**МІКРОБІОЛОГІЧНА ОЦІНКА КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ТЕРБІНАФІНУ ТА БЕНЗОЇЛПЕРОКСИДУ НА АСОЦІАЦІЮ**

***САNDIDA ALBІCANS* І *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

**Кочнєва О. В.**

***кандидат медичних наук,***

***старший викладач кафедри мікробіології, вірусології та імунології***

*Харківський національний медичний університет*

*м. Харків, Україна*

В останні десятиріччя зросла цікавість дослідників щодо питання взаємодії мікроорганізмів, які знаходяться в організмі людини, а також представлення їх як соціальних компонентів, які формують багаточисельні асоціації. Компоненти цих асоціацій активно взаємодіють між собою та формують специфічно організовані та прикріплені до субстрату біоплівки [2, с. 41].

У складі біоплівок мікроорганізми в 50 – 500 разів більш стійкі до дії дезінфікуючих речовин, антибактеріальних препаратів, бактеріофагів, антитіл та фагоцитів [10, с. 168]. Враховуючи це, антибіотикотерапія та захисні механізми організму є неефективними у боротьбі з інфекціями, які супроводжуються утворенням біоплівок [14, с. 28]. Пошук речовин, які будуть здатні інгібувати утворення біоплівок, є актуальним завданням сучасної медицини [6, с. 87].

Гнійно-запальні інфекції, етіологічними збудниками яких є асоціація мікроорганізмів *Candida albicans* і *Staphylococcus aureus* становлять актуальне питання для вивчення дослідників різних країн [16, с. 2978]. За даними літератури у 27 % цей консорціум є причиною госпітальних інфекцій та у 11 % випадків викликає катетер-асоційовані інфекції [8, с. 335]. Австралійськими вченими було встановлено що кандидозно-стафілококова інфекція у 20 % випадків викликає гострий післяродовий мастит у жінок [9, с. 2].

Асоціація *C. аlbicans* і *S. аureus* колонізує слизові оболонки ротової порожнини, шкіри та піхви. Ці патогени здатні спричиняти тяжкі захворювання верхніх дихальних шляхів, шкіри, запалення сечо-статевої системи, стоматити, суперінфекції опікових ран та ін. [12, с. 3915]. Більшість з цих інфекцій супроводжується хронічним перебігом та неефективністю антимікробної терапії. Однією з причин цього є здатність асоціації *C. аlbicans* і *S. аureus* утворювати біоплівки, тим самим збільшуючи свій патогенний потенціал [15, с. 498].

У багатьох країнах світу науковцями проводяться дослідження щодо визначення процесів взаємодії мікроорганізмів у міжвидових асоціаціях, закономірностей формування гетеромікробних біоплівок, утворених *C. albicans* і *S. aureus*, факторів їх патогенності та вірулентності, а також механізмів формування резистентності до хіміотерапевтичних препаратів [13, с. 3748]. Але на сьогоднішній день спектр використання антимікробних речовин, ефективних відносно цього консорціуму, залишається обмеженим. Тому, актуальним завданням є визначення нових комбінацій протимікробних засобів ефективних відносно асоціації *C. albicans* і *S. aureus* [11, с. 76]*.*

Відомо, що антимікотичні препарати на основі тербінафіну отримали досить широке використання у зв’язку з високою ефективністю субстанції відносно грибів роду *Candida* та їх низькою економічною вартістю. Тербінафін – це речовина похідна аліламінов, що має високу терапевтичну ефективність і низьку токсичність, це зумовлює його застосування для лікування деяких форм шкіряних і системних мікозів. Крім того, тербінафін є ліпофільною речовиною, тому накопичується в органах, багатих жировою тканиною, і таким чином, повинен добре включатися в ліпідні везикули, тому він може використовуватись для лікування інфекцій, що супроводжуються утворенням біоплівок [3, с. 25]. Механізм дії тербінафіну відносно грибів здійснюється за рахунок пригнічення скваленепоксидази в клітинній мембрані грибів. Це призводить до дефіциту ергостеролу і внутрішньоклітинного накопичення сквалену, що викликає загибель клітини збудника [1, с. 9].

Антисептична речовина бензоїлпероксид має високу кератолітичну, протизапальну дію та ефективність у відношенні багатьох мікроорганізмів, у тому числі *С. аlbicans* і *S. аureus*. Препарати на основі цієї речовини використовуються при лікуванні захворювань шкіри. Бензоїлпероксид є перспективним препаратом для лікування поверхневих мікозів. Неспецифічний механізм дії, як і інших перекисних сполук, обумовлений деструкцією клітинної стінки мікроорганізмів за рахунок окислення подвійних зв’язків в ненасичених жирних кислотах мембран. Антифунгальна активність бензоїлпероксиду практично не висвітлена в літературі, однак є повідомлення про успішне використання цього препарату при лікуванні пролежнів, які ускладнені грибковою інфекцією. Крім того, є інформація про розробку композицій, які містять імідазол і бензоїлпероксид.

З джерел літератури відомо, що сублетальні концентрації перекису водню пригнічували утворення біоплівок *S. epidermidis* за рахунок репресії ica-оперона. Це приводило до інгібування транскрипції ica-ABCD, в наслідок чого пригнічувалась продукція позаклітинного полісахаридного матриксу [7, с. 22]. Отже, ймовірно, що механізм дії бензоїлпероксиду схожий щодо інгібувіання біоплівок, які формуються штамами *S. аureus.*

Аналізуючи дані джерел літератури можливо припустити, що комбіноване застосування тербінафіну та бензоїлпероксиду відносно асаціації *С.* *аlbicans* і *S.аureus* поліпшує антимікробний ефект за рахунок посиленого окислення жирних кислот та пригнічення ферментів клітинної мембрани грибів та бактерій.

Метою даної роботи було встановлення здатності до формування біоплівок клінічних та референтних штамів *С. аlbicans* і *S. аureus* та визначення протимікробної дії комбінації тербінафіну і бензоїлпероксиду відносно цієї асоціації в дослідах in vitro.

Матеріали та методи. Для реалізації мети та вирішення завдань, поставлених у роботі, впродовж її виконання було досліджено 70 штамів мікроорганізмів: 55 штамів *S. аureus* виділених від хворих на різні гнійно – запальні процеси у перші 48 год. з моменту госпіталізації до стаціонару та 4 референтних штами (по 2 штама АТСС 25923, АТСС 6538 Р) в якості контрольної групи; 10 штамів *C. аlbicans*, які були виділені з мокротиння від хворих на пневмонію і змивів трахеї та один референтний штам АТСС 885-653. Виділення та ідентифікацію чистої культури штамів *S. аureus* і *C. аlbicans* проводили за загальноприйнятими мікробіологічними методами, на основі морфологічних, тінкторіальних, культуральних та біохімічних властивостей.

Здатність мікроорганізмів до формування біоплівок вивчали за методикою Романової Ю. М., Гінзбурга А. Л. [5, с. 36]. Експериментальне дослідження щодо встановлення здатності мікроорганізмів до плівкоутворення проводили в пластикових планшетах для імуно-ферментного аналізу. Сформовані біоплівки відмивали та фарбували 1% спиртовим розчином генціанвіолету. Результати оцінювали за оптичною щільністю та кількістю колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 мл біомаси. Показники оптичної щільності (одиниці оптичної щільності – од. ОЩ.) біоплівок вимірювали при довжині хвилі 545 нм на аналізаторі LabLine-90. Отримані дані обробляли за допомогою пакету програми Excel.

Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) протимікробних речовин на планктонні клітини клінічних ізолятів та референтних штамів *S. аurеus* і *C. аlbicans* визначали методом серійних розведень. За МІК приймали мінімальну концентрацію протимікробних речовин, що забезпечує повне пригнічення видимого росту мікроорганізмів. Результати оцінювали за оптичною щільністю при довжині хвилі 545 нм на аналізаторі LabLine-90. Життєздатність мікроорганізмів визначали шляхом підрахунку кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) на 1 мл поживного середовища дослідних зразків. Отримані результати порівнювали з середньою оптичною щільність контрольних зразків.

Статистичну обробку даних проводили за загальноприйнятою методикою [4, с. 155]. Розраховували середню арифметичну та її стандартну помилку (М±m). Достовірність відмінностей оцінювали за допомогою критерія Стьюдента (t). Відмінності розцінювали як статистично значущі при (р<0,05). Результати дослідження обробляли з використанням прикладних програм EXEL та «STATISTICA 6».

Результати дослідження. За даними проведеного дослідження встановлено, що здатність до формування біоплівок у клінічних та референтних штамів відрізняється (табл. 1).

*Таблиця 1*

**Визначення рівня плівкоутворення штамами *С. аlbicans*** **та *S. аureus* за показниками оптичної щільності та КУО**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № п/п | Штами | Середня оптична щільність дослідних зразків(од. ОЩ.)λ = 545 нм(М±m) | Кількість КУО×109на 1 мл поживного середовища дослідних зразків(М±m) | Середня оптична щільність контрольних зразків (поживне середовище)(од. ОЩ.)λ = 545 нм (М±m) |
| 1. | Клінічні штами *S. aureus*  | 1,0683±0,006\* | 3,5±0,2 | 0,324±0,003\*\* |
| 2. | Рефернтні штами *S. aureus*  | 0,0550±0,007\* | 2,5±0,3 | 0,276±0,006\*\* |
| 3. | Клінічні штами *С. аlbicans*  | 1,0786±0,006\* | 3,6±0,1 | 0,279±0,003\*\* |
| 4. | Рефернтні штами *С. аlbicans*  | 0,0650±0,006\* | 2,2±0,2 | 0,348±0,004\*\* |
| 5. | Клінічні штам *С. albicans* + *S. аureus* | 1,0892±0,007\* | 4,5±0,1 | 0,0277±0,006\*\* |
| 6. | Рефернтні штами *С. albicans* + *S. аureus* | 0,0776±0,004\*  | 3,5±0,2 | 0,0284±0,007\*\* |

Примітка: \* – різниця достовірна р<0,05. \* – різниця достовірна між групами, \*\* – різниця достовірна з контролем; представлено результати досліджень 3-х повторів.

Так, показники середньої оптичної щільності для клінічних штамів *S. aureus* складали (1,0683±0,006) од. ОЩ., для референтних штамів ці показники були меншими та визначались на рівні (0,0550±0,007) од. ОЩ.

Для клінічних штамів *С. аlbicans* показники, які характеризують процес плівкоутворення складали (1,0786±0,006) од. ОЩ. для референтних штамів середні показники були на рівні (0,0650±0,006) од. ОЩ. При визначенні здатності до формування біоплівок асоціації *С. albicans* і *S. аureus* встановлено, що у клінічних штамів показники середньої оптичної щільності складають (1,0892±0,007) од. ОЩ., у референтних штамів – (0,0776±0,004) од. ОЩ.

При визначенні МІК тербінафіну, бензоїлпероксиду та їх комбінації на планктонні клітини та біоплівки *С. аlbicans* + *S. aureus* були отримані наступні дані (табл. 2).

*Таблиця 2*

**Визначення комбінованої дії тербінафіну та бензоїлпероксиду на планктонні клітини клінічних штамів *С. аlbicans* і *S. aureus***

**за середньою оптичною щільностю (М±m) та КУО**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| МІК протимікроб-них діючих речовиндля клінічних штамів(мкг/мл) | Середня оптична щільністьштамівз протимік.речовиною(од. ОЩ.)λ = 545 нм | КУОна 1 мл поживного середовища при висіві з дослідних зразків з протимікроб. речовиною | Контроль (поживне середовище + *S. аurеus,**С. аlbicans*)(од. ОЩ.)λ = 545 нм | КУОна 1 мл поживного середовища при висіві з контрольних зразків без протимікроб. речовин |
| *S. аurеus*бензоїлперок-сид (3,1) | 0,0505±0,007 | (3,5±0,2)×105\* | 0,0865±0,006 | (3,7±0,1)×106 |
| *С. аlbicans* тербінафін (4) | 0,0483±0,005 | ріст відсутній\* | 0,0825±0,004 | (3,3±0,1)×106 |
| *С. аlbicans* бензоїлпероксид (6,25) | 0,0563±0,006 | (3,4±0,3)×105\* | 0,0870±0,003 | (3,8±0,1)×106 |
| *С. аlbicans* + *S. aureus* тербінафін + бензоїлпероксид (1,3) | 0,0601±0,012 | *S. aureus*(1,5±0,1)×105\*\**С. аlbicans*(0,9±0,2)×105\*\* | 1,0604±0,014 | *S. aureus*(3,5±0,2)×106*С. аlbicans*(3,6±0,1)×106 |

Примітка. \* – різниця достовірна р<0,05 з контролем; \*\* – різниця достовірна з контролем та між дією комбінації і окремими діючими речовинами; представлено результати досліджень 3-х повторів.

За результатами проведеного дослідження було встановлено, що комбінація на основі антимікотичної речовини тербінафіну та антисептичної речовини бензоїлпероксиду має високу антимікробну активність відносно планктонних клітин асоціації *С. аlbicans* + *S. аureus*, МІК становила – (1,3±0,09) мкг/мл. Враховуючи те, що мікроорганізми у формі біоплівок мають високу стійкість до антимікробних засобів у порівнянні з планктонними клітинами, для визначення антимікробної ефективності цієї комбінації відносно біоплівок утворених асоціацією *С. аlbicans* + *S. аureus* концентрація цих речовин була збільшена у 10 разів (таб. 3).

*Таблиця 3*

**Визначення комбінованої дії тербінафіну та бензоїлпероксиду на біоплівки клінічних штамів *С. аlbicans* і *S. aureus***

**за середньою оптичною щільностю (М±m)** **та КУО**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 10 МІК протимікроб-них діючих речовиндля клінічних штамів(мкг/мл) | Середня оптична щільність біоплівокштамівз протимік.речовиною(од. ОЩ.)λ = 545 нм | КУОна 1 мл поживного середовища при висіві з дослідних зразків з протимікроб. речовиною | Контроль (поживне середовище + біоплівки*S. аurеus,**С. аlbicans*)(од. ОЩ.)λ = 545 нм | КУОна 1 мл поживного середовища при висіві з контрольних зразків без протимікроб. речовин |
| *S. аurеus*бензоїлперок-сид  | 1,0088±0,005 | (4,1±0,3)×108\* | 1,0865±0,006 | (3,4±0,2)×109 |
| *С. аlbicans* тербінафін  | 0,0715±0,007 | (2,7±0,2)×108\* | 1,0935±0,005 | (3,6±0,1)×109 |
| *С. аlbicans* бензоїлпероксид  | 0,0742±0,007 | (3,2±0,2)×108\* | 1,0889±0,002 | (3,5±0,1)×109 |
| *С. аlbicans* + *S. aureus* тербінафін + бензоїлпероксид  | 0,0931±0,012 | *S. aureus*(2,5±0,1)×108\*\**С. аlbicans*(1,9±0,2)×108\*\* | 1,0984±0,014 | *S. aureus*(3,5±0,2)×109*С. аlbicans*(3,6±0,1)×109 |

Примітка. \* – різниця достовірна р<0,05 з контролем; \*\* – різниця достовірна з контролем та між дією комбінації і окремими діючими речовинами; представлено результати досліджень 3-х повторів.

За результатами дослідження було встановлено, що комбінація тербінафіну та бензоїлпероксиду мала протимікробну активність відносно біоплівок асоціації *С. аlbicans* + *S. аureus* (кількість КУО знижувалось у 2 рази).

Таким чином, результати дослідження узгоджуються з даними джерел літератури і підтверджуються тим, що ті концентрації протимікробних речовин, які ефективні відносно планктонних форм, не мають дії у відношенні біоплівок, тому повинні збільшуватись у декілька разів, що можливо здійснити тільки в дослідах in vitro.

Висновки. За результатами проведених досліджень встановлено, що клінічні ізоляти проявляли більш високу (р<0,05) здатність до формування біоплівок, ніж референтні штами, але найвищими показники біоплівкоутворення були у асоціації мікроорганізмів *С. аlbicans* і *S. aureus*, середня оптична щільність біоплівок складала (1,0892±0,006) од. ОЩ. для клінічних ізолятів та (0,0776±0,004) од. ОЩ. – для референтних штамів. Вказане є ознакою посилення патогенних властивостей цих мікроорганізмів у консорціумі.

В ході дослідження було доведено, що комбінація антимікотичної речовини тербінафіну та антисептика бензоїлпероксиду має високу активність відносно асоціації *С. аlbicans* і *S. aureus*, МІК – (1,3±0,09) мкг/мл. Вказана комбінація ефективно діє у відношенні не тільки планктонних форм, а й впливає на мікроорганізми мобілізовані у біоплівках, про що свідчить зниження оптичної щільності та зменшення КУО останніх.

Узагальнюючи результати дослідження можна сказати, що отримані дані відносно комбінованої дії протимікробних речовин тербінафіну та бензоїлпероксиду на асоціацію *С. аlbicans* + *S. аureus* нададуть змогу розширити спектр використання ефективних хіміотерапевтичних засобів, що мають вплив на цих патогенів, та в подальшому можуть бути використані у приготуванні різних лікарських форм для місцевого застосування з метою профілактики або лікування гострих і затяжних гнійно-запальних інфекцій шкіри та підшкірної клітковини.

Використана література:

1. Коновалова Т. С. Експериментальні дослідження структурно – морфологічних змін та чутливості окремих видів грибів роду Candida до системних антимікотиків тріазолового ряду / Т. С. Коновалова, В. І.Степаненко, В. В. Бобир // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. – 2007. – №1. – С. 5–17.
2. Мавров И. И. Биопленки и Quorum sеnsing у микроорганизмов. Механизмы формирования биопленок у грибов рода Сandida / И. И. Мавров, В. Н. Васильченко, А. П. Белозоров // Дерматологія та венерологія. – 2008. – Т. 39, № 1. – С. 40–43.
3. Межклеточная коммуникация у бактерий и перспективы создания на ее основе антибактериальных препаратов нового поколения / А. Я. Циганенко, Н. И. Коваленко, С. И. Степаненко, В. Н. Васильченко. – Харьков : Препринт, 2004. – 31 с.
4. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва – М. : МедиаСфера, 2003. – 312 с.
5. Романова Ю. М. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штамов *Salmonella typhimurium* / Ю. М. Романова, Н. В. Алексеева, А. Л. Гинцбург // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 4. – С. 38–42.
6. Чернявский В. И. Бактериальные биопленки и инфекция // Annals of Mechnikov Institute. – 2013. – №1. – С. 86–90.
7. Эффективность бензоилпероксида на стафилококковую и дрожжевую микрофлору in vitro / В. Г. Арзуманян, Е. В. Зайцева, Т. И. Кабаева, Н. А. Орлова // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология. – 2005. – № 6. – С. 20–23.
8. Adam B. Mixed species biofilms of Candida albicans and Staphylococcus epidermidis / B. Adam, G. S. Baillie, L. J. Douglas // J. Med. Microbiol. – 2002. – Vol. 51, № 2. – Р. 334–349.
9. Amir L. H. The role of microorganisms (*Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*) in the pathogenesis of breast pain and infection in lactating women [Електронний ресурс] / L. H. Amir, M. Cullinane1 [et аl.] // Pregnancy and Childbirth. – 2011. – Режим доступу : <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/11/54>.
10. Donlan R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donlan // Clin. Microb. Reviews. – 2002. – Vol. 15, № 2. – P. 167–193.
11. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms / B. M. Petersa, R. M. Warda, H. S. Ranec еt аl. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2013. – № 57. – Р. 74–82.
12. Harriott M. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance / M. Harriott, M. Noverr // Antimicrob Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53, № 9. – Р.3914–22.
13. Harriott M. M. Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation / M. M. Harriott, M. C. Noverr // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – Vol. 54, № 9. – Р. 3746–55.
14. Parsek M. R. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms / M. R. Parsek, E. P. Greenberg // Trends Microbiol. – 2005. – Vol. 13, № 1. – Р. 27–33.
15. Peters B. M. Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* - *Candida albicans* dual-species biofilms / B. M. Peters, M. A. Jabra-Rizk // FEMS immunology and medical microbiology. – 2010. – Vol. 59, № 3. – Р. 493–503.
16. Peters B. M. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p / B. M. Peters, E. S. Ovchinnikova, B. P. Krom // Microbiology – 2012. – Vol. 158, № 12. – Р. 2975–86.