

## ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ІМУНОСУПРЕСИВНОЇ ТЕРАПІЇ НА СТАН МІКРОБІОЦЕНОЗУ ШКІРИ ХВОРИХ НА АКАНТОЛІТИЧНИЙ ПЕМФІГУС

Кутасевич Я.Ф., Олійник І.О., Джорасва С.К.,  
Маштакова І.О.,  
Абдалла А.Е.-С.Е.-С., Олійник О.І.

ДУ «Інститут дерматології та венерології  
Національної академії медичних  
наук України», м. Харків

**Введення.** АП – аутоімунне захворювання, при якому відбувається порушення імунітету [1]. Системна імуносупресивна терапія, що проводиться може призводити до порушення бар'єрної функції шкіри та слизових та спричинити серйозні ускладнення з боку м'яких тканин, внутрішніх органів, що обтяжує перебіг АП у хворих [2]. За даними наукової літератури, у значної кількості пацієнтів з АП упродовж першого року після встановлення діагнозу «акантолітичний пемфігус» присутні вторинні інфекції [3,4]. Особливо це стосується осіб похилого віку та хворих на цукровий діабет, що мають підвищений ризик розвитку вторинних інфекцій, спричинених *Nocardia* spp., цитомегаловірус, *Legionella* spp., та *Listeria* spp. [5].

Найчастішою причиною шкірної бактеріальної інфекції при АП, як ускладнення імуносупресивної терапії є *Staphylococcus aureus* - у 40,8% хворих [6]. Для попередження розвитку фатальних наслідків мікробного обтяження АП доцільне раннє виявлення бактеріальної інфекції, особливо спричиненою *S. aureus*.

Отже, актуальним є вивчення стану мікробіоценозу шкіри та слизових, а також їх бар'єрної ролі за для розробки лікувально-профілактичних заходів та корекції імовірних порушень.

**Мета.** Дослідити стан мікробіоценозу уражених та інтактних ділянок шкіри та слизових при тривалому застосуванні імуносупресивної терапії системними глюкокортикостероїдами (СГКС) та імунодепресантами – азатиоприн (АЗА), в залежності від ступеня тяжкості дерматозу.

**Матеріали та методи.** У відділенні дерматології ДУ «ІДВ НАМН України» м. Харків знаходилось 33 хворих на АП, які отримували імуносупресивну терапію СГКС та АЗА, терміном від двох місяців і довше 10 років. Стартова доза СГКС терапії, що застосовувалась для даної групи хворих, становила 120-60 мг/д в залежності від розповсюдженості шкірного процесу.

Діагноз АП був діагностований згідно з класичними клінічними критеріями та підтверджений цитологічними та лабораторними дослідженнями. Віковий діапазон пацієнтів коливався від 30 до 69 років. Ступінь тяжкості дерматозу оцінювали за допомогою індексу IKEDA [7]. В динаміці спостереження постійно проводився моніторинг суб'єктивних та об'єктивних критеріїв стану а також клініко-лабораторних показників. Групу порівняння

склало 15 практично здорових осіб відповідного віку та статі.

За ступенем тяжкості хворі були поділені на три групи: I група - 10 пацієнтів - 12-8 балів (9,5±0,6 бали) за індексом IKEDA, що склало 30,3%; II група - 7-5 балів за індексом IKEDA (5,7±0,2 бали) налічувала 17 хворих 51,5% та III група - 6 осіб (18,2%) тяжкістю < 5 балів за індексом IKEDA (3,0±0,3).

На початку лікування означеним хворим було проведено бактеріологічне дослідження біоматеріалу, отриманому з осередків ураження на шкірі і, за необхідністю, слизових оболонок та інтактних осередків.

### Результати та їх обговорення

Бактеріологічне дослідження матеріалу з уражених та інтактних ділянок шкіри та слизових було проведено у 33-х випадках хворим на АП.

Хворі I групи (тяжким ступенем) у кількості 10 осіб. Висип локалізувався на видимих слизових, шкірі та на волосистій частині голови. Елементи висипу: бульозні елементи від 2,5 до 4,0 см в діаметрі з дряблою покришкою наповнені серозно-гнійним вмістом на гіперимованому набряклому фоні; ерозії на слизових та шкірі розміром до 12,0 см в діаметрі з обривками епідермісу, дно яких вистелено білим нальотом та багат шаровими гнійно-геморагічними корками. Симптом Нікольського різко позитивний (рис. 1). Загальний стан хворих був розцінений як тяжкий: фебрильна температура, тахікардія 86-94 удари на хв., тахіпноє до 22 на хв. Хворі відзначали загальну слабкість та озноб. При лабораторному дослідженні в клінічному аналізі крові спостерігався зсув лейкоцитарної формули вліво з ознаками токсигенної зернистості та прискорення ШОЕ.

За результатами бактеріологічних досліджень клінічного матеріалу, отриманому з осередків ураження на шкірі та слизових, було виділено 26 лабораторних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів (21 з вогнищ ураження на шкірі та 5 з осередків ураження на слизових оболонках), що були віднесені до трьох родів: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Acinetobacter* spp. (див. рис. 2 (а)).

У біотопі «шкіра» переважали представники роду *Staphylococcus* (76,9 % - 20 клінічних штамів), у одного хворого з важким перебігом захворювання виявлено асоціацію коагулазонегативних стафілококів з мікроорганізмом роду *Acinetobacter*. У структурі вилучених стафілококів переважали *S.aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* (28,5 %, 14,3 % та 9,5 % відповідно). Мікробіоценоз шкіри цієї групи хворих характеризувався зрушенням складу у бік транзитної мікрофлори з витискуванням основного коменсального виду - *S. epidermidis*. Звертає на себе увагу висока щільність колонізації уражених ділянок шкіри на рівні  $10^5 - 10^8$  КУО / см<sup>2</sup>. При дослідженні клінічного матеріалу, отриманому з осередків ураження на слизових оболонках, у переважній більшості хворих виявляли *Staphylococcus* spp. як самотійно, так і в асоціаціях з мікроорганізмами роду *Streptococcus*.



**Рисунок 1. Хворі на ВП: а) масивні ерозивні поверхні на шкірі тулуба; б) серозно-гнійні корки на червоній облямівці губ та ерозії на слизовій рота; в) тотальна ерозія слизової ротової порожнини; г) ерозія на слизовій малих статевих губ; д) в'ялий бульозні елементи на шкірі внутрішньої поверхні передпліччя на гіперемованому фоні.**

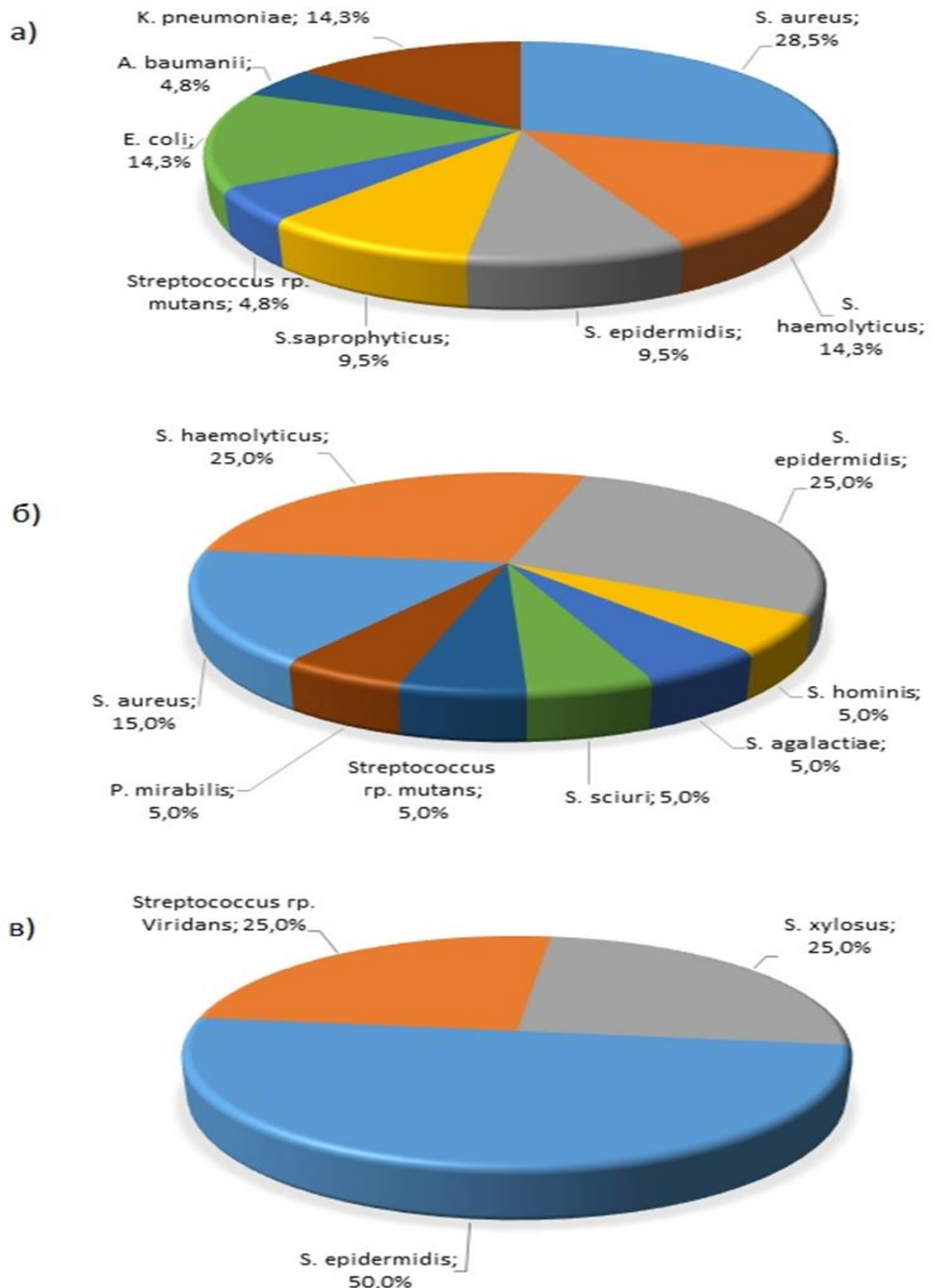


Рисунок 2. Мікробний склад осередків шкіри стосовно розподіленню за ступенем тяжкості а) I група; б) II група; в) III група

Означені біотопи також характеризувалися високим рівнем мікробного обміну, досягаючи  $10^6 - 10^8$  КУО / мл. В зонах, віддалених від елементів висипу (інтактні ділянки), також переважали *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, але відсоток вилучення був дещо нижчим, ніж у осередках ураження (25,0%, 7,2 % та 15,0% відповідно), інколи означені

мікроорганізми утворювали асоціації з *Micrococcus* spp. та непатогенними *Corynebacterium* spp.

З метою визначення цільового антибактеріального препарату для досягнення максимальної елімінації бактеріальних збудників було проведено визначення чутливості стафілококів з вираженим патогенним потенціалом (*S. haemolyticus*, *S. aureus*) до антибактеріальних препаратів різних

хімічних груп. При аналізі даних щодо визначення рівнів резистентності клінічних штамів стафілококів, вилучених з осередків ураження, встановлено, що ізольовані штами виявили помірну резистентність до тетрациклінів, аміноглікозидів, фторхінолонів та лінкозамідів – 54,5 %, 45,5 %, 36,4 % і 22,7 % відповідно, та досить високу до макролідів – до 63,6 %. Окрім того, у структурі антибіотикорезистентності виявлено ванкоміцин-стійкі штами – 9,1 %, що

свідчить про підвищення агресивного потенціалу отриманих збудників. Показники чутливості вилучених патогенів були найбільш високими до препаратів фузидієвої кислоти, оксазолідинонів та мупіроцину (у дослідженні визначалась чутливість до лінезоліду) – 86,4 %, 90,9% та 100 % штамів відповідно та наведені на рис. 3.

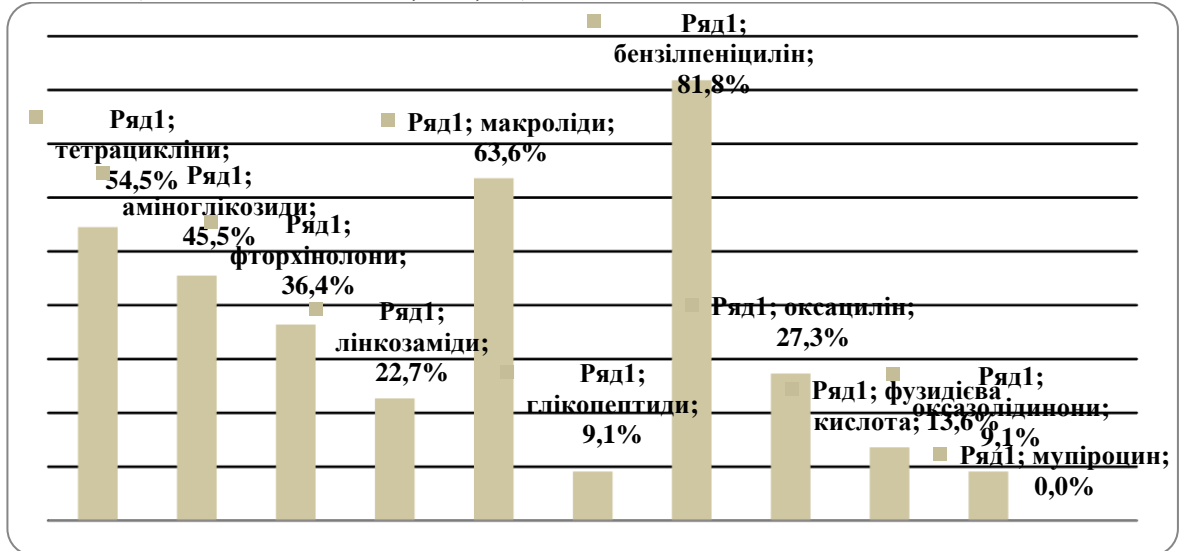


Рисунок 3. Показники резистентності штамів стафілококів, ізольованих з уражених ділянок шкіри хворих на акантолітичний пемфігус.

Дана група хворих потребувала ретельної санації вогнищ інфекції за допомогою зовнішніх дезинфікуючих засобів та водних анілінових барвників, проведенню інтенсивної дезінтоксикаційної терапії та застосування антибактеріальних препаратів системної дії із урахуванням до чутливості.

У II групі – 17 пацієнтів дерматоз мав розповсюджений характер на слизових, шкірних покривах. Висип представлений дрібними бульозними елементами з дряблою покрішкою наповнені серозним вмістом до 2,0 см в діаметрі, ерозії до 4,0 см в діаметрі, щільно вкриті багаточисельними корками на гіперимованому та набряклому фоні. Симптом Нікольського позитивний. Загальний стан характеризувався як стан середнього ступеня тяжкості. При лабораторному дослідженні крові виявлявся лейкоцитоз із зсувом лейкоцитарної формули вліво та прискорення ШОЕ.

За результатами бактеріологічних досліджень клінічного матеріалу, отриманому з осередків ураження на шкірних покривах та слизових оболонках хворих, було виділено 36 лабораторних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів (20 з вогнищ ураження на шкірі та 16 з осередків ураження на слизових оболонках), що були віднесені до трьох родів: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp. та *Proteus* spp.

У біотопі «шкіра» переважали представники роду *Staphylococcus* (85,0 % - 17 клінічних штамів). У двох випадках виявлено асоціацію коагулазонегативного стафілокока з клебсієлами та протеями при дослідженні матеріалу зі слизових

оболонки. У структурі вилучених стафілококів переважали *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* та *S. aureus* (25,0 %, 25,0 % та 15,0 % відповідно). Мікробіоценоз шкіри цієї групи хворих (рис. 2 (б)) також характеризувався наявністю зсувів складу біотопу у бік транзиторної мікрофлори з витискуванням основного коменсального виду - *S. epidermidis*, але спостерігалось зниження частки стафілококів з вираженим патогенним потенціалом - *S. aureus* - з 28,5 % до 15,0 %, яке відбувалось за рахунок збільшення кількості ізоляцій *S. haemolyticus* – з 11,5 % до 25,0 %. Також звертає на себе увагу дещо нижча щільність колонізації уражених ділянок шкіри у порівнянні з першою групою на рівні  $10^5$  –  $10^6$  КУО /  $cm^2$ . Склад інтактних ділянок шкіри був аналогічним ураженим ділянкам: у структурі вилучених видів переважали *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* та *S. aureus* на рівні 25,0 %, 35 % та 15,0 % відповідно.

При дослідженні клінічного матеріалу, отриманому з осередків ураження на слизових, як і хворих першої групи, у переважній більшості хворих виявляли *Staphylococcus* spp. як самотійно, так і в асоціаціях з мікроорганізмами роду *Streptococcus* spp. Означені біотопи характеризувалися значним рівнем мікробного обсіменіння, досягаючи  $10^6$  –  $10^7$  КУО/мл.

Корекція стану проводилась підсиленням зовнішньої обробки вогнищ: водним розчином анілінового барвника, дезинфікуючі засоби та місцеві антибактеріальні препарати. У 58,8% випадках загальний стан потребував призначення системних антибактеріальних засобів.

Хворі III групи у більшості випадків мали обмежений дерматоз. Локальний статус був представлений бульозними елементами до 1,0 см в діаметрі, дряблою покривною, наповнені серозним вмістом; ерозіями з обривками епітелію по периферії. Симптом Нікольського слабо позитивний. Шкіра та слизові не мали ознак запалення, фон був незмінений. Загальний стан не мав клінічно та лабораторно значущих змін.

Мікробний склад обстежених біотопів «шкіра», «слизові» хворих був майже аналогічним I та II групи, за виключенням мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* та виявленням *S.aureus* лише у одного хворого у матеріалі з уражених ділянок шкіри (рис. 2 (в)). Ступінь обсіменіння означених осередків на шкірі дорівнював  $10^4 - 10^6$  КУО / см<sup>2</sup>. Ступінь мікробіоценозу інтактних ділянок шкіри хворих майже не відрізнявся за показниками домінуючих різновидів стафілококів від уражених ділянок: у структурі вилучених мікроорганізмів переважав *S. epidermidis* на рівні 75% та 50% відповідно.

Хворим корегували зовнішню терапію яка включала водний аніліновий барвник, дезінфікуючі засоби та топичні антибактеріальні препарати згідно виявленню рівня чутливості штамів мікроорганізмів до антибіотиків.

При дослідженні мікробного складу шкіри практично здорових осіб також була встановлена наявність переважно стафілококової компоненти, але з суттєвою видовою різницею. Зі шкірних ділянок волонтерів при домінуванні резидентного представника роду – *S. epidermidis* у 72,5% обстежених – були виділені також нерезидентні види у значно меншій кількості осіб: *S. haemolyticus* – у 5,0%, *S. aureus* – у 2,5%, а сукупність інших окремих представників склала близько 20,0%.

## Висновки

За даними результатів дослідження з'ясовано, що мікробіоценоз як уражених, так ділянок шкіри та слизових у хворих на АП зазнає кількісних та якісних змін видового складу мікроорганізмів та корелює зі ступенем тяжкості дерматозу та тривалістю імуносупресивної терапії. Так, ступінь тяжкості дерматозу має пряму залежність з наявними зсувами у мікробіоценозі шкіри хворих. Кількість вилучень *S.aureus* збільшувалась по мірі збільшення ступеня тяжкості дерматозу з 15,0 % до 28,5 % відповідно. Кількість ізоляцій основного коменсального виду – *S. epidermidis* – мала зворотну залежність, спостерігалось зниження вилучень з 25,0 % при легкому ступені тяжкості до 9,5 % при важкому.

За результатами визначення рівнів резистентності клінічних штамів стафілококів до антимікробних засобів різних хімічних груп встановлено, що означені штами виявили високу чутливість до препаратів фузидієвої кислоти (86,4 %), оксазолідинонів (90, %) та мупіроцину (100,0 %), тому означені препарати можуть бути рекомендовані для використання у якості емпіричної терапії мікробних ускладнень у хворих на АП.

Зважаючи на неможливість застосування у хворих на АП топичних антимікробних засобів у вигляді мазевих форм, актуальним залишається використання водних анілінових барвників та антибактеріальних препаратів системної дії, з урахуванням рівня резистентності клінічних штамів мікроорганізмів (за виключенням антибіотиків пеніцилінового та цефалоспоринового ряду).

## Study of the influence of immunosuppressive therapy on the state of the skin microbiocenosis of patients with acantholytic pemphigus

Kutasevych Ya. F., Oliinyk I.O., Dzhoraeva S. K., Mashtakova I.O. Abdalla A.E. - S.E.- S. , Oliinyk O.I.

**Introduction.** Acantholytic pemphigus belongs to the group of severe autoimmune diseases. The clinical manifestation is damage to the skin and mucous membranes with a violation of their barrier role. Therapy requires long-term use of immunosuppressive drugs that promote remission of dermatosis and cause the development of imbalance in the microbiocenosis of the skin and mucous membranes. Secondary infections are a side effect of immunosuppressive therapy. The most common cause of skin bacterial infection is *Staphylococcus aureus* in 40.8% of patients, and according to AJ Kanwar and S. Dhar, sepsis was the most common cause of death among patients with acantholytic pemphigus, and *S. aureus* was the leading pathogen in 4 deaths. **Material & methods.** Patients with acantholytic pemphigus, 33 people who received immunosuppressive therapy for two months and more than 10 years were divided into three groups depending on the prevalence of the pathological process. Group I patients (severe) - 30.3%; Group II (moderate) - 51.5%, patients of group III - 18.2% had mild dermatosis. The comparison group consisted of 15 healthy individuals of the appropriate age and sex. The diagnosis was diagnosed according to classical clinical criteria and confirmed by cytological and laboratory tests. Identification of bacteria extracted from the skin and mucous membranes of the oral cavity was performed using the methods of classical bacteriology based on the study of morphological, cultural and biochemical properties. Determination of the sensitivity of the removed microorganisms to antibacterial drugs of different chemical groups was performed using the disk-diffusion method, the interpretation of the results was performed in accordance with international protocols and regulations of the Ministry of Health of Ukraine. **Results & discussion.** According to the results of bacteriological studies, 26 laboratory strains of opportunistic pathogens were isolated from the lesions on the skin and mucous membranes of I group patients, and were classified into three genera: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Acinetobacter* spp. The "skin" habitat was dominated by representatives of the genus *Staphylococcus* - 76.9%. The density of colonization was  $10^5 - 10^8$  CFU / cm<sup>2</sup>. Examination of the material from the lesions on the mucous membranes, in the vast majority of patients found *Staphylococcus* spp. independently and in associations with microorganisms of the genus *Streptococcus* . The level of microbial contamination reached  $10^6 - 10^8$

CFU / ml. The intact areas were dominated by *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis* with a slightly lower percentage of microorganisms removed than in the lesions, and sometimes formed associations with *Micrococcus* spp. and non-pathogenic *Corynebacterium* spp. When analyzing the data to determine the levels of resistance of clinical strains of staphylococci removed from the lesions, it was found that the susceptibility of the removed pathogens was the highest to the drugs fusidic acid, oxazolidinones and mupirocin. In patients of II group during bacteriological examination of clinical material obtained from lesions on the skin and mucous membranes - isolated 36 laboratory strains of opportunistic pathogens, which were classified into three genera: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. Biotope "skin" - dominated by representatives of the genus *Staphylococcus* - 85.0% with a decrease in the proportion of staphylococci with a pronounced pathogenic potential - *S. aureus* (from 28.5% to 15.0%). The density of colonization was at the level of  $10^5$  -  $10^6$  CFU / cm<sup>2</sup>. The biotope "mucous" is represented by the association of coagulase-negative staphylococcus with *Klebsiella* and *Proteus* with a level of microbial contamination of  $10^6$  -  $10^7$  CFU / ml. The composition of the intact areas of the skin was similar to the affected areas. The microbial composition of the examined biotopes "skin", "mucous" patients of III group was almost similar to I and II groups, and intact areas of skin of patients almost did not differ in terms of dominant species of staphylococci from the affected areas. The degree of contamination of these cells on the skin was equal to  $10^4$  -  $10^6$  CFU / cm<sup>2</sup>. The microbial composition of the skin of the control group was characterized by the presence of mainly staphylococci, but with a significant species difference. **Conclusion.** According to the results of the study it was found that the microbiocenosis of the affected areas of skin and mucous membranes in patients with acantholytic pemphigus undergoes quantitative and qualitative changes in the species composition of microorganisms and correlates with the severity of dermatosis and duration of immunosuppressive therapy. Fusidic acid, oxazolidinones and mupirocin can be recommended for empirical therapy of microbial complications in this group of patients based on the determination of levels of resistance of clinical strains of staphylococci removed from the lesions. Due to the impossibility of using topical antimicrobial agents in the form of ointment forms in patients with AP, the use of aqueous aniline dyes and antibacterial drugs of systemic action remains relevant, taking into account the level of resistance of clinical strains of microorganisms (except penicillin and cephalosporin antibiotics).

**Keywords:** skin microbiocenosis, acantholytic pemphigus, systemic glucocorticosteroids, immunosuppressive therapy.

#### References:

1. Grando S.A. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. *Autoimmunity* 2012. 45. 1. 7—35
2. Fagheei Aghmiyuni Z, Khorshidi A, Moniri R, et al. The Prevalence of *S. aureus* Skin and Soft Tissue

Infections in Patients with Pemphigus. *Autoimmune Dis.* 2016. 2016. 7529078

3. Kanwar AJ, Dhar S. Factors responsible for death in patients with pemphigus. *J Dermatol.* 1994. 21. 9. 655-659

4. Zhou W, Spoto M, Hardy R, Guan C, Fleming E, Larson PJ, Brown JS, Oh J. Host-Specific Evolutionary and Transmission Dynamics Shape the Functional Diversification of *Staphylococcus epidermidis*. *Human Skin. Cell.* 2020. 180. 3. P. 454-470. doi: 10.1016/j.cell.2020.01.006

5. Leshem Y.A., Gdalevich M., Ziv M. et al. Opportunistic infections in patients with pemphigus. *J Am Acad Dermatol.* 2014. 71. 2. 284-292

6. Kiran K.C., Madhukara J., Abraham A. et al. Cutaneous Bacteriological Profile in Patients with Pemphigus. *Indian J Dermatol.* 2018. 63. 4. P. 301-304

7. Ikeda S., Imamura S., Hashimoto I., et al. History of the establishment and revision of diagnostic criteria, severity index and therapeutic guidelines for pemphigus in Japan. *Arch Dermatol Res.* 2003 1. 12-16