylococcus aureus colonizing the skin in early childhood atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2012;109(6):448–453. doi: 10.1016/j.anai.2012.09.015.
- Bonness S, Szekat C, Novak N, Bierbaum G. Pulsed-field gel electrophoresis of Staphylococcus aureus isolates from atopic patients revealing presence of similar strains in isolates from children and their parents. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):456–461. doi: 10.1128/JCM.01734-07.

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

**Пикина Алла Павловна**, старший преподаватель кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: apikina@mail.ru

SPIN-код: 3542-4060, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7232-3288>

**Шкопоров Андрей Николаевич**, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии и биобезопасности РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: ashkoporov@gmail.com

**Кулагина Елена Валерьевна**, научный сотрудник Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

Адрес: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32, тел.: +7 (499) 135 98 46, e-mail: elenka176@yandex.ru

SPIN-код: 3437-5000, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5381-1785>

**Хохлова Екатерина Викторовна**, научный сотрудник лаборатории микробиологии и биобезопасности РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: ashkoporov@gmail.com

**Чаплин Андрей Викторович**, ассистент кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: okolomedik@gmail.com

SPIN-код: 6434-2207, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1377-7153>

**Володин Николай Николаевич**, доктор медицинских наук, академик РАМН, профессор ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачёва

Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, д. 1, тел.: +7 (495) 287-65-70, e-mail: info@fnkc.ru

**Кафарская Людмила Ивановна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: likmed@mail.ru

**Короткий Николай Гаврилович**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой дерматовенерологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Адрес: 117997, Москва, Ленинский проспект, д. 117, тел.: +7 (495) 936-90-16, e-mail: korotkiy\_ng@rsmu.ru

**Ефимов Борис Алексеевич**, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: +7 (495) 434-16-77, e-mail: efimov\_ba@mail.ru