

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА РОЖИСТОГО ВОСПАЛЕНИЯ, ОБУСЛОВЛЕННОГО УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ РОДА STAPHYLOCOCCUS В ХИРУРГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

А.Г. Хасанов, А.Р. Мавзютов, Д.Г. Шайбаков, А.А. Халиуллина

ГБОУ ВПО Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа

Хасанов Анвар Гиниятович,

зав. кафедрой хирургических болезней БГМУ,
д-р мед. наук, профессор,
e-mail: HASANOVAG@mail.ru,

Мавзютов Айрат Радикович,

зав. кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии
БГМУ, д-р мед. наук, профессор,

Халиуллина Айгуль Амировна,

ассистент кафедры фундаментальной и прикладной
микробиологии БГМУ, врач-биолог ГКБ №8,

Шайбаков Данис Габдинурович,

доцент кафедры хирургических болезней БГМУ, канд. мед. наук,
450000, Россия, г. Уфа, ул. Ленина, д. 3,
тел. 8 (347) 264-16-19,
e-mail: Danis.com@yandex.ru

Проведено молекулярно-генетическое исследование биоптата кожи с использованием метода ПЦР-реакции. Исследование штаммов S.aureus из чешуек эпидермиса кожи с очага воспаления и с конгруэнтной здоровой части у больных рожистым воспалением позволило выявить наиболее распространенные генетические маркеры факторов патогенности стафилококков.

Ключевые слова: факторы патогенности, ПЦР-реакция, S.aureus.

MOLECULAR DIAGNOSIS OF ERYSIPELAS DUE OPPORTUNISTIC BACTERIA OF THE GENUS STAPHYLOCOCCUS IN SURGICAL PRACTICE

A.G. Khasanov, A.R. Mavzyutov, D.G. Shaibakov, A.A. Khaliullina

Bashkir State Medical University, Ufa

A molecular genetic study of skin biopsy specimens using the PCR reaction has done. Investigation of strains of S.aureus, flakes of skin epidermis with inflammatory foci and congruent with the healthy part of erysipelas in patients revealed the most common genetic markers of pathogenicity factors of staphylococci.

The key words: pathogenicity factors, the PCR reaction, S. aureus.

Введение

В настоящее время общепринята точка зрения о стрептококковой этиологии рожи, хотя на фоне лечения антибиотиками крайне редко удается выделить у больных гемолитический стрептококк из крови и очага воспаления. В связи с этим была вновь выдвинута гипотеза о полиэтиологичности рожи. Это позволило некоторым ученым говорить о ведущей роли стафилококков в этиологии рожи [1,3]. Ряд авторов также не исключает роль стрептококков группы В, С, D и G, других бактерий и различных ассо-

циаций микроорганизмов в развитии рожи [3,5,6,7]. В пользу значимой роли стафилококка говорит и тот факт, что из очага воспаления и биопсированных участков кожи больных рожей чаще всего стали высеивать стафилококки. Редкое выделение в последние годы гемолитического стрептококка у больных рожей объясняется как высокой чувствительностью микроба к назначаемым антибиотикам, так и несовершенством применяемых бактериологических методов диагностики. Существует мнение, что патогенные стафилококки, кишечная палочка, синегнойная

палочка, протей и другие микроорганизмы имеют лишь сопричастность к формированию осложнений при роже, т.е. выступают в качестве вторичной инфекции [2]. Однако, с позиции клиницистов кажется маловероятным, что стафилококк имел сколь-нибудь серьезное значение в этиологии неосложненных форм рожи. Быстрое купирование острых проявлений болезни пенициллином, применяющимся в средних терапевтических дозах, крайняя редкость осложнений в виде сепсиса и тромбоэмболических процессов, серозный и серозно-геморрагический характер воспаления абсолютно не характерны для обширных и глубоких стафилококковых поражений кожи. Определяющим фактором в развитии заболевания является местная и общая реакция организма на стрептококковую инфекцию.

С точки зрения микробиологии, одним из наиболее важных свойств кожного покрова является контроль микробной популяции, населяющей поверхность кожи, и защита нижележащих тканей от колонизации патогенными и условно патогенными (оппортунистическими) микроорганизмами. Нарушение целостности кожного покрова в результате раневых поражений открывает доступ к влажному, теплomu и богатому питательному веществам пространству, которое является идеальным местом для размножения микроорганизмов. Кожа выполняет, прежде всего, барьерную функцию, тем не менее ее роль в инициации иммунного ответа несомненна. Высокая миграционная способность иммунокомпетентных клеток обеспечивает устойчивую связь кожи с центральными органами иммуногенеза. Любое нарушение целостности кожных покровов вызывает активизацию иммунокомпетентных клеток кожи, обеспечивая устранение локальной агрессии и формирование иммунной памяти. М.Г. Рыскалов [3] считает, что стрептококк вызывает подавление местного иммунитета, тем самым вызывает нарушения микробного баланса кожи и создает условия для развития условно патогенной и патогенной флоры.

Цель исследования

Выявление фрагментов ДНК *S.aureus*, специфичных соответствующим детерминантам факторов патогенности у больных рожистым воспалением кожи.

Материалы и методы

Для проверки гипотезы о роли условно-патогенных бактерий рода *Staphylococcus* кожи в этиологии рожистого воспаления проведено молекулярно-генетическое исследование биоптата кожи с использованием метода ПЦР-реакции. Материалом для исследования служили чешуйки кожи эпидермиса у 68 больных рожистым воспалением, находившихся на стационарном лечении в ГКБ №8. Тотальную бактериальную ДНК выделяли из чешуек эпидермиса кожи от больных рожистым воспалением и из колоний эталонных штаммов *Staphylococcus* spp, полученных из Оренбургского Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН. ДНК выделяли двумя методами. Использовали

стандартные наборы для выделения ДНК («ДНК-Со-рб АМ», Россия и ДНК-экспресс фирмы Литех). Тестирование на наличие фрагментов ДНК, специфичных соответствующим детерминантам факторов патогенности клинических штаммов *S.aureus*, выделенных у больных, осуществлялось с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Для подбора праймеров и оптимальных условий для ПЦР поиск последовательностей геномов патогенов проводили с помощью Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и программы Primer Select из пакета программ DNASTar, выравнивания сиквенсов, проводили с помощью пакета компьютерных программ Lasergene фирмы DNASTAR, Inc. (США) с использованием IBM-совместимых персональных компьютеров. При выборе последовательностей прежде всего обращали внимание на возможность подбора специфичных праймеров и высокую копийность гена, позволяющую разработать более чувствительную и специфичную диагностическую систему. Молекулярно-генетическое исследование проводилось с использованием праймеров к ряду генетических маркеров факторов патогенности (*sea*, *seb*, *sec*, *tsst*, *lukS-PV*, *lukFPV*, *agr*, *mecA*, *icaA*) клинических штаммов *S.aureus*. Оценка значимости различий проводилась с помощью критерия Пирсона (критерия хи-квадрат) с поправкой Йейтса. В тех случаях, когда ожидаемая частота была меньше 5, для оценки значимости использовался точный критерий Фишера.

Результаты и обсуждение

Исследование штаммов *S.aureus* из чешуек эпидермиса кожи больных рожистым воспалением позволило выявить наиболее распространенные генетические маркеры факторов патогенности, в частности, фрагменты ДНК цитолитического токсина Panton-Valentine-лейкоцидина (PVL-F), биологический эффект которого определяется действием двух отдельных экзопротеинов – S (*lukS-P*) и F (*lukF-PV*) компонентами; энтеротоксина C (*sec3*) и A (*sea*), а также гена *agr* – регулятора синтеза токсинов микроорганизма во внешнюю среду обитания.

Таблица 1
Гены патогенности *s.aureus*, выделенные из чешуек эпидермиса кожи больных рожистым воспалением

Гены факторов патогенности	<i>S.aureus</i>		
	здоровая нога	пораженная нога	p
<i>sea</i>	89,7%	92,6%	0,762
<i>lukS-PV</i>	84,4%	100%	0,001
<i>lukF-PV</i>	91,2%	100%	0,028
<i>agr</i>	88,2%	100%	0,006
<i>seb</i>	0%	0%	-
<i>sec3</i>	72%	100%	0,001
<i>tsst</i>	0%	17,6%	0,001
<i>icaA</i>	0%	0%	-
<i>mecA</i>	0%	8,8%	0,028

В то же время, для частот встречаемости генетических маркеров *S.aureus*: PVL, энтеротоксинов sec и sea, регулятора синтеза гена agr характерная статистически значимая разница не обнаружена. Отмечалась повышенная частота выявляемости переносимых фрагментов ДНК *S. aureus* в чешуйках кожи в пораженной ноге больных рожистым воспалением и более низкая выявляемость в здоровой стороне (таблица 1).

Были найдены значимые различия для генов lukF-PV (84,4% – здоровая нога, 100% – пораженная нога) и lukS-PV (91,2% – здоровая нога, 100% – пораженная нога), кодирующих синтез экзопротеинов F и Сцитолитического токсина Panton-Valentine лейкоцидина, обладающего высокой афинностью к человеческим лейкоцитам, а также для генов sec3 (72% – здоровая нога и 100% – пораженная нога), кодирующих синтез стафилококкового энтеротоксина и для гена agr (88,2% – здоровая нога и 100% – пораженная нога), ответственного за синтез токсина микроорганизмов во внешнюю среду, экспрессируемые штаммом *S.aureus*, у больных рожистым воспалением кожи. Изменения статистически значимой активности гена патогенности sea (89,7% – здоровая нога и 92,6% – пораженная нога) в наших исследованиях не наблюдалось.

Заключение

Можно предположить, что при обнаружении гена tsst, ответственного за синтез токсина синдрома токсического шока (17,6%) и гена резистентности к метициллину mecA в пораженной ноге (8,8%) свидетельствует о нецелесообразности применения антибиотиков данной группы как препарата для антибактериальной терапии. Также

мы полагаем, что стрептококк при рожистом воспалении запускает механизмы, меняющие условия среды обитания стафилококков, а изменение среды обитания потенцирует факторы патогенности последних, и они включаются в воспалительный процесс. Это многоуровневое, эволюционно обусловленное, межвидовым возимо потенцируемым проникновением микроорганизмов в кожу воспаление, по типу «каскадного воспаления».

Список литературы

1. Белобородов В.Б., Митрохин С.Д. Стафилококковые инфекции // Инфекции и антимикробная химиотерапия. - 2003. - Т. 5. - №1. - С. 12-18.
2. Кортев А.И. Рожа / А.И.Кортев, В.Н.Дроздов // Очерки инфекционных и схожих болезней. Инфекции и врачебные ошибки. Маски инфекционных болезней / под ред. А.И.Кортева. - М., 1997. - 368 с.
3. Расковалов М.Г., Пономарева Т.Л. О роли стафилококковой и другой микрофлоры в этиопатогенезе и клинике рожистого воспаления кожи // ЖМЭИ. - 1970. - №8. - С. 123-124.
4. An experimental model of cutaneous infection induced by superantigenproducing *Staphylococcus aureus* / L. Molne [et al.] // J. Invest. Dermatol. - 2000. - Vol. 114. - №6. - P. 1120-1125.
5. Erysipelas: clinical and bacteriologic spectrum and serological aspects / B.Eriksson [et al] // Clin. Infect. Dis. - 1996. - Vol. 23. - № 5. - P. 1091-1098.
6. Erysipelas: microbiological and pathogenic data / F. Denis [et al.] // Ann. Dermatol.Venereol. - 2001.- Vol. 128. - № 3. - Pt. 2. - P. 317-325.
7. Skin microflora and bacterial infections of the skin / K. Chiller [et al.] // J. InvestigDermatol. Symp. Proc. - 2001.- Vol. 6. - № 3. - P. 170-174.