

1. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Муковисцидоз. Н.И. Капранов, Н.Ю. Каширская, ред. Глава 4. Микробиология и эпидемиология инфекционных осложнений у больных муковисцидозом. М.: «МЕДПРАКТИКА-М», 2014: 108–148.
2. Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Семькин С.Ю., Аветисян Л.Р., Каширская Н.Ю., Пивкина Н.В., Данилина Г.А., Батов А.Б., Бусуек Г.П. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом. ЖМЭИ. 2009; 5: 15–20.
3. Ciofu O, Mandsberg LF, Bjarnsholt T, Wassermann T, Hoiby N. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in mucA and/or lasR mutants. *Microbiology*. 2010; 156: 1108–1119.
4. Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Алексеева Г.В., Авакян Л.В., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И., Семькин С.Ю., Сиянова Е.А., Медведева О.С., Красовский С.А., Усачева М.В., Кондратьева Е.И., Амелина Е.Л., Чучалин А.Г., Гицбург А.Л. Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции легких у больных муковисцидозом. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014; 4: 312–324.
5. CLSI, ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20. CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
6. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Visualized Experiments*. 2011; <http://www.jove.com/details.php?id=2437>
7. Шевченко О.В., Эйдельштейн М.В., Степанова М.Н. Методические рекомендации. Металло-бета-лактамазы: значение и методы выявления у грамотрицательных неферментирующих бактерий. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2007; 9 (3): 211–218.
8. Oliver A, Cantón R, Campo P, Vaquero F, Blázquez. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. 2000; 288 (5469): 1251–1254.
9. Lee TW, Brownlee KG, Conway SP, Denton M, Littlewood JM. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros*. 2003; 2: 29–34.
10. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18 (3): 268–281.
11. Kenna DT, Doherty CJ, Foweraker J, Macaskill L, Barcus VA, Govan JR. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology*. 2007; 153: 1852–1859.
12. Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 2002; 34: 91–100.
13. Bjarnsholt T, Jensen PØ, Fiandaca MJ, Pedersen J, Hansen CR, Andersen CB, Pressler T, Givskov M, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr. Pulmonol.* (2009); 44: 547–558. 10.1002/ppul.21011
14. Ehrlich GD, Hu FZ, Shen K, Stoodley P, Post JC. Bacterial Plurality as a General Mechanism Driving Persistence in Chronic Infections. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2005; 437: 20–24.
15. Аветисян Л.Р., Воронина О.Л., Чернуха М.Ю., Кунда М.С., Габриэлян Н.И., Лукин В.Г., Шагинян И.А. Персистенция штаммов *Pseudomonas aeruginosa* среди пациентов ФНЦ трансплантологии и искусственных органов. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2012; 4: 99–104.
16. Kitao T, Tada T, Tanaka M, Narahara K, Shimojima M, Shimada K, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Emergence of a novel multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain producing IMP-type metallo-beta-lactamases and AAC(6)-Iae in Japan. *J. Antimicrob Agents*. 2012; 39 (6): 518–521.
17. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103: 8487–8492.
18. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р. Микробиология и эпидемиология хронической респираторной инфекции при муковисцидозе. Национальный консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия». М., 2016: 47–65.

© Коллектив авторов, 2017

DOI: 10.24110/0031-403X-2018-97-2-86-93  
<https://doi.org/10.24110/0031-403X-2018-97-2-86-93>

Т.А. Тихомиров, О.А. Дмитренко, А.А. Тихомиров, Н.И. Фегорова, Н.Г. Короткий

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЧАСТОТЫ КОЛОНИЗАЦИИ БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ И ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЯМИ ВИДА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, СОДЕРЖАЩИХ ГЕНЫ ТОКСИНОВ, ОБЛАДАЮЩИХ СВОЙСТВАМИ СУПЕРАНТИГЕНОВ

ГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» МЗ РФ, ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ, ФГБУ РДКБ МЗ РФ, Москва, РФ

**Контактная информация:**

**Тихомиров Тимур Александрович** – клинический аспирант каф. дерматовенерологии педиатрического факультета РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ  
 Адрес: Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, 1  
 Тел.: (917) 540-24-84,  
 E-mail: Timur-tihomirov@mail.ru  
 Статья поступила 2.06.17,  
 принята к печати 30.01.18.

**Contact Information:**

**Tikhomirov Timur Aleksandrovich** – clinical post-graduate student of Dermatovenereology Department, Pediatric Faculty, Pirogov Russian National Research Medical University  
 Address: Russia, 117997, Moscow, Ostrovityanova str., 1  
 Tel.: (917) 540-24-84,  
 E-mail: Timur-tihomirov@mail.ru  
 Received on Jun. 2, 2017,  
 submitted for publication on Jan. 30, 2018.



**Цель исследования:** сравнить частоту колонизации/инфицирования *S. aureus* различных экотопов у здоровых и детей, страдающих атопическим дерматитом (АтД), и определить наличие генов экзотоксинов со свойствами суперантигенов. **Материалы и методы исследования:** исследованы 180 мазков с поверхности кожи и полости носа 60 детей с АтД и 30 здоровых детей. Видовую идентификацию осуществляли баканализатором Phoenix (США). Наличие генов экзотоксинов со свойствами суперантигенов определяли методом ПЦР. **Результаты:** установлено достоверное различие по частоте колонизации кожи *S. aureus*, несущим гены токсинов со свойствами суперантигенов, у больных АтД и здоровых детей. Выявлено преобладание штаммов *S. aureus*, несущих гены *seg*, *sec*, *tst*. У больных АтД и здоровых детей установлено статистически достоверное ( $p=0,043$ ) различие по частоте колонизации штаммами *S. aureus*, несущими *seg*. *S. aureus*, несущие гены *sea/sep*, *seb*, были выявлены только у больных АтД. Более чем у 40% детей с АтД были выделены штаммы *S. aureus*, содержащие гены двух и более токсинов.

**Ключевые слова:** атопический дерматит, дети, *Staphylococcus aureus*, суперантигены.

**Цит.:** Т.А. Тихомиров, О.А. Дмитренко, А.А. Тихомиров, Н.И. Федорова, Н.Г. Короткий. Сравнительный анализ частоты колонизации больных атопическим дерматитом и здоровых детей представителями вида *Staphylococcus aureus*, содержащих гены токсинов, обладающих свойствами суперантигенов. *Педиатрия*. 2018; 97 (2): 86–93.

T.A. Tikhomirov, O.A. Dmitrenko, A.A. Tikhomirov, N.I. Fedorova, N.G. Korotkiy

## COMPARATIVE ANALYSIS OF THE COLONIZATION INCIDENCE OF PATIENTS WITH ATOPIC DERMATITIS AND HEALTHY CHILDREN BY REPRESENTATIVES OF THE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SPECIES CONTAINING GENES OF TOXINS WITH PROPERTIES OF SUPERANTIGENS

Pirogov Russian National Research Medical University; Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamalei, Moscow, Russia

**Objective of the research –** to compare the incidence of *S. aureus* colonization/infection of different ecotopes in healthy children and children with atopic dermatitis (AtD) and to determine the presence of exotoxin genes with properties of superantigens. **Study materials and methods:** 180 smears from the skin surface and nasal cavity of 60 children with AtD and 30 healthy children. **Species identification** was performed with bacteria analyzer Phoenix (USA). The presence of exotoxins genes with superantigens properties was determined by the PCR method. **Results:** the study revealed a significant difference in skin colonization incidence by *S. aureus* carrying the genes of toxins with properties of superantigens in patients with AtD and healthy children. The prevalence of *S. aureus* strains carrying *seg*, *sec*, *tst* genes. In patients with AD and healthy children there was a statistically significant ( $p=0,043$ ) difference in incidence of colonization with *S. aureus* strains carrying *seg*. *S. aureus*, carrying the *sea/sep*, *seb* genes, were detected only in patients with AtD. More than 40% of children with AtD had *S. aureus* strains containing genes of two or more toxins.

**Keywords:** atopic dermatitis, children, *Staphylococcus aureus*, superantigens.

**Quote:** Т.А. Тихомиров, О.А. Дмитренко, А.А. Тихомиров, Н.И. Федорова, Н.Г. Короткий. Comparative analysis of the colonization incidence of patients with atopic dermatitis and healthy children by representatives of the *Staphylococcus aureus* species containing genes of toxins with properties of superantigens. *Pediatrics*. 2018; 97 (2): 86–93.

В настоящее время под термином атопический дерматит (АтД) принято понимать хроническое воспалительное заболевание кожи, возникающее чаще в раннем детском возрасте у лиц с предрасположенностью к другим атопическим, чаще респираторным заболеваниям. АтД имеет рецидивирующее течение с возрастными особенностями локализации и морфологии очагов воспаления, характеризуется кожным зудом и во многом обусловлен гиперчувствительностью как к специфическим (аллергенным), так и к неспецифическим раздражителям [1]. По дан-

ных последних исследований, общемировая распространенность АтД в детской популяции превышает 20% и продолжает расти [2]. Согласно данным официальной статистики в РФ, это заболевание ежегодно впервые диагностируют у 240–250 человек на 100 000 обследованного населения [3]. По современным представлениям в патогенезе АтД ключевая роль принадлежит 3 основным факторам: генетическому дефекту барьерной функции кожи, нарушениям иммунного фенотипа и микробным патогенам.

Обсуждение возможности влияния продук-

тов микробных агентов на течение АтД в научной литературе началось во второй половине прошлого века. Первые данные об ассоциации *S. aureus* с тяжестью клинического течения АтД появились в 70-е годы XX века [4]. В процессе исследования К. Neuber и W. Konig пришли к выводу, что продукты клеточной стенки и токсина *S. aureus* способны модулировать цитокинзависимый иммунный ответ, поддерживая острые и хронические аллергические реакции [5]. Так, в исследовании Т.М. Zollner и соавт. было показано, что штаммы, продуцирующие энтеротоксины А (SEA) и В (SEB), значительно увеличивают тяжесть клинического течения АтД [6]. Позднее эти данные были подтверждены в экспериментальных условиях. Изучив воздействие препаратов очищенных SEA, SEB и токсина синдрома токсического шока (TSST-1) на кератиноциты, выделенных из очагов кожных поражений больных АтД и культивированных в условиях *in vitro*, К.Н. Kim и соавт. показали, что названные экзотоксины стимулируют выработку эукариотическими клетками провоспалительных цитокинов: IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  и TNF $\alpha$  [7]. В ряде работ было показано, что тяжесть течения АтД зависит не только от наличия у пациента токсинпродуцирующего золотистого стафилококка, но и от спектра секретируемых токсинов. А.В. Кудрявцева и соавт. изучали *in vitro* продукцию SEA, SEB, TSST-1 у штаммов *S. aureus*, выделенных от больных АтД, с использованием метода иммуноферментного анализа. Было установлено, что способность штаммами *S. aureus* продуцировать TSST-1 дополнительно к SEA и/или SEB значительно утяжеляет течение заболевания [8]. По данным Р. Schlievert и соавт., на коже пациентов с тяжелым клиническим течением АтД, резистентного к стероидной терапии, преобладали представители *S. aureus* с большим набором генов токсинов, обладающих свойствами суперантигенов [9]. Однако результаты работы А. Rojo и соавт. свидетельствуют о корреляции тяжести клинического течения АтД со значением общего уровня IgE, но не демонстрируют связи с показателями специфического IgE к SEA, SEB, SEC, TSST-1 [10].

В настоящее время в группу стафилококковых суперантигенов включают классические стафилококковые энтеротоксины А (SEA), В (SEB), С (SEC), D (SED), Е (SEE), G (SEG), способные вызывать рвоту и диарею [10], токсин синдрома токсического шока (TSST-1), вызывающий менструальный и немменструальный токсикосептический шок [11, 12]. Кроме того, семейство суперантигенов включает в себя энтеротоксин-подобные токсины (SEL-I, SEL-M, SEL-N, SEL-O, SEL-U), патогенетическое значение которых увеличивается за счет комбинаций токсинов [13]. В отличие от обычных антигенов суперантигены активируют Т-клетки без предварительной презентации на поверхности антигенпредставляющих клеток. Они одновременно связываются с молекулами главного комплекса гистосовме-

стимости (МНС II) и фрагментом вариабельной области  $\beta$ -цепи Т-клеточного рецептора (V $\beta$ -ТКР), имитируя узнавание антигена. При этом каждый из суперантигенов способен взаимодействовать только с уникальными фрагментами  $\beta$ -цепи ТКР. В результате этого взаимодействия происходит неспецифическая активация всех Т-клеток, несущих на своей поверхности определенный тип  $\beta$ -субъединиц ТКР. Суперантиген может вызвать активацию и последующую пролиферацию до 60% всех Т-клеток, основную часть которых составляют CD4-положительные Т-хелперы, которые начинают выделять большое количество цитокинов, приводящее к системной токсичности и подавлению адаптивного иммунного ответа [14, 15]. Другой отличительной особенностью суперантигенов является то, что кодирующие их гены находятся на мобильных генетических элементах различных типов, и потому различные штаммы *S. aureus* могут содержать разный набор генов этих токсинов [12].

Остается открытым вопрос о превалирующих штаммах *S. aureus*, колонизирующих пациентов с АтД. Так, в исследовании D.W. Kim и соавт. при изучении 36 штаммов *S. aureus* методами мультилокусного секвенирования (MLST) и Spa-типирования была определена принадлежность этих штаммов к 14 сиквенс-типам и 20 spa-типам, однако преобладающего генотипа авторам установить не удалось [16]. Более того, данные о колонизации *S. aureus* пациентов с АтД также носят противоречивый характер [17, 18].

В 2016 г. в РФ было проведено первое в своем роде пилотное исследование, в рамках которого были обследованы 32 ребенка из Московского региона, страдающих АтД средней и тяжелой степени тяжести. В ходе исследования раневой поверхности и слизистых оболочек полости носа было установлено преобладающее инфицирование штаммами *S. aureus* с генами токсинов, обладающими свойствами суперантигенов. Превалирующими генами экзотоксинов являлись *seg*, *sep*, *tst*. Полученные результаты не совпадали с данными, описанными в зарубежных исследованиях [6–10]. В связи с этим для подтверждения выявленной закономерности было принято решение о расширении выборки, включении участников, проживающих за пределами Московского региона, и сравнении с группой здоровых детей.

Цель исследования: оценить частоту колонизации/инфицирования *S. aureus* различных экотопов у здоровых и детей, страдающих АтД, и определить наличие генов токсинов со свойствами суперантигенов.

#### Материалы и методы исследования

Для достижения поставленной цели было проведено клиническое исследование, одобренное локальным этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова. Опе-



## Основные демографические и клинические характеристики обследованных пациентов

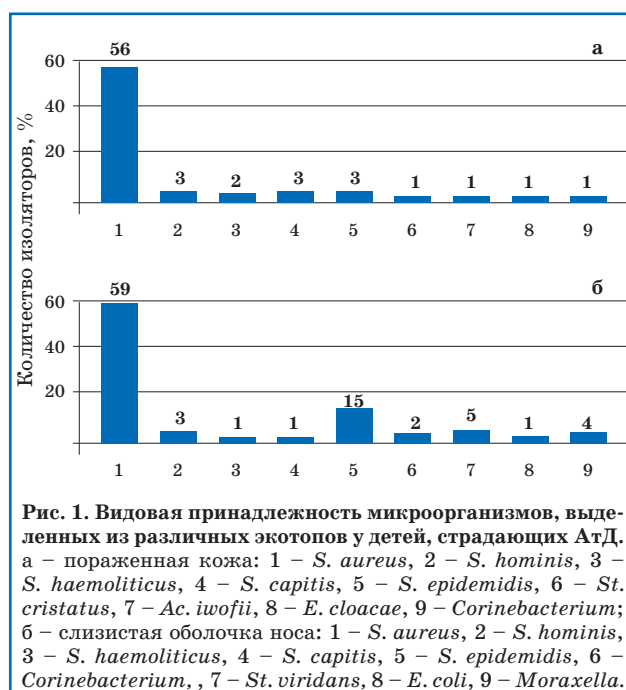
Показатели		Мальчики n=29 (%)	Девочки n=31 (%)
Возраст пациентов, годы	2–12	21 (72%)	24 (77,4%)
	13–17	8 (28%)	7 (22,6%)
Вид вскармливания	Естественное	18 (62%)	23 (74,2%)
	Искусственное	11 (38%)	8 (25,8%)
SCORAD, баллы	20–40	2 (6,9%)	5 (16,1%)
	>40	27 (93,1%)	26 (83,8%)
Бронхиальная астма		17 (58,6%)	21 (67,7%)
Клинико-морфологическая форма АтД	Эритематозно-сквамозная	17 (58,6%)	19 (61,3%)
	Эритематозно-сквамозная с лихенификацией	12 (41,4%)	12 (38,7%)
Характер воспалительного процесса	Острый	12 (41,4%)	14 (45,1%)
	Подострый	7 (24,1%)	9 (29%)
	Хронический	10 (34,5%)	8 (25,8%)

кунами и родителями всех участников было подписано добровольное информированное согласие об участии в исследовании.

От 60 пациентов, находившихся на лечении в отделении дерматовенерологии Российской детской клинической больницы в 1.2015–12.2016 гг. с АтД, а также от 30 здоровых детей были получены 180 образцов клинического материала (мазки с поверхности кожных поражений, со слизистой оболочки полости носа).

Обследование проводили в первые 48 ч от момента поступления в стационар. Посевы осуществляли на дифференциально-диагностические питательные среды стандартными методами. Видовую идентификацию микроорганизмов выполняли с применением автоматического баканализатора Phoenix (Becton Dickinson, США). Количественную оценку результатов бактериологического исследования, в соответствии с Приказом № 535 от 22.04.1985 МЗ СССР, проводили по критериям интенсивности роста на плотной питательной среде: скудный (0–10 колоний), умеренный (10–100 колоний), обильный (>100 колоний). Клиническое обследование включало: сбор анамнестических сведений, оценку клинико-морфологической формы заболевания, характера воспалительного процесса. Степень тяжести АтД оценивали согласно международному стандартизованному индексу (SCORAD), который учитывает площадь поврежденных кожных поверхностей, тяжесть состояния, субъективные ощущения.

**Молекулярно-биологические исследования.** Выделение ДНК из изолятов *S. aureus* выполнили согласно методике, описанной ранее [19]. Наличие расположенных на бактериофагах генов, детерминирующих синтез SEA и энтеротоксин-подобного SEP, а также присутствующих в составе островов патогенности различных типов гены, кодирующие синтез энтеротоксинов SEB, SEC, SEG и токсина синдрома токсического шока (TSST-1), исследовали методом ПЦР с использованием праймеров [20]. Наличие генов *sed* и *see* тестировали согласно методике [21]. ПЦР-амплификацию осуществляли на термоциклире «Терцик». Праймеры были синтезированы фирмой «Евроген» (Россия).



**Рис. 1.** Видовая принадлежность микроорганизмов, выделенных из различных экоотопов у детей, страдающих АтД. а – пораженная кожа: 1 – *S. aureus*, 2 – *S. hominis*, 3 – *S. haemolyticus*, 4 – *S. capitis*, 5 – *S. epidemicus*, 6 – *St. cristatus*, 7 – *Ac. iwofii*, 8 – *E. cloacae*, 9 – *Corinebacterium*; б – слизистая оболочка носа: 1 – *S. aureus*, 2 – *S. hominis*, 3 – *S. haemolyticus*, 4 – *S. capitis*, 5 – *S. epidemicus*, 6 – *Corinebacterium*, 7 – *St. viridans*, 8 – *E. coli*, 9 – *Moraxella*.

Визуализацию продуктов амплификации осуществляли с помощью гель-электрофореза в трис-ацетатном буфере. Размер ампликонов определяли, используя ДНК-руллер фирмы «Fermentas». В качестве положительных контролей использовали ДНК из референтных штаммов *S. aureus* NCTC8511 (*sea*, *seb*), NCTC 9315 (*tst*), NCTC 8331 (*sec*, *tst*), FRI1151m (*sed*), FRI913 (*see*), N315 (*sep*).

Полученные данные подвергали статистической обработке при помощи программы STATISTICA 10 for Windows. Проверку статистической значимости различий для количественных признаков проводили с использованием параметрических критериев: t-критерий Стьюдента (сравнение независимых групп), для качественных признаков с использованием точного метода Фишера. Данные считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты

Основные демографические и клинические характеристики обследованных пациентов пред-

Колонизация *S. aureus* различных экотопов пациентов (n=60), страдающих АтД, и здоровых детей (n=30)

Количество положительных образцов	Группа больных АтД (%)	Группа здоровых (%)	p
На коже •несущие гены токсинов	56 (93,3) 39 (65)	10 (33,3) 3 (10)	<0,0001 0,0293
На слизистой оболочке носа •несущие гены токсинов	59 (98,3) 42 (70)	14 (46,6) 7 (23,3)	<0,0001 0,204

Таблица 3

Наличие генов токсинов, обладающих суперантигенной активностью, у *S. aureus*, выделенных от больных АтД

Источник выделения изолятов	Число выделенных изолятов	Число изолятов, у которых обнаружены гены токсинов (%)								Число изолятов, гены токсинов не обнаружены (%)
		SEA	SEB	SEC	SED	SEE	SEG	SEP	TSST-1	
Поверхность пораженной кожи	56	8 (14,2)	3 (5,3)	7 (12,5)	1	0	29 (51,7)	5 (8,9)	10 (17,8)	15 (26,7)
Слизистая оболочка носа	59	6 (10,1)	3 (5)	7 (11,8)	0	1	32 (54,2)	7 (11,8)	8 (13,5)	16 (27,1)
<b>Итого</b>	<b>115</b>	<b>14 (12,1)</b>	<b>6 (5,2)</b>	<b>14 (12,1)</b>	<b>1 (0,8)</b>	<b>1 (0,8)</b>	<b>61 (53)</b>	<b>12 (10,4)</b>	<b>18 (15,6)</b>	<b>31 (26,9)</b>

ставлены в табл. 1. При статистическом сравнении тяжести состояния мальчиков и девочек значения индекса SCORAD находились в интервалах [29,1; 85,8] и [29; 88,1] баллов, среднее значение SCORAD составило  $58,4 \pm 11,9$  и  $58,7 \pm 15,6$  баллов, доверительный интервал 95% CI 53,92–62,99 и 52,96–64,48 соответственно. При гендерном сравнении тяжести состояния по SCORAD между группами исследуемых с использованием параметрических методов анализа t-критерий Стьюдента был равен  $t=0,0824$ ,  $p=0,9346$ , т.е. различия в сравниваемых группах оказались статистически незначимыми ( $p>0,05$ ).

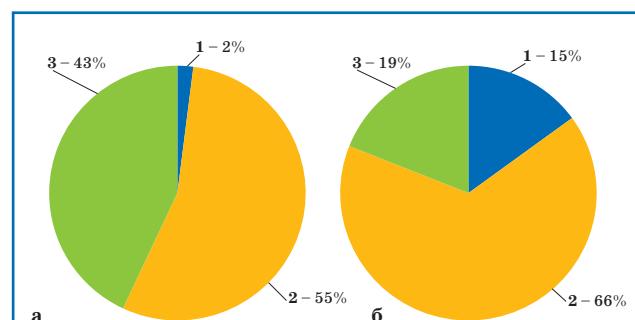
В результате проведенных бактериологических исследований была выявлена принадлежность выделенных микроорганизмов к 8 бактериальным родам (представленным суммарно 15 видами). В образцах биологического материала, полученных с пораженной кожи и слизистой

оболочки полости носа, доминировали представители рода *Staphylococcus* (рис. 1). Они были обнаружены в 56 (93,3%) посевах с пораженной кожи и в 59 (98,3%) – в посевах со слизистой оболочки полости носа.

Дальнейший анализ показал (табл. 2), что *S. aureus* с поверхности кожных поражений был выделен у 56 (93,3%) детей, еще у 10 детей были обнаружены другие представители рода *Staphylococcus*. У 59 (98,3%) детей *S. aureus* был обнаружен на слизистой оболочке полости носа. У 55 (91,6%) пациентов отмечалось сочетанная колонизация *S. aureus* двух экотопов – раневой поверхности и полости носа.

Оценка степени микробной обсемененности *S. aureus* исследуемых экотопов (рис. 2) показала, что на поверхности кожных поражений у 24 (40%) больных отмечался обильный рост *S. aureus*, у 31 (51,6%) – умеренный рост, и только у одного (1,6%) больного был выявлен скудный\*\* рост данного микроорганизма. У 4 больных отмечался рост других микробов. Нескольким иной была степень колонизации слизистой оболочки носа. Обильный рост *S. aureus* выявили у 11 (18,3%) больных, тогда как у 39 (65%) был обнаружен только умеренный рост и еще у 9 пациентов (15%) – скудный\*\*. В группе здоровых детей на поверхности кожи у 5 (16,6%) детей отмечался умеренный рост, еще у 5 (16,6%) – скудный\*\*. На слизистой оболочке полости носа у 2 (6,6%) детей отмечался обильный рост\*\*, умеренный и скудный рост – у 6 соответственно.

Следующим этапом работы была детекция у выделенных изолятов *S. aureus* генов ток-

Рис. 2. Степень обсемененности *S. aureus* различных экотопов.

а – пораженная кожа, б – слизистая оболочка носа; 1 – скудный рост (ед. колонии – 10), 2 – умеренный рост (11–110 колоний), 3 – обильный рост (>100 колоний).

\*Среднее процентное значение изолятов с пораженной кожи и слизистой оболочки носа, у которых обнаружены гены токсинов; \*\*критерий «очень скудный рост» был включен в состав критерия «скудный рост».

Наличие генов токсинов, обладающих суперантигенной активностью, у *S. aureus*, выделенных от здоровых детей

Источник выделения изолятов	Число выделенных изолятов	Число изолятов, у которых обнаружены гены токсинов (%)								Число изолятов, гены токсинов не обнаружены (%)
		SEA	SEB	SEC	SED	SEE	SEG	SEP	TSST-1	
Поверхность кожи	10	0	0	2 (20)	0	0	2 (20)	0	1 (10)	7 (70)
Слизистая оболочка носа	14	0	0	2 (14,2)	0	0	5 (35,7)	0	2 (14,2)	7 (50)
<b>Итого</b>	<b>24</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4 (16,6)</b>			<b>7 (29,1)</b>	<b>0</b>	<b>3 (12,5)</b>	<b>14 (58,3)</b>

синов, обладающих суперантигенной активностью. Согласно результатам ПЦР-реакций (табл. 3) 65% изолятов, выделенных с поверхности пораженной кожи, несли хотя бы один из генов тестируемых токсинов (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sep*, *tst*). Превалирующими генами явились: *seg*, который был обнаружен у 51,7% изученных изолятов, и *tst*, который выявили у 17,8% изолятов. Гены токсинов, кодирующие SEA, были определены у 8 (14,2%) пациентов, SEB – у 3 (5,3%), SEC – у 7 (12,5%) и SEP – у 5 (8,9%). Гены *sed* и *see* в этой группе изолятов были идентифицированы в количестве менее 1%. Были выявлены гены одного токсина: *seg* – у 10 (17,8%) пациентов, *sea* – у 3 (5,3%), *sep* – у 2 (3,5%); гены двух токсинов одновременно были обнаружены у изолятов *S. aureus*, выделенных у 22 (39,2%) пациентов, в т.ч. *seg+tst* – у 8 (14,2%) пациентов, *seg+sec* – у 5 (8,9%), *seg+sea* – у 4 (7,1%), *seb+sep* – у 2 (3,5%), *sep+tst* – у 2 (3,5%), *seg+seb* – у одного (1,7%) пациента, *sea+sec* – также у одного (1,7%) пациента; еще у одного пациента был выделен штамм *S. aureus*, который одновременно содержал гены трех токсинов *seg+sec+sep*. Таким образом, у 23 (41%) больных АтД идентифицированы штаммы *S. aureus*, содержащие гены двух и более токсинов.

Среди изолятов, выделенных со слизистой оболочки носа (табл. 3), доля токсигенных изолятов была еще выше и составила 70%. При этом количество изолятов, несущих ген *seg*, достигло 54,2%, а *sep* – 11,8%; еще у 11,8% изолятов был обнаружен *sec*. Ген *sea* был идентифицирован у 10,1% изолятов, а *seb* – у 5%. Были выявлены гены одного токсина: *seg* – у 12 (20,3%) пациентов, *sea* – у 3 (5%), *sep* – у 3 (5%), *tst* – у одного (1,6%) пациента; гены двух токсинов одновременно были обнаружены: *seg+tst* – у 7 (11,8%) пациентов, *seg+sec* – у 6 (10,1%), *seg+sea* – у 2 (3,3%), *seb+sep* – у 2 (3,3%), *seg+sep* – у 2 (3,3%), *seg+seb* – у одного (1,6%) пациента; гены трех токсинов были определены: *seg+sep+sec* – у одного (1,6%) пациента, *seg+sea+seb* – у одного (1,6%) пациента. Крайне высокая пропорция токсигенных изолятов *S. aureus*, выделенных со слизистой оболочки носа, может свидетельствовать о патогенетической значимости этого очага инфекции. Средние значения результатов, полу-

ченных из двух экотопов, свидетельствуют о значительном превалировании генов *seg* (53%)\* у тестируемых изолятов по сравнению с другими генами: *tst* (15,6%), *sea* (12,1%)\*, *sec* (12,1%)\*.

У 31 (26,9%) изолята *S. aureus* гены тестируемых суперантигенов обнаружены не были.

При изучении образцов, полученных от здоровых детей с поверхности кожи (n=30) и со слизистой оболочки носа (n=30), у 10 (33,3%) из них было выявлено носительство *S. aureus* на поверхности кожи, а 14 (46,6%) детей являлись носителями *S. aureus* на слизистой оболочке носа (табл. 4). Два ребенка имели сочетанное инфицирование обоих исследуемых экотопов. В этой группе токсигенные штаммы на коже и слизистой оболочке носа были идентифицированы у 10 и 23,3% детей соответственно. Среди выделенных изолятов превалировали *S. aureus*, несущие гены: *seg* – у 7 (29,1%) детей, *sec* – у 4 (16,6%) и *tst* – у 3 (12,5%). Были выявлены 4 изолята, одновременно несущие гены двух токсинов: *seg+sec* у 2 детей, *seg+tst* у 2 детей.

Различия по частоте выделения штаммов *S. aureus*, несущих *seg* у больных АтД и здоровых детей, являлись статистически значимыми (p=0,043).

#### Обсуждение

Проведенные исследования показали, что у детей раннего и школьного возраста *S. aureus* является ведущим патогеном, осложняющим течение АтД. Колонизацию поверхности кожи золотистым стафилококком в группе больных АтД выявили у 93,3% детей, при этом у 65% из них были обнаружены токсигенные *S. aureus*. В группе здоровых детей колонизацию кожи данным микроорганизмом выявили у 33,3%, из них только у 10% присутствовали токсигенные *S. aureus*. У подавляющего большинства больных детей наблюдалась и колонизация слизистой оболочки передних отделов носа, при этом доля токсигенных изолятов составила 70%, тогда как у здоровых детей пропорция токсигенных изолятов не превышала 23,3%, несмотря на довольно распространенное носительство золотистого стафилококка на слизистой оболочке носа, которое обнаружили у 46,6% обследованных детей. При статистическом анализе качественных призна-

ков с использованием точного метода Фишера у больных и здоровых детей статистически значимыми были различия как по степени колонизации *S. aureus* кожи ( $p < 0,0001$ ), так и по степени колонизации токсигенными штаммами ( $p = 0,0293$ ). Результаты сравнения степени колонизации *S. aureus* полости носа у больных и здоровых детей были статистически значимыми ( $p < 0,0001$ ), однако результаты сравнения численности токсигенных штаммов были статистически незначимы ( $p = 0,204$ ). Полученные данные согласуются с результатами ряда зарубежных исследований о высокой степени колонизации *S. aureus* именно пациентов раннего возраста [17].

В дополнение к результатам, полученным нами на ограниченной выборке пациентов [22], а также в отличие от данных, полученных ранее другими исследователями с использованием фенотипических методов [8], было установлено, что превалирующими суперантигенами у *S. aureus* наряду с *seg* является *tst*. Полученные данные о превалировании *seg* коррелируют с результатами P. Schlievert [9], полученными молекулярно-генетическими методами, однако доля изолятов, несущих *tst* у группы пациентов, обследованных в настоящей работе, оказалась существенно ниже (15,6 против 50%). Это свидетельствует об отличии набора генов экзотоксинов, обладающих суперантигенными свойствами, у представителей вида *S. aureus*, циркулирующих на территории нашей страны среди пациентов, страдающих АтД, и о необходимости дальнейшего их всестороннего изучения.

По сравнению с классическими энтеротоксинами, такими как SEA, SEB и TSST-1, свойства SEG и SEP менее изучены. В настоящее время известно, что *seg* входит в состав кластера генов энтеротоксинов (*egc*), локализованного на острове патогенности  $vSa\beta$ . Существует несколько структурных вариантов этого кластера генов, в состав которых, помимо *seg*, входят, как правило, гены *seln*, *selo*, *selm*, кодирующие энтеротоксинподобные протеины. Эти данные позволяют предположить, что изоляты *S. aureus*, выделенные от больных АтД и содержащие ген *seg*, дополнительно несут гены, кодирующие еще целый ряд других протеинов, обладающих свойствами суперантигенов. Показано, что *egc*-кодируемые протеины секретируются во время экспоненциальной фазы роста *S. aureus*, тогда как суперантигены, не входящие в этот кластер, обычно секретируются в стационарной фазе [23]. Этот феномен приводит к более ранней активации Т-клеток. Несмотря на относительно широкое распространение штаммов *S. aureus*, несущих *egc*-кластер, антитела, блокирующие входящие в него токсины, по неизвестной до настоящего времени причине у людей образуются значительно реже, чем антитела, нейтрализующие действие других суперантигенов. Так, по данным S. Holtfreter и соавт., не более 10% образцов нормальной сыворотки человека способны ингибировать Т-клеточную стимуляцию,

вызванную энтеротоксинами *egc*-кластера, в то время как 32–86% нейтрализуют классические суперантигены [24]. Кроме того, внутривенное введение препаратов иммуноглобулинов ингибирует *egc* суперантигены в меньшей степени (в 10–100 раз) по сравнению с классическими суперантигенами. Очевидно, что *S. aureus*, несущие *egc*, могут активировать значительные субпопуляции Т-лимфоцитов и тем самым существенно утяжелять течение АтД. По мнению некоторых исследователей, формирование новых серологически отличных протеинов в составе *egc*-кластера является одним из механизмов уклонения *S. aureus* от действия иммунной системы хозяина.

SEP по своему аминокислотному составу сходен с SEA, и ген, его кодирующий, так же как и SEA, присутствует в составе  $\beta$ -конвертирующих бактериофагов, принадлежащих к семейству *Siphoviridae*. Суммарно гены *sea* и *sep* были обнаружены у 22,5% изолятов и, таким образом, занимали второе место после *seg*. Известно, что, помимо энтеротоксинов, эти фаги несут комплекс генов, продукты которых обеспечивают *S. aureus* способность противостоять действию факторов иммунной системы макроорганизма, в т.ч. протеин, ингибирующий хемотаксис нейтрофилов (CHIP); стафилококковый ингибитор комплемента (SCIN), который интерферирует со всеми путями активации комплемента, блокируя C3 конвертазу; а также стафилокиназу (SAK), действие которой приводит к деградации двух основных опсоинов (IgG и C3b). Кроме того, SAK способна ингибировать бактерицидный эффект антимикробных пептидов, получивших название  $\alpha$ -дефензинов. Следовательно, данная группа фагов может вносить существенный вклад в патогенез АтД, воздействуя на различные компоненты нативной иммунной системы.

У 31 изолята (26,9%) мы не обнаружили генов суперантигенов. Возможно, это обусловлено недостаточно широким спектром тестированных в настоящем исследовании генов, кодирующих энтеротоксины: SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEP, TSST-1. Более полное представление о патогенных свойствах этих штаммов может быть получено с помощью их полногеномного секвенирования.

В результате настоящего исследования впервые в РФ были получены данные о некоторых молекулярно-генетических особенностях штаммов *S. aureus*, инфицирующих детей, страдающих АтД. Полученные данные имеют существенные отличия от результатов исследований, проведенных ранее фенотипическими методами [25], а также от результатов молекулярно-генетических исследований, проведенных в ряде азиатских [9, 15] и европейских стран [6, 16], что может свидетельствовать о возможном изменении спектра циркулирующих токсигенных штаммов *S. aureus*, распространенных в РФ, и о необходимости использования молекулярно-генетических методов исследования для изучения роли данного микроорганизма в патогенезе АтД.



## Выводы

1. Впервые на территории РФ у здоровых и детей с АД при использовании молекулярно-генетических методов исследования выявлены достоверные различия ( $p=0,0298$ ) колонизации кожи *S. aureus*, несущим гены токсинов, обладающих свойствами суперантигенов.

2. В группе больных АД и здоровых детей преобладали штаммы *S. aureus*, несущие гены *seg*, *sec*, *tst*. Штаммы *S. aureus*, несущие гены *sea/sep*, *seb*, были выявлены только у больных АД. Различия по частоте выделения штаммов *S. aureus*, несущих *seg* у больных АД и здоро-

вых детей, являлись статистически значимыми ( $p=0,043$ ). В группе больных АД у 23 (41%) детей идентифицированы штаммы *S. aureus*, содержащие гены двух и более токсинов.

3. Высокие показатели частоты носительства *S. aureus*, обладающего генами суперантигенов, на слизистой оболочке носа необходимо учитывать при разработке схем лечения больных АД.

**Финансирование и конфликт интересов:** авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, а также финансовой поддержки исследования, о которых необходимо сообщить.

## Литература

1. Короткий Н.Г., Тихомиров Т.А., Таганов А.В., Короткий В.Н., Тихомиров А.А. Атопический дерматит. М.: ООО «Прондо», 2016.
2. Nutten S. Atopic dermatitis: Global epidemiology and risk factors. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2015; 66: 8–16.
3. Феденко Е.С. Факторы риска развития атопического дерматита. *Лечащий врач*. 2002; 4: 20–23.
4. Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol*. 1974; 90: 525–530.
5. Neuber K, König W. Effects of *Staphylococcus aureus* cell wall products (teichoic acid, peptidoglycan) and enterotoxin B on immunoglobulin (IgE, IgA, IgG) synthesis and CD23 expression in patients with atopic dermatitis. *Immunology*. 1992; 75 (1): 23–28.
6. Zollner TM, Wichelhaus TA, Hartung A, Von Mallinckrodt C, Wagner TO, Brade V, Kaufmann R. Colonization with superantigen-producing *Staphylococcus aureus* is associated with increased severity of atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy*. 2000; 30 (7): 994–1000.
7. Kyu Han Kim, Ji Hyun Han, Jin Ho Chung, Kwang Hyun Cho, Hee Chul Eun. Role of *Staphylococcal* Superantigen in Atopic Dermatitis: Influence on Keratinocytes. *J. Korean Med. Sci*. 2006; 21 (2): 315–323.
8. Кудрявцева А.В., Флюер Ф.С., Балаболкина И.И., Прохоров В.Я., Катосова Л.К., Лазарева А.В., Пономаренко О.А. Зависимость тяжести течения атопического дерматита у детей от токсинпродуцирующих свойств штаммов золотистого стафилококка. *Российский педиатрический журнал*. 2009; 3: 31–35.
9. Schlievert P, Case L, Strandberg K, Abrams B, Leung D. Superantigen Profile of *Staphylococcus aureus* Isolates from Patients with Steroid Resistant Atopic Dermatitis. *Clinical Infectious Diseases*. 2008; 46 (10): 1562–1567.
10. Rojo A, Aguinaga A, Monecke S, Yuste JR, Gastaminza G, España A. *Staphylococcus aureus* genomic pattern and atopic dermatitis: may factors other than superantigens be involved? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2014; 33 (4): 651–658.
11. Argudín MÁ, Mendoza MC, Rodicio MR. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel)*. 2010; 2 (7): 1751–1773.
12. Salgado-Pabón W, Case-Cook LC, Schlievert PM. Molecular analysis of staphylococcal superantigens. *Methods Mol. Biol*. 2014; 1085: 169–185.
13. Joseph A, Merriman, Elizabeth A. Mueller, Michael P. Cahill, Lisa A. Beck, Amy S. Paller, Jon M. Hanifin, Peck Y. Ong, Lynda Schneider, Denise C. Babineau, Gloria David, Alexandre Lockhart, Keli Artis, Donald Y.M. Leung, Patrick M. Schlievert. Temporal and Racial Differences Associated with Atopic Dermatitis *Staphylococcus aureus* and Encoded Virulence Factors. *mSphere*. 2016; 1 (6): e00295–16.
14. Thomas D, Dauwalder O, Brun V, Badiou C, Ferry T, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. *Staphylococcus aureus* superantigens elicit redundant and extensive human Vbeta patterns. *Infect. Immun*. 2009; 77 (5): 2043–2050.
15. Krakauer T, Pradhan K, Stiles BG. Staphylococcal Superantigens Spark Host-Mediated Danger Signals. *Front. Immunol*. 2016; 2 (7): 23.
16. Kim DW, Park JY, Park KD, Kim TH, Lee WJ, Lee SJ, Kim J. Are there predominant strains and toxins of *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis patients? Genotypic characterization and toxin determination of *S. aureus* isolated in adolescent and adult patients with atopic dermatitis. *J. Dermatol*. 2009; 36 (2): 75–81.
17. Bilal JA, Ahmad MI, Robaee AA, Alzolibani AA, Shobaili HA, Al-Khowailed MS. Pattern of bacterial colonization of atopic dermatitis in Saudi children. *J. Clin. Diagn. Res*. 2013; 7 (9): 1968–1970.
18. Bourrain M, Ribet V, Calvez A, Lebaron P, Schmitt AM. Balance between beneficial microflora and *Staphylococcus aureus* colonisation: in vivo evaluation in patients with atopic dermatitis during hydrotherapy. *Eur. J. Dermatol*. 2013; 23 (6): 786–794.
19. Дмитренко О.А., Шагинян И.А., Гинцбург А.Л. Исследование полиморфизма мес ДНК у метициллинрезистентных штаммов золотистого стафилококка, выделенных в стационарах разных регионов России. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2005; 3: 11–17.
20. Holtfreter S, Grumann D, Schmutte M, Nguyen HT, Eichler P, Strommenger B, Kopron K, Kolata J, Giedrys-Kalemba S, Steinmetz I, Witte W, Bröker BM. Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol*. 2007; 45 (8): 2669–2680.
21. Eissa MBN. Molekularbiologischer Nachweis mutmaßlicher Virulenzfaktoren bei *Staphylococcus aureus* Kulturen, isoliert von Rinder Mastitiden. Inaugural-Diss. Dr. Vet. Med. Gie Ben, 2007: 187.
22. Тихомиров Т.А., Федорова Н.И., Короткий В.Н., Тихомиров А.А., Дмитренко О.А. Микробиологические особенности воспалительного процесса в различных экотопах, у детей, страдающих атопическим дерматитом. *Клиническая дерматология и венерология*. 2016; 15 (3): 43–47.
23. Grumann D, Scharf SS, Holtfreter S, Kohler C, Steil L, Engelmann S, Hecker M, Völker U, Bröker BM. Immune cell activation by enterotoxin gene cluster (*egc*)-encoded and non-*egc* superantigens from *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol*. 2008; 181 (7): 5054–5061.
24. Holtfreter S, Bauer K, Thomas D, Feig C, Lorenz V, Roschack K, Friebe E, Selleng K, Lövenich S, Greve T, Greinacher A, Panzig B, Engelmann S, Lina G, Bröker BM. *egc*-Encoded superantigens from *Staphylococcus aureus* are neutralized by human sera much less efficiently than are classical staphylococcal enterotoxins or toxic shock syndrome toxin. *Infect. Immun*. 2004; 72 (7): 4061–4071.
25. Флюер Ф.С. Стафилококки и их энтеротоксины как фактор риска возникновения атопического дерматита. *Педиатрия*. 2014; 93 (3): 124–129.