

DOI: 10.24412/2707-6180-2021-63-70-76
 УДК 616-008.853:578.27
 МРНТИ 76.29.50

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ АССОЦИАЦИИ CANDIDA ALBICANS И STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ВЛИЯЮЩИХ НА ФАГОЦИТАРНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

М.М. МИШИНА, Е.В. КОЧНЕВА*, Е.В. КОЦАРЬ

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

Мишина М.М. – <https://orcid.org/0000-0001-9348-7804>

Коцарь Е.В. – <https://orcid.org/0000-0002-5459-4567>

Кочнева Е.В. – <https://orcid.org/0000-0002-1039-9313>

Citation/
 Библиографиялық сілтеме/
 Библиографическая ссылка:

Mishyna MM, Kochneva OV, Kotsar OV. Microbiological characterization of pathogenicity factors of candida albicans and staphylococcus aureus association affecting neutrophil phagocytic activity. West Kazakhstan Medical Journal. 2021;63(2):70-76. DOI: 10.24412/2707-6180-2021-63-70-76

Мишина ММ, Кочнева ЕВ, Коцарь ЕВ. Candida albicans және staphylococcus aureus қауымдастығының нейтрофилдердің фагоцитарлық белсенділігіне әсер ететін патогендік факторларының микробиологиялық сипаттамасы. West Kazakhstan Medical Journal. 2021;63(2): 70-76. DOI: 10.24412/2707-6180-2021-63-70-76

Мишина ММ, Кочнева ЕВ, Коцарь ЕВ. Микробиологическая характеристика факторов патогенности ассоциации Candida albicans и Staphylococcus aureus, влияющих на фагоцитарную активность нейтрофилов. West Kazakhstan Medical Journal. 2021;63(2): 70-76. DOI: 10.24412/2707-6180-2021-63-70-76

Microbiological characterization of pathogenicity factors of candida albicans and staphylococcus aureus association affecting neutrophil phagocytic activity

M.M. Mishyna, O.V. Kochneva*, O.V. Kotsar

Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

Purpose: to study the ability to form biofilms in clinical and reference strains of *C. albicans* and *S. aureus*; to determine the enzymatic activity of phospholipase and protease of *C. albicans* strains; to determine the neutrophil phagocytic activity in relation to clinical and reference strains of *C. albicans* and *S. aureus* in vitro.

Methods. The experimental study was performed on 16 clinical strains of *S. aureus* isolated from patients with various purulent-inflammatory skin diseases, and 16 strains of *C. albicans* isolated from patients with pneumonia. The following reference strains of microorganisms were used as a control group: *Candida albicans* CCM 885, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = NCDC 25923 = F-49.

The ability of microorganisms to form biofilms was determined both in individual clinical strains of *C. albicans* and *S. aureus*, and in the association of these pathogens. The results were compared with those obtained for the reference strains. The study used plastic plates for enzyme immunoassay. A nutrient medium and a culture of microorganisms were introduced into each well, except for the last well, which constituted the control parameters - a nutrient medium. The plates were incubated in a thermostat at 37 °C for 24 h. The ability of the strains to form biofilms was assessed by optical density (optical density units - OD units), which was measured at a wavelength of 545 nm on a LabLine-90 analyzer. The number of colony forming units (CFU) was also determined after the corresponding inoculations from the wells of the plate. The obtained data were processed using the Excel program package.

The phospholipase activity of *C. albicans* was studied by the titrometric method. Indicators were estimated at mmol / l × hour. The biuret method was used to study the protease activity; values were estimated at mg / min × ml.

Neutrophil Phagocytic activity was determined experimentally in vitro using standard methods.

Results. During the work, it was found that clinical strains had high virulent properties associated with the production of aggression enzymes and the ability to form biofilms. Clinical strains in the association of *C. albicans* and *S. aureus* were particularly aggressive. When studying the ability to form biofilms, the indicators for clinical strains were - (1.0987 ± 0.007) units OD, for reference strains - (0.0776 ± 0.004) units OP. Clinical strains of *C. albicans* have been found to have high activity of aggression enzymes: phospholipase and protease. A decrease in all indicators of neutrophil phagocytic activity relative to the association of *C. albicans* and *S. aureus* was also identified. The phagocytic index for clinical strains was - (3.03 ± 0.07), for reference strains - (3.36 ± 0.27).

Conclusions. Thus, *C. albicans* and *S. aureus* in association can enhance their virulent properties, and the presence of pathogenicity factors, such as aggression enzymes and biofilm formation, contributes to the suppression of phagocytic responses and the immune response in general.

Keywords: microbial biofilms, phagocytosis, pathogenicity enzymes, mixed infection, immune response.



Kochneva O.V.
 e-mail: elenakochneva@ukr.net

Received/
 Келіп түсті/
 Поступила:
 24.12.2020

Accepted/
 Басылымға қабылданды/
 Принята к публикации:
 22.04.2021

ISSN 2707-6180 (Print)
 © 2021 The Authors
 Published by West Kazakhstan Marat Ospanov
 Medical University

***Candida albicans* және *staphylococcus aureus* қауымдастығының нейтрофилдердің фагоцитарлық белсенділігіне әсер ететін патогендік факторларының микробиологиялық сипаттамасы**

М. Мишина, Е.В. Кочнева*, Е.В. Коцарь

Харьков ұлттық медицина университеті, Харьков, Украина

Мақсаты: *C. albicans* және *S. aigeis* клиникалық және референттік штамдарында биофильмдердің түзілу қабілетін зерттеу; *C. albicans* штамдарының фосфолипазасы мен протеазасының ферментативті белсенділігін анықтау; *C. albicans* және *S. aureus* in vitro клиникалық және референттік штамдарына қатысты нейтрофилдердің фагоцитарлық белсенділігін анықтау.

Әдістер. Эксперименттік зерттеу терінің әртүрлі іріңді-қабыну аурулары бар пациенттерде оқшауланған 16 *S. aureus* клиникалық штамдарында және пневмониямен ауыратын науқастарда оқшауланған 16 *C. albicans* штамдарында жүргізілді. Бақылау тобы ретінде микроорганизмдердің келесі анықтамалық штамдары қолданылды: *Candida albicans* CCM 885, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = NCDC 25923 = F-49.

Микроорганизмдердің биофильмдерді қалыптастыру қабілеті *C. albicans* және *S. aigeis* клиникалық штамдарында да, осы қоздырғыштардың қауымдастығында да анықталды. Алынған нәтижелер анықтамалық штамдарда алынған көрсеткіштермен салыстырылды. Зерттеу иммуоферментті талдау үшін пластикалық планшеттерді қолданды. Әр тесікке қоректік орта мен микроорганизмдердің мәдениеті енгізілді, соңғы тесіктен басқа, бақылау көрсеткіштері - қоректік орта. Планшеттер термостатта 24 сағат ішінде 37 С температурада инкубацияланды. Штамдарда биофильмдердің түзілу қабілеті labline – 90 талдағышында толқын ұзындығы 545 нм кезінде өлшенген оптикалық тығыздық (оптикалық тығыздық бірліктері-ОП бірлігі) бойынша бағаланды. Сондай-ақ, планшеттің тесіктерінен тиісті дақылдардан кейін колонияны құрайтын бірліктердің (КОЕ) саны анықталды. Алынған мәліметтер Excel пакетінің көмегімен өңделді.

C. albicans фосфолипаза белсенділігі титрометриялық әдіспен зерттелді. Көрсеткіштер ммоль / л×сағ. Протеазалардың белсенділігін зерттеу үшін биурет әдісі қолданылды; көрсеткіштер мг/мин.×мл бағаланды.

Нейтрофилдердің фагоцитарлық белсенділігі стандартты әдістерді қолдана отырып, in vitro эксперименталды түрде анықталды.

Нәтижелер. Жұмыс барысында клиникалық штамдардың агрессия ферменттерінің өндірілуіне және биофильмдердің пайда болу қабілетіне байланысты жоғары вирустық қасиеттері бар екендігі анықталды. Әсіресе агрессивті қасиеттері *C. albicans* және *S. aureus* қауымдастығындағы клиникалық штамдармен ерекшеленді. Биофильмдерді қалыптастыру қабілетін зерделеу кезінде клиникалық штамдар үшін көрсеткіштер - (1,0987±0,007) ББ, референттік штамдар үшін - (0,0776±0,004) ББ. *C. albicans* клиникалық штамдары агрессия ферменттерінің жоғары белсенділігіне ие екендігі анықталды: фосфолипаза және протеаза. Сондай-ақ, *C. albicans* және *S. aureus* ассоциациясына қатысты нейтрофилдердің фагоцитарлық белсенділігінің барлық көрсеткіштерінің төмендеуі анықталды. Клиникалық штамдар үшін фагоцитарлық индекс – (3,03±0,07), референттік үшін– (3,36±0,27) құрады.

Қорытынды. Осылайша, қауымдастықтағы *C. albicans* және *S. aigeis* олардың вирустық қасиеттерін арттыра алады, ал агрессия ферменттері және биофильмдердің пайда болуы сияқты патогендік факторлардың болуы фагоцитарлық реакциялар мен иммундық реакцияны басуға көмектеседі.

Негізгі сөздер: микробтық биофильмдер, фагоцитоз, патогендік ферменттер, аралас инфекция, иммундық жауап.

Микробиологическая характеристика факторов патогенности ассоциации *Candida albicans* и *Staphylococcus aureus*, влияющих на фагоцитарную активность нейтрофилов

М.М. Мишина, Е.В. Кочнева*, Е.В. Коцарь

Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

Цель. Изучить способность к образованию биопленок у клинических и референтных штаммов *C. albicans* и *S. aureus*; определить ферментативную активность фосфолипазы и протеазы штаммов *C. albicans*; определить фагоцитарную активность нейтрофилов в отношении клинических и референтных штаммов *C. albicans* и *S. aureus* in vitro.

Материалы и методы. Экспериментальное исследование было выполнено на 16

клинических штаммах *S. aureus*, выделенных у пациентов с различными гнойно-воспалительными заболеваниями кожи, и 16 штаммах *C. albicans*, выделенных у пациентов с пневмонией. В качестве контрольной группы использовали следующие референтные штаммы микроорганизмов: *Candida albicans* CCM 885, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = NCDC 25923 = F-49.

Способность микроорганизмов формировать биопленки определяли как у отдельных клинических штаммов *C. albicans* и *S. aureus*, так и у ассоциации этих возбудителей. Полученные результаты сравнивали с показателями, полученными у референтных штаммов. В исследовании использовали пластиковые планшеты для иммуоферментного анализа. В каждую лунку вносили питательную среду и культуру микроорганизмов, кроме последней лунки, которая составляла контрольные показатели - питательная среда. Планшеты инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Способность штаммов к образованию биопленок оценивали по оптической плотности (единицы оптической плотности – ед. ОП), которую измеряли при длине волны 545 нм на анализаторе LabLine-90. Также определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) после соответствующих посевов из лунок планшета. Полученные данные обрабатывали с помощью пакета программы Excel.

Фосфолипазную активность *C. albicans* изучали титрометрическим методом. Показатели оценивались в ммоль/л×час. Для изучения активности протеазы использовали биуретовый метод; показатели оценивались в мг/мин.×мл.

Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли экспериментально *in vitro* с использованием стандартных методов.

Результаты. В ходе работы было установлено, что клинические штаммы имели высокие вирулентные свойства, связанные с выработкой ферментов агрессии и способностью к образованию биопленок. Особенно агрессивными свойствами отличались клинические штаммы в ассоциации *C. albicans* и *S. aureus*. При изучении способности к формированию биопленок показатели для клинических штаммов составили – (1,0987±0,007) ед. ОП, для референтных штаммов – (0,0776±0,004) ед. ОП. Установлено, что клинические штаммы *C. albicans* имели высокую активность ферментов агрессии: фосфолипазы и протеазы. Также было выявлено снижение всех показателей фагоцитарной активности нейтрофилов относительно ассоциации *C. albicans* и *S. aureus*. Фагоцитарный индекс для клинических штаммов составил –(3,03±0,07), для референтных – (3,36±0,27).

Выводы. Таким образом, *C. albicans* и *S. aureus* в ассоциации могут усиливать свои вирулентные свойства, а наличие факторов патогенности, таких как ферменты агрессии и образование биопленок, способствует подавлению фагоцитарных реакций и иммунного ответа в целом.

Ключевые слова: микробные биопленки, фагоцитоз, ферменты патогенности, смешанная инфекция, иммунный ответ.

Введение

Гнойно-воспалительные инфекции, вызванные ассоциацией микроорганизмов *Candida albicans* и *Staphylococcus aureus*, являются важной проблемой современной медицины и изучаются исследователями из разных стран. Согласно литературным данным, в 27% случаев этот консорциум является причиной внутрибольничных инфекций, а в 11% вызывает катетер-ассоциированные инфекции. В 20% случаев кандидозо-стафилококковая инфекция вызывает у женщин острый послеродовой мастит [1].

Значительную роль в развитии инфекционного процесса имеют биологические свойства возбудителей. В процессе эволюции в качестве стратегии выживания микроорганизмы приобрели способность объединяться в межвидовые сообщества. Так, *C. albicans* и *S. aureus* способны образовывать сложные ассоциации, основанные на отношениях синергизма [2].

Несмотря на проводимые исследования в данной области, остаются неизученными до конца механизмы реакций, которые возникают во время иммунного от-

вета при наличии бактериальных и грибковых патогенов одновременно [3].

В основе неспецифической клеточной защиты организма лежит способность лейкоцитов к фагоцитозу. Это фундаментальный процесс, выполняемый иммунными клетками, в результате которого происходит захват и поглощение инородных частиц. У многоклеточных организмов фагоцитоз является универсальным явлением, которое способны выполнять все клетки (включая эпителиальные, эндотелиальные, фибробласты и т. д.), но некоторые специализированные клетки (такие как нейтрофилы и макрофаги) выполняют эти функции более эффективно и поэтому были названы профессиональными фагоцитами [4].

Фагоцитоз включает в себя ряд этапов от распознавания клетки-мишени, поглощения ее с образованием фагосомы (фагоцитарной вакуоли), созревания этой фагосомы в фаголизосому до окончательного разрушения поглощенной частицы в агрессивной антимикробной среде фаголизосомы. Таким образом, фагоцитоз является эффективным процессом, который устраняет инвазию патогенных микроорганизмов и

помогает поддерживать гомеостаз. Однако, некоторые патогены разработали различные стратегии для предотвращения процессов фагоцитоза [5].

Фагоцитарная активность в отношении грибов рода *C. albicans* осложняется размером этих клеток и наличием гиф-элементов. Клетки иммунной системы испытывают недостаток миелопероксидазы, необходимой для уничтожения дрожжевидных грибов. Кроме того, микробные клетки *S. aureus* синтезируют вещества, которые ингибируют активность фагоцитов [6,7].

Важную роль в подавлении иммунного ответа играют ферменты агрессии. Грибы *C. albicans* способны синтезировать фосфолипазы и кислые протеазы. Они снижают выработку секреторного иммуноглобулина А, а вследствие незавершенного фагоцитоза клетки грибов долгое время остаются жизнеспособными. Грибы рода *Candida* также взаимодействует с CD4 и CD8 лимфоцитами, формируя при этом клеточный иммунитет и локальную гранулему. Следует отметить, что эти микроорганизмы обладают антилизоцимной активностью. Благодаря этой способности, грибы *C. albicans* способны заселять различные экологические ниши и длительно сохраняться в организме человека [8,9].

Вследствие образования ассоциации *C. albicans* и *S. aureus* увеличиваются вирулентные свойства этих патогенов, что способствует усилению подавления иммунного ответа [10,11]. Исследователи идентифицировали 27 белков, которые активируются у патогенов *C. albicans* и *S. aureus* в ассоциации. Особую роль играет L-лактатдегидрогеназа (LDH1) у *S. aureus*, которая обеспечивает стабильность при окислительном стрессе. Этот фермент участвует в выработке L-молочной кислоты и усиливает свою активность при связывании с гиф-элементами *C. albicans*. В экспериментальных исследованиях был также обнаружен фактор вирулентности транскрипционного репрессорного белка *S. aureus* (CodY), который блокирует образование биопленок и синтез токсинов у *S. aureus*. Повышенная экспрессия белка (Cod Y) и снижение активности L-лактатдегидрогеназы (Ldh1) указывают на то, что *S. aureus* способен подавлять свою вирулентность, чтобы иммунная система не распознала его. При образовании ассоциации *C. albicans* и *S. aureus* белок фактора вирулентности (CodY) дезактивируется, а количество L-лактатдегидрогеназы (Ldh1) увеличивается, что способствует усилению агрессивных свойств *S. aureus* [12,13].

По данным исследователей, около 80 % всех микробных инфекций протекают с образованием биопленок. Микробные биопленки отвечают за этиологию и патогенез многих острых и особенно хронических бактериальных инфекций у человека. Микроорганизмы в форме биопленок в 50-500 раз увеличивают свою устойчивость к действию дезинфицирующих веществ, антибактериальных препаратов, бактериофагов, антител и фагоцитов. Кроме того, патогены в

биопленке взаимодействуют с иммунной системой хозяина. Антигены бактерий стимулируют синтез антител, в то же время формируется устойчивость к факторам иммунной защиты хозяина. В результате этого реакции, происходящие в процессе иммунного ответа, могут повреждать окружающие ткани в очаге воспаления. Часть микробных клеток, которые находятся в матриксе биопленки, остаются недоступными для фагоцитов, они выживают после прекращения антибактериальной терапии и могут снова размножаться и вызвать рецидив заболевания. Можно предположить, что применение антибиотиков уничтожает большую часть популяции, оставляя небольшое количество персистерентов. Если концентрация антибиотиков временно снижается или терапия прекращается, а симптомы заболевания исчезают через элиминацию погибших клеток, персистеренты снова начинают расти, образуя биопленку, от которой впоследствии снова начнут отделяться планктонные клетки. Этот динамичный механизм объясняет рецидивы инфекций, связанных с формированием биопленок, потребность в длительном лечении химиотерапевтическими препаратами и применения комбинированной терапии [14-16].

В стратегии выживания микроорганизмов существенную роль играют многие факторы патогенности и вирулентности, в том числе выработка ферментов агрессии, способность к формированию биопленок. Это ведет к снижению эффективности иммунных реакций и антибактериальной терапии. Изучение данной проблемы явилось актуальной целью данной работы.

Цель

Изучить способность к образованию биопленок у клинических и референтных штаммов *C. albicans* и *S. aureus*, определить ферментативную активность фосфолипазы и протеазы штаммов *C. albicans*. Определить фагоцитарную активность нейтрофилов в отношении клинических и референтных штаммов *C. albicans* и *S. aureus* in vitro.

Материалы и методы

Исследования проводились на базе лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Харьковского национального медицинского университета.

Экспериментальное исследование было выполнено на 16 клинических штаммах *S. aureus*, выделенных у пациентов с различными гнойно-воспалительными заболеваниями кожи (фурункул, карбункул, флегмона, абсцесс), и 16 штаммах *C. albicans*, выделенных у пациентов с пневмонией. В качестве контрольной группы использовали следующие референтные штаммы микроорганизмов: *Candida albicans* CCM 885, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 = NCDC 25923 = F-49.

Способность микроорганизмов формировать биопленки определяли как у отдельных клинических штаммов *C. albicans* и *S. aureus*, так и у ассоциации этих возбудителей. Полученные результаты сравнивали с

показателями, полученными у референтных штаммов. В исследовании использовали пластиковые планшеты для иммуоферментного анализа. В каждую лунку вносили питательную среду и культуру микроорганизмов, кроме последней лунки, которая составляла контрольные показатели - питательная среда. Планшеты инкубировали в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Через сутки отбирали содержимое лунок, трижды отмывали физиологическим раствором. В лунки вносили 150 мкл дистиллированной воды и 15 мкл 1% спиртового раствора генцианвиолета и инкубировали при комнатной температуре 45 мин. Краситель отбирали и промывали лунки трижды дистиллированной водой. Далее в лунки вносили по 250 мкл этилового спирта и инкубировали при комнатной температуре 45 мин. Способность штаммов к образованию биопленок оценивали по оптической плотности (единицы оптической плотности – ед. ОП), которую измеряли при длине волны 545 нм на анализаторе LabLine-90. Также определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) после соответствующих посевов из лунок планшета. Полученные данные обрабатывали с помощью пакета программы Excel [17].

Фосфолипазную активность *S. albicans* изучали титрометрическим методом. Показатели оценивались в ммоль/л×час. Для изучения активности протеазы использовали биуретовый метод; показатели оценивались в мг/мин.×мл [18,19].

Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли экспериментально *in vitro* с использованием стандартных методов. 0,1 мл 2% стерильного раствора цитрата натрия смешивали с 0,2 мл свежей кровью О (I) группы. 0,25 мл микробной взвеси *S. aureus* и *S. albicans* с концентрацией 2 миллиарда микробных клеток в 1 мл, добавляли к смеси, перемешивали и помещали в термостат при 37 °С на 30 мин. Затем смесь

центрифугировали при 1500 об/мин. в течение 5 мин. Тонкий слой лимфоцитов, наносили его на предметное стекло, сушили, фиксировали метанолом в течение 5 минут и красили его раствором азура-эозина в течение 30 минут. Мазки изучали с помощью иммерсионной микроскопии (ок.7 × об.90). Поглощающий эффект нейтрофилов характеризовался тремя параметрами: процент фагоцитоза - отношение нейтрофилов, которые захватили микроорганизмы, к общему количеству подсчитанных нейтрофилов; фагоцитарный индекс - количество микроорганизмов, захваченных одним нейтрофилом; фагоцитарное число - процент и индекс расщепления нейтрофилов для каждого штамма [20].

Результаты исследований

Способность к формированию биопленок определяли на клинических и референтных штаммах *S. albicans* и *S. aureus*. Проведенное исследование показало, что эта способность у всех изученных штаммов значительно отличалась (табл. 1).

Показатели для клинических штаммов *S. aureus* составили – (1,0865±0,008) ед. ОП, для референтных – (0,0550±0,007) ед. ОП. Средние значения для клинических штаммов *S. albicans* – (1,0690±0,007) ед. ОП, для референтных – (0,0650±0,006) ед. ОП.

Самые высокие показатели были выявлены у биопленок, образованных ассоциацией *S. albicans* и *S. aureus*. Средние значения оптической плотности у клинических штаммов ассоциации составили – (1,0987±0,007) ед. ОП, для референтных штаммов эти показатели составляли – (0,0776±0,004) ед. ОП.

По результатам исследования было установлено, что клинические штаммы *S. albicans* и *S. aureus* проявляли более высокую способность к пленкообразованию, по сравнению с референтными. Биопленки, образованные ассоциацией микроорганизмов *S. albicans*

Таблица 1. Средние показатели образования биопленок у клинических и референтных штаммов *S. albicans* и *S. aureus*

№ п/п	Название штамма	Средняя оптическая плотность исследуемых образцов (ед. ОП.) $\lambda = 545 \text{ нм}$ (M±m)	Количество КОЕ × 10 ⁹ на 1 мл питательной среды исследуемых образцов (M±m)	Средняя оптическая плотность контрольных образцов (питательная среда) (ед. ОП.) $\lambda = 545 \text{ нм}$ (M±m)
1.	Клинические штаммы <i>S. aureus</i>	1,0865±0,008	3,9±0,1	0,354±0,003**
2.	Референтные штаммы <i>S. aureus</i>	0,0550±0,007*	2,5±0,3	0,276±0,006
3.	Клинические штаммы <i>S. albicans</i>	1,0690±0,007	3,7±0,1	0,256±0,005**
4.	Референтные штаммы <i>S. albicans</i>	0,0650±0,006*	2,2±0,2	0,348±0,004
5.	Клинические штаммы <i>S. albicans+S. aureus</i>	1,0987±0,007	4,5±0,1	0,0277±0,00**
6.	Референтные штаммы <i>S. albicans+S. aureus</i>	0,0776±0,004*	3,5±0,2	0,0284±0,007

Примечание: * - разница достоверна ($p < 0,05$). * - разница достоверна с референтными штаммами; ** - разница достоверна с контролем; представлены результаты исследований 3-х повторов.

Таблица 2. Показатели ферментативной активности клинических и референтных штаммов *S. albicans*

Ферменты <i>S. albicans</i>	Показатели ферментативной активности клинических штаммов <i>S. albicans</i>	Показатели ферментативной активности референтных штаммов <i>S. albicans</i>
фосфолипаза (ммоль/л×час.)	27,3±1,9*	20,1±2,2
протеаза (мг/мин.×мл)	0,37±0,04*	0,24±0,05

Примечание: * - разница достоверна между клиническими и референтными штаммами ($p < 0,05$); представлены результаты исследования 3-х повторов.

и *S. aureus* имели наивысшие показатели оптической плотности.

Следующим этапом исследования было изучение ферментов патогенности клинических и референтных штаммов *S. albicans* (табл. 2).

В ходе исследования было установлено, что показатели активности фосфолипазы для клинических штаммов *S. albicans* составляли - (27,3±1,9) ммоль/л×час, для референтных - (20,1±2,2) ммоль/л×час.

При изучении активности протеазы у клинических изолятов *S. albicans* были определены значительно более высокие значения, которые составили - (0,37±0,04) мг/мин.×мл, тогда как у референтных штаммов они составляли (0,24±0,05) мг/мин.×мл.

Фагоцитарную активность нейтрофилов определяли на клинических и референтных штаммах *S. albicans* и *S. aureus* (таб. 3).

Показатели фагоцитарной активности для клинических штаммов *S. aureus* составили: индекс поглощения - (60,1±3,3); индекс переваривания - (0,65±0,04); фагоцитарный индекс - (3,2±0,05). Для референтных штаммов *S. aureus* эти показатели были следующими: индекс поглощения - (78,3±5,21); индекс переваривания - (0,85±0,05); фагоцитарный индекс - (4,66±0,37).

У клинических штаммов *S. albicans* отмечалось снижение показателей фагоцитарной активности: индекс поглощения составил (57,8±2,34); индекс переваривания - (0,59±0,03); фагоцитарный индекс -

(3,74±0,17). При изучении фагоцитарной активности нейтрофилов в отношении референтных штаммов *S. albicans* наблюдалась тенденция к увеличению всех параметров: индекс поглощения - (69,3±4,32); индекс переваривания - (0,77±0,04); фагоцитарный индекс - (4,14±0,21).

Повышенное влияние агрессивных свойств на фагоцитарные показатели были выявлены у ассоциации клинических штаммов *S. albicans* и *S. aureus*, индекс поглощения составил - (54,23±4,06), для референтных - (65,0±6,39); индекс переваривания - (0,69±0,05) для клинических штаммов, для референтных - (0,75±0,03); фагоцитарный индекс для клинических штаммов составил - (3,03±0,07), для референтных - (3,36±0,27).

Выводы

Результаты проведенных исследований показали, что клинические штаммы *S. albicans* и *S. aureus* проявляют более высокие вирулентные свойства по сравнению с референтными. Особенно эти показатели отмечались в ассоциации клинических штаммов *S. albicans* и *S. aureus*. Вирулентные свойства характеризовались наибольшей способностью к формированию биопленок по сравнению с отдельными штаммами. Показатели, характеризующие эту способность, для клинических штаммов ассоциации составили - (1,0987±0,007) ед. ОП, для референтных штаммов - (0,0776±0,004) ед. ОП.

Таблица 3. Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов относительно клинических и референтных штаммов *S. albicans* и *S. Aureus*

Группы исследуемых штаммов	Индекс поглощения	Индекс переваривания	Фагоцитарный индекс
Клинические штаммы <i>S. aureus</i>	60,1±3,33*	0,65±0,04*	3,2±0,05*
Референтные штаммы <i>S. aureus</i>	78,3±5,21	0,85±0,05	4,66±0,37
Клинические штаммы C. albicans	57,8±2,34*	0,59±0,03	3,74±0,17*
Референтные штаммы C. albicans	69,3±4,32	0,77±0,04	4,14±0,21
Клинические штаммы C. albicans+S. aureus	54,23±4,06*	0,69±0,05*	3,03±0,07*
Референтные штаммы C. albicans+S. aureus	65,0±6,39	0,75±0,03	3,36±0,27

Примечание: различия достоверны между клиническими и референтными штаммами: * - ($p < 0,05$); результаты исследований 3-х экспериментов.

Угнетению фагоцитарных реакций способствует синтез ферментов агрессии, различных токсинов и продуктов жизнедеятельности возбудителей, которые способствуют их выживанию, размножению, распространению в тканях. Такими факторами агрессии являются фосфолипазы и протеазы штаммов *C. albicans*. В данном исследовании отмечалось повышение активности этих ферментов у клинических штаммов. Также выявлено снижение всех показателей фагоцитарной активности нейтрофилов относительно ассоциации *C. albicans* и *S. aureus*. Фагоцитарный индекс имел следующие значения: для клинических штаммов он составил – (3,03±0,07), для референтных – (3,36±0,27).

Снижение показателей активности нейтрофилов может объясняться блокированием соответствующих рецепторов на поверхности фагоцитов или снижением их количества под влиянием ферментов агрессии микроорганизмов, что приводит к угнетению механизмов иммунного ответа.

Таким образом, наличие у клинических штаммов *C. albicans* и *S. aureus* факторов патогенности, ферментов агрессии и высокой способности к образованию биопленок способны снижать фагоцитарную активность нейтрофилов и в целом иммунные реакции организма, что подтверждается литературными данными современных исследователей.

Список литературы:

- Amir LH, Cullinane M, Garland S. M. et al. The role of micro-organisms (*Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*) in the pathogenesis of breast pain and infection in lactating women: study protocol. *BMC Pregnancy Childbirth* 2011;11(54). doi:10.1186/1471-2393-11-54.
- Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000886. doi:10.1371/journal.ppat.1000886.
- Chan LC, Rossetti M, Miller L. S. et al. Protective immunity in recurrent *Staphylococcus aureus* infection reflects localized immune signatures and macrophage-conferred memory. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2018;115(47):11111–11119. doi:10.1073/pnas.1808353115.
- Allison DL, Scheres N. et al. The host immune system facilitates disseminated *Staphylococcus aureus* disease due to phagocytic. Attraction to *Candida albicans* during co-infection: a case of bait and switch. *Infect. Immun.* 2019;87(11):e00137–19. doi: 10.1128/IAI.00137-19.
- Qin Y, Zhang L, Xu Z. et al. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence* 2016;7(5): 512–526. doi:10.1073/pnas.1808353115.
- Nobile CJ, Nett JE, Andes DR, Mitchell AP. Function of *Candida albicans* adhesion Hwp1 in biofilm formation. *Eukaryot. Cell.* 2006;5(10):1604–10.
- Miramon P, Dunker C, Windecker H. et al. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS One.* 2012;7(12):e52850. doi:10.1371/journal.pone.0052850.
- Lin L., Ibrahim AS, Xu X, et al. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. *PLoS. Pathog.* 2009;5(12). doi:10.1371/journal.ppat.1000703.
- Голубка ОВ, Савинова ЕМ, Лошко ГА. и др. Факторы патогенности грибов рода *Candida*. Клиническая и экспериментальная патология 2011;10(4):109–112. *Golubka OV, Savinova EM, Loško GA. i dr. Faktory patogennosti gribov roda Candida. Klinicheskaya i eksperimentalnaya patologiya* 2011;10(4):109–112. (In Russian)
- Peters BM, Noverr MC. *Candida albicans*-*Staphylococcus aureus* polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. *Infect. Immun.* 2013;81:2178–2189. doi:10.1128/IAI.00265-13.
- Peters BM, Ovchinnikova ES, Krom BP. et al. *Staphylococcus aureus* adherence to *Candida albicans* hyphae is mediated by the hyphal adhesin Als3p. *Microbiology* 2012;158(12):2975–2986. doi: 10.1099/mic.0.062109-0.
- Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009;53(9):3914–22. doi: 10.1128/AAC.00657-09.
- Сулейманова ТХ, Караев ЗО. Особенности ассоциативных взаимодействий *S. aureus*, *E. coli* с *C. albicans* при *Candida* – колонизации желудочно-кишечного тракта. Проблемы медицинской микологии 2009;11(2):44–47. *Suleimanova TH, Karaev ZO. Osobennosti assosiativnykh vzaimodeistvii S. aureus, E. coli s C. albicans pri Sandida – kolonizatsii gastrointestinalnogo trakta Problemy medisinskoj mikologii* 2009;11(2):44–47. (In Russian)
- Ballou ER, Avelar GM, Childers DS. et al. Lactate signaling regulates fungal beta-glucan masking and immune evasion. *Nat. Microbiol.* 2016;2:16238. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.238.
- Lin YJ, Alsad L, Vogel F. et al. Interactions between *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* within mixed species biofilms. *BIOS* 2013;84(1):30–39.
- Ikeh M A C, Fidel PL. Jr, Noverr MC. Identification of specific components of the eicosanoid biosynthetic and signaling pathway involved in pathological inflammation during intra-abdominal infection with *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 2018;86(7). doi:10.1128/IAI.00144-18.
- Романова ЮМ, Гинцбург АЛ. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии 2006;4:38–42. *Romanova M, Ginsburg AL. Spособnost k formirovani bioplenok v iskusstvennykh sistemah u razlichnykh štammov Salmonella typhimurium. Jurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* 2006;4:38–42. (In Russian)
- Карпунина ТИ. Фосфолипазы оппортунистических грибов: их возможная роль в патогенезе и диагностике микозов. Проблемы медицинской микологии 2006;(4):41–46. *Karpunina TI. Fosfolipazy opporturnisticheskikh gribov: ih vozmojnaya rol v patogeneze i diagnostike mikozov. Problemy medisinskoj mikologii* 2006;(4):41–46. (In Russian)
- Murray RK. et al.: Harper's illustrated biochemistry. Mc Graw Hill Medical, New York 2009.
- Олиферук ИС. Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов, макрофагов и незрелых дендритных клеток. Иммунология 2005;1:10–12. *Oliferyuk IS. Osenka fagositarnoi i baktericidnoi aktivnosti neitrofilov, makrofagov i nezrelykh dendritnykh kletok. Immunologiya* 2005;1:10–12. (In Russian)