

А.В.Алешкин¹, О.Ю.Борисова^{1,2}, Н.Т.Гадуа¹, С.С.Бочкарева¹, В.А.Чернова³,
И.П.Требунских⁴, Б.А.Ефимов², Л.И.Кафарская², С.С.Афанасьев¹,
В.А.Алешкин¹, М.С.Афанасьев⁵, А.Б.Борисова^{1,2}, А.В.Караулов⁵

МИКРОБИОЦЕНОЗ КОЖИ У БОЛЬНЫХ БРОМГИДРОЗОМ

¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского, ²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, ³Национальный медико-хирургический центр «Детский консультативно-диагностический центр им. Н.И.Пирогова», ⁴Центр гигиены и эпидемиологии в Москве, ⁵Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова

Цель. Оценка состава микроорганизмов, входящих в микробиоценоз кожи подмышечных впадин, у больных бромгидрозом. *Материалы и методы.* Обследованы 23 пациента (11 — 17 лет), находящиеся под наблюдением в ДКДЦ им. Н.И. Пирогова «Национальный медико-хирургический центр». Идентификацию осуществляли с помощью биохимических тест-систем BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», Франция) и секвенирования гена 16SrRNA с последующим сопоставлением с EMBL/NCBI. *Результаты.* У большинства пациентов с бромгидрозом (52,2% и 43,5%) была средняя и высокая степень обсемененности микробиоты кожи. Идентифицировано 137 штаммов, относящихся к 5 родам микроорганизмов — *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Candida* и *Bacillus* spp. В микробиоценозах преобладали (89,1%) штаммы рода *Corynebacterium* (8 видов) и рода *Staphylococcus* (5 видов). Среди *Corynebacterium* доминировали штаммы *C.tuberculostearicum*, а среди *Staphylococcus* — *S.hominis*. *Заключение.* В большинстве случаев (82,6%) у больных микробиоценоз кожи подмышечных впадин представлен консорциумами из микроорганизмов с преобладанием микроорганизмов *Corynebacterium* и *Staphylococcus*.

Журн. микробиол., 2017, № 5, С. 53—58

Ключевые слова: микробиота кожи, бромгидроз, обсемененность микроорганизмами, подмышечные впадины

А.В.Алешкин¹, О.Ю.Борисова^{1,2}, Н.Т.Гадуа¹, С.С.Бочкарева¹, В.А.Чернова³,
И.П.Требунских⁴, Б.А.Ефимов², Л.И.Кафарская², С.С.Афанасьев¹,
В.А.Алешкин¹, М.С.Афанасьев⁵, А.Б.Борисова^{1,2}, А.В.Караулов⁵

MICROBIOCENOSIS OF SKIN IN BROMHIDROSIS PATIENTS

¹Gabrichesky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, ²Pirogov Russian National Research Medical University, ³National Medical Surgery Centre «Pirogov Children Consultant Diagnostic Centre», ⁴Centre of Hygiene and Epidemiology in Moscow, ⁵Sechenov First Moscow State Medical University, Russia

Aim. Evaluate the composition of microorganisms of skin microbiocenosis of axilla in bromhidrosis patients. *Materials and methods.* 23 patients were examined (11 — 17 years) under the observation at Pirogov CCDC of the National Medical-Surgery Centre. Identification was carried out using biochemical test-systems BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», France) and 16SrRNA gene sequencing with consequent juxtaposition with EMBL/NCBI. Medium and high degree of skin seeding with microbiota was present in most of the patients with bromhidrosis (52.2 and 43.5%). 137 strains belonging to 5 genera of microorganisms were identified — *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Micrococcus*, *Candida* and *Bacillus* spp. *Corynebacterium* genus strains (8 species) and *Staphylococcus* genus (5 species) prevailed in microbiocenosis (89.1%). *C. tuberculostearicum* strains dominated among *Corynebacterium*, and *S. hominis* — *Staphylococcus*. *Conclusion.* In most of the cases (82.6%) in patients microbiocenosis of skin of axilla was presented by consortiums of microorganisms with prevalence of *Corynebacterium* and *Staphylococcus* microorganisms.

Key words: skin microbiota, bromhidrosis, microorganism seeding, axilla

ВВЕДЕНИЕ

Потовые железы является особым видом желез, специализирующихся на выработке и выделении необходимого количества пота, защита кожи, поддержка водного и солевого баланса. Потовые железы выглядят как трубчатые железы со свернутыми в клубочки концами и состоят из конечной части и протока, который выводит пот на наружный слой кожи. Различают два вида желез: эккриновые и апокриновые, различающиеся по функциональности и строению, последние из которых находятся в подмышечных впадинах.

Запах пота является важным компонентом индивидуального запаха тела. Различают нейтрально пахнущий пот (номидроз), запах которого едва ощутим, пот с резким запахом — осмидроз и зловонный пот — бромгидроз. Часто у людей с незначительным и умеренным потоотделением возникает проблема особенно неприятного запаха (бромгидроз) в подмышечных областях.

Микробиоценоз кожи подмышечных впадин является уникальным, так как сочетает в себе наличие микробного сообщества в нише, характеризующейся определенными физиологическими свойствами — определенный температурный режим, влажность, наличие волосяных фолликулов, сальных желез, экринов, апокринов, солей, белков, стеринов, сложных эфиров стерина, сложных эфиров воска, различных липидов, жирных кислот и т.д. [4, 5, 8 — 10]. Запах возникает, когда микроорганизмы, живущие на поверхности кожи, расщепляют пот на плохо пахнущие кислоты.

В связи с этим, целью исследования является оценка состава культивируемых микроорганизмов, входящих в микробиоценоз кожи подмышечных впадин, у больных бромгидрозом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 23 пациента с диагнозом «бромгидроз», находящихся под наблюдением в Детском консультативно-диагностическом центре им. Н.И.Пирогова «Национальный медико-хирургический центр». Из них 5 девочек и 18 мальчиков в возрасте 11 — 17 лет.

Взятие материала с кожи подмышечных впадин осуществляли с помощью стерильных одноразовых сухих коммерческих тампонов («Sorap», Италия) и доставляли в течение 2 часов, соблюдая температурный режим. Для стандартизации количественной оценки роста микроорганизмов клинический материал с тампона засеивали по Голду тампоном на 0,5 чашки с 20% агаром с кровью крупного рогатого скота («Лейтран», Москва), в качестве агаровой основы использовали ГРМ-агар (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посев осуществляли плотными непрерывными штрихами (сектор А) и рассевом калибровочной петлей 10 мкл на сектора I, II и III. Оценку микробного роста проводили в зависимости от количества выросших колоний в перерасчете в КОЕ/мл. Для оценки качественного состава микробиоты кожи подмышечных впадин клинический материал также засеивали на несколько питательных сред: кровяно-теллуриновый агар (на основе ГРМ-агара, ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10% крови крупного рогатого скота («Лейтран», Москва), желточно-солевой агар (на основе солевого агара) и агар Сабуро («HiMedia», Индия), среду Эндо и энтерококкагар (ГНЦ ПМБ, Оболенск). Все посевы

также культивировали по стандартной методике при температуре 37°C в течении 24 — 48 часов.

Идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Биохимическую идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли с помощью коммерческих биохимических тест-систем Стафитест-24 («PLIVA-Lachema Diagnostica», Чехия), для дрожжевых грибов — Candida-тест («PLIVA-Lachema Diagnostica», Чехия), Pastorexтmstrep — сенсibilизированный латекс для дифференциации Streptococcus групп А, В, С, D, F, G («Bio-Rad»), оптохиновый тест, тест с желчью, определение каталазной и гемолитической активности. Также для видовой идентификации микроорганизмов использовали масс-спектрометрический метод с помощью времяпролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», Франция) и секвенирование гена 16SrRNA, согласно [1, 4, 7 — 9].

Хромосомальную ДНК выделяли методом кипячения согласно (Маниатис Т., 1984 г.) из 24-часовой культуры микроорганизмов, выращенной на кровяном агаре. Далее одну микробиологическую петлю культуры суспендировали в 150 мкл деионизированной воды и инкубировали 20 минут при 95°C, после чего центрифугировали при 12 000 об/мин. Выявление фрагментов гена 16SrRNA осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции в соответствии с [8, 9]. Амплификацию фрагментов нуклеотидных последовательностей проводили в термоциклере «С-1000 Touch» (Bio-Rad, США). Детекцию результатов амплификации осуществляли путем постановки горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле при 160 V в течение 40 мин с последующим сравнением электрофоретической подвижности специфических светящихся фрагментов амплифицированных продуктов с подвижностью фрагментов маркера молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва). Секвенирование фрагментов ДНК выделенных штаммов осуществляли согласно общепринятому методу Сенджера в компании «Евроген» (Москва). Результаты секвенирования обрабатывались с помощью программного обеспечения BLAST и ChromasLite (для формата хроматограммы), секвенированные последовательности сопоставляли с международной on-line базой данных EMBL/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На основе эмпирических исследований была проведена полуколичественная оценка микробного роста в зависимости от количества выросших колоний при прямом посеве биоматериала, в перерасчете в КОЕ/мл/г. Полуколичественная оценка микробного роста показала, что в большинстве случаев у пациентов с бромгидрозом (12, 52,2%) и (10, 43,5%) была средняя и высокая степень обсемененности микробиоты кожи подмышечных впадин, и только у одного пациента (4,3%) — низкая степень обсемененности (4 lg КОЕ/мл). Причем более выраженная обсемененность кожи была у мальчиков, по сравнению с девочками.

Нами впервые с помощью масс-спектрометрического метода и секвенирования гена 16SrRNA охарактеризован микробиоценоз кожи подмышечных впадин у больных с бромгидрозом. При культуральной диагностике в аэробных условиях обнаружен рост широкого спектра факультативно-анаэробных микроорганизмов, выделено и идентифицировано 137 штаммов, относящихся к 5 родам микроорганизмов. Из них большинство 68 (49,6%) штаммов принадлежали к роду Corynebacterium, 54 (39,5%) штамма — к роду Staphylococcus, 7

(5,2%) штаммов — к роду *Moraxella*, 5 (3,6%) штаммов — к роду *Micrococcus* и в единичном количестве выделены *Candida* и микроорганизмы рода *Bacillus* spp. (1, 0,7%) и 2, 1,4%) штамма соответственно). Следовательно, в микробиоценозе кожи подмышечных впадин у больных с бромгидрозом преобладают грамположительные микроорганизмы.

На следующем этапе нами проведена видовая идентификация выделенных микроорганизмов. В данном микробиоценозе наиболее многочисленной и разнообразной по составу была группа микроорганизмов рода *Corynebacterium*. Идентифицировано 68 штаммов, относящихся к 8 видам микроорганизмов этого рода. Состав выделенных коринебактерий распределился следующим образом: *C. tuberculostearicum* — 30 (44,1%) штаммов, *C. afermentas* subsp. *lipophilum* — 10 (14,7%) штаммов, *C. ureicelerivorans* — 9 (13,2%) штаммов, *C. mucifaciens* — 8 (11,8%) штаммов, *C. afermentas* subsp. *afermentas* — 7 (10,3%) штаммов, *C. coyleae* — 2 (2,9%) штамма, *C. afermentas* — 1 (1,5%) штамм и *C. massiliensis* — 1 (1,5%) штамм. Следовательно, в микробиоценозе кожи подмышечных впадин у больных с бромгидрозом наиболее многочисленной и разнообразной оказалась группа коринеформных микроорганизмов, среди которых преобладали штаммы *C. tuberculostearicum*.

Второй по распространенности в этом микробиоценозе была группа микроорганизмов рода *Staphylococcus*. Нами идентифицировано 46 штаммов, относящихся к 5 видам микроорганизмов: *S. hominis* — 39 (72,2%) штаммов, *Staphylococcus epidermidis* — 8 (14,8%) штаммов, *S. aureus* — 5 (9,2%) штаммов, *S. haemolyticus* — 1 (1,9%) штамм и *S. capitis* — 1 (1,9%) штамм. Следовательно, среди выделенных стафилококков у больных с бромгидрозом в микробиоценозе кожи подмышечных впадин преобладали штаммы *Staphylococcus hominis*.

Среди минорных групп выделенных микроорганизмов обнаружено 7 (5,1%) штаммов *Moraxella* spp., 5 (3,6%) штаммов *Micrococcus luteus*, 1 (0,7%) штамм *Candida albicans* и 2 (1,4%) штамма, которые по данным секвенирования 16SrRNA, относились к роду *Bacillus* spp.

Анализ высеваемости микроорганизмов в пробах с разными титрами микробной обсемененности показал, что в пробе с низкой микробной обсемененностью (4 lg КОЕ/мл) было идентифицировано 8 штаммов микроорганизмов 6 видов, в пробах со средней микробной обсемененностью (5 — 6 lg КОЕ/мл) — 62 штамма, принадлежащих к 13 видам, и в пробах со высокой микробной обсемененностью (7 — 8 lg КОЕ/мл) — 67 штаммов 11 видов.

При низкой микробной обсемененности были идентифицированы *C. ureicelerivorans*, *C. afermentas* subsp. *lipophilum*, *C. afermentas*, *C. tuberculostearicum*, *S. hominis* и *S. epidermidis*; при средней степени обсемененности — *C. ureicelerivorans*, *C. afermentas* subsp. *lipophilum*, *C. tuberculostearicum*, *C. mucifaciens*, *C. coyleae*, *C. massiliensis*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. capitis*, *Moraxella* spp., *M. luteus*, *Bacillus* spp.; при высокой степени обсемененности — *C. ureicelerivorans*, *C. afermentas* subsp. *lipophilum*, *C. tuberculostearicum*, *C. mucifaciens*, *C. afermentas* subsp. *afermentas*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *Moraxella* spp., *M. luteus*, *Candida albicans*. Интересным оказалось то, что с увеличением степени микробной обсемененности у больных с бромгидрозом в микробиоценозе увеличиваются титр штаммов *C. afermentas* subsp. *lipophilum*, *C. tuberculostearicum* и *S. hominis*. Следовательно, с увеличением обсемененности увеличивается титр и спектр видового разнообразия выделенных микроорганизмов, а также появляются микроорганизмы, обладающие более выраженной липофильностью.

Анализ микробного состава показал, что у в большинстве случаев (82,6%) у больных микробиоценоз кожи подмышечных впадин представлен консорциумами из микроорганизмов, состоящими из 2 — 7 микроорганизмов, и в четырех (17,4%) случаях — монокультурой. В монокультуре во всех случаях выделялись штаммы *S.hominis*. Кроме того, в большинстве (52,2%) случаев встречались ассоциации из 5 и 6 микроорганизмов, далее встречались ассоциации из 4 микроорганизмов (17,4%) и в одинаковом проценте случаев ассоциации из 2, 3 и 7 микроорганизмов. По составу изученных ассоциаций оказалось, что в ассоциациях, состоящих из 4, 5, 6 микроорганизмов, преобладали штаммы *C.tuberculostearicum* и *S.hominis*, в то время как в ассоциациях, включающих 7 микроорганизмов, отмечалось более выраженное видовое разнообразие выделенных микроорганизмов, но с равномерной частотой выделения.

На теле человека насчитывается примерно 3 — 4 миллиона потовых желез двух типов. Экринные — распределяются по всей поверхности тела равномерно и функционируют с раннего детства, обеспечивают терморегуляцию, за счет выделения пота и его испарения с поверхности кожи. Апокринные — в основном располагаются в подмышках, в паху и на половых органах. Эти железы развиваются в период полового созревания и выделяют феромоны — химические вещества, имеющие запах. Обычно пот, выделяемый эккринными железами, не имеет запаха. Неприятный запах тела может появиться, если большое количество пота долгое время находится на коже, где его начинают расщеплять бактерии. Пот эккринных желез также приобретает неприятный запах, если человек употребляет определенные продукты и напитки, например, чеснок, специи и алкоголь, а также некоторые лекарства, например, антидепрессанты. Однако чаще всего виновниками неприятного запаха являются апокринные железы, так как выделяемый ими пот богат белком, который легко расщепляется бактериями.

Бромгидроз обычно появляется в период полового созревания из-за усиленного производства гормонов андрогенов. Эти гормоны активизируются только в период пубертации. Вот почему маленькие дети практически не пахнут, как бы сильно они ни вспотели. В момент полового созревания начинают активно работать апокринные железы, которые в составе своего секрета содержат вещество индоксил — индивидуальный запаховый маркер. Как и секрет сальных желез, тоже активных в этом возрасте, индоксил служит легкой добычей бактерий, присутствующих в верхнем роговом слое кожи. Если человек редко моется и меняет белье, то происходит бурный процесс окисления жирных кислот, биологических веществ пота и разложения их бактериями. В сочетании с гипергидрозом (или просто непрерывным ношением тех же кроссовок, синтетических носков, маек, рубашек) плохой уход за кожей чреват бромгидрозом. Бромгидроз, встречающийся чаще у молодых мужчин, связан с присутствием в составе их пота некоторых аминокислот (тирозин, лейцин) и жирных кислот, которые после переработки их кожными бактериями вызывают особенно неприятный запах. У молодых девушек изменение запаха пота может быть связано с нарушением менструального цикла. Также бромгидроз характерен для больных с хроническими заболеваниями почек (уремия, хронический нефрит и др.), сопровождающимися хронической почечной недостаточностью, подагрой, сахарным диабетом.

В связи с этим, нами проведено обследование подростков, которые наиболее подвержены развитию бромгидроза, и изучен микробиоценоз кожи подмышечных впадин у данной возрастной группы. Всего идентифицировано

137 штаммов, относящихся к 17 видам микроорганизмов. Полуколичественная оценка микробного роста показала, что в большинстве случаев у пациентов с бромгидрозом отмечалась средняя и высокая степень обсемененности микробиоты кожи подмышечных впадин, которая была более выраженная у мальчиков, по сравнению с девочками. В микробиоценозах преобладали штаммы рода *Corynebacterium* и рода *Staphylococcus*, которые составили 89,1% всей популяции выделенных микроорганизмов. Среди микроорганизмов рода *Corynebacterium* идентифицировано 68 штаммов 8 видов, среди которых доминирующими были штаммы липофильных коринебактерий — *C.tuberculoostearicum*, *C.ifermentas* subsp. *lipophilum* и *C.ureicelerivorans*. Интересным является факт, что с усилением выраженности патологического состояния уменьшается видовое разнообразие выделенных коринебактерий — идентифицировано всего 7,9% видов коринебактерий из 101 опубликованного в настоящее время вида микроорганизмов рода *Corynebacterium* [1 — 3, 5, 8]. Среди стафилококков идентифицировано 5 видов с доминированием штаммов *S.hominis*. Было установлено, что с увеличением микробной обсемененности этого биотопа отмечается увеличение титра и разнообразия выделенных микроорганизмов. Кроме того, показано, что в большинстве случаев (82,6%) у больных микробиоценоз кожи подмышечных впадин представлен консорциумами из микроорганизмов, среди которых преобладали штаммы *C.tuberculoostearicum* и *S.hominis*, и в четырех (17,4%) случаях — монокультурой в виде *S.hominis*. Поэтому можно предположить, что появление неприятного запаха обусловлено колонизацией данного биотопа консорциумами микроорганизмов, в которых преобладают бактерии, обладающие повышенными липофильными свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alatoon A., Cazanave C.J., Cunningham S.C. et al. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. JCM. 2013, 23: 160-163.
2. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. JCM. 2012, 50 (10): 3152-3158.
3. Callewaert C., Kerckhof F.M., Granitsiotis M.S. et al. Characterization of *Staphylococcus* and *Corynebacterium* clusters in the human axillary region. Plos. 2013, 8 (8): e70538.
4. Chen Y.E., Tsao H. The skin microbiome: current perspectives and future challenges. J. Amer. Acad. Dermatol. 2013, 69 (1): 143-155.
5. Cogen A. L., Nizet V., Gallo R.L. Skin microbiota: a source of disease or defence? Br. J. Dermatol. 2008, 158 (3): 442-455.
6. Hinic V., Lang C., Weisser M. et al. *Corynebacterium tuberculoostearicum*: a potentially misidentified and multiresistant *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens. JCM. 2012, 50 (8): 2561-2567.
7. Khamis A., Raoult D., Scola B. Comparison between *rpoB* and 16SrRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. J. Clinical Microbiology. 2005, 43 (4): 1934-1936.
8. Mathieu A., Delmont T.O., Vogel T.M. et al. Life on human surfaces: skin metagenomics. Plos. 2013, 8 (6): e65288.
9. Mathieu A., Vogel T.M., Simonet P. The future of skin metagenomics. Res. Microbiol. 2014, 167: 69-76.
10. Schommer N.N., Gallo R.L. Structure and function of the human skin microbiome. Trend Microbiol. 2013, 21 (12): 660-668.

Поступила 13.06.17

Контактная информация: Борисова Ольга Юрьевна, д.м.н.,
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, р.т. (499)747-64-84