

Министерство обороны Российской Федерации
Главное военно-медицинское управление

ВОЕННО-МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
(ВМедА)

Экз. №

Инв. №

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель начальника
академии
по научной работе
член-корреспондент РАМН
заслуженный деятель науки РФ
доктор медицинских наук
профессор
генерал-майор медицинской
службы

Ю.В.Лобзин
«___» _____ 2004 г.

О Т Ч Е Т
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

«Изучение антимикробной активности экспериментальных образцов
мыла по отношению к патогенным микроорганизмам»
по договору № 203/11 от 03.11. 2003 г.

Начальник научно-
исследовательского отдела
доктор медицинских наук профессор
полковник медицинской службы

С.А.Матвеев

Научный руководитель –
начальник кафедры микробиологии
доктор медицинских наук профессор

В.Б. Сбойчаков

Санкт-Петербург 2004

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы Начальник кафедры микробиологии ВМед, доктор медицинских наук профессор		В.Б. Сбойчаков
Ответственный исполнитель Доцент кафедры микробиологии Кандидат медицинских наук		В.А. Андреев
Преподаватель кафедры микробиологии Кандидат биологических наук		А.В. Зачиняева
Заведующая лабораторией кафедры микробиологии		Е.В. Никонова

РЕФЕРАТ

Отчет изложен на 13 страницах машинописного текста и содержит 2 таблицы, 8 источников, 4 приложения.

МЫЛО, АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ, МИКРООРГАНИЗМЫ ПЕРЕДАЮЩИЕСЯ ПРЕИМУЩЕСТВЕННО ПОЛОВЫМ ПУТЕМ, ГРИБЫ РОДА *CANDIDA*, ПЛЕСНЕВЫЕ ГРИБЫ, ИНТЕРДИГИТАЛЬНЫЙ ТРИХОФИТОН

Изучение антимикробной активности экспериментальных образцов мыла по отношению к патогенным микроорганизмам

В отчете отражены результаты исследования воздействия экспериментального образца мыла, выпускаемого ЗАО «Невская Косметика», по отношению к потенциально патогенным микроорганизмам, имеющим широкое распространение.

Цель исследования: Определить антимикробную активность данного мыла по отношению к наиболее клинически значимым грибам и к микроорганизмам, передающимся преимущественно половым путем. Показана высокая эффективность воздействия данного мыла по отношению к последним. Рост исследуемых грибов экспериментальные образцы мыла подавляли в слишком высоких концентрациях, в связи с чем рекомендовано его использовать в целях местной профилактики против микозов только как дополнительный метод, не заменяющий применение антисептиков.

ОТЧЕТ

по теме

«Изучение антимикробной активности экспериментальных образцов мыла по отношению к патогенным микроорганизмам»

по договору № 203/11 от 03.11. 2003 г.

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение в настоящее время заболеваний, передающихся преимущественно половым путем, а также грибковых инфекций, определяет актуальность использования дополнительных методов, направленных на их профилактику. Так, по данным ВОЗ микозы в различной форме диагностируются у каждого пятого жителя планеты. Наиболее частыми возбудителями этих инфекций являются грибы-дерматофиты, грибы рода *Candida* и плесневые грибы. Причем последние две группы, помимо висцеральных поражений, также как и дерматофиты способны вызывать поражения ногтевых валиков, ногтей и кожи [1,7].

Важным условием при проведении профилактических мероприятий, является доступность их использования для населения. Одним из таких доступных методов профилактики является применение бактерицидного мыла.

В связи с вышеизложенным нами была сформулирована следующая ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ:

Изучить антимикробную активность экспериментального образца мыла, выпускаемого ЗАО «Невская Косметика», по отношению к потенциально патогенным микроорганизмам, имеющим широкое распространение. В состав исследуемого мыла были введены антимикробные препараты (в количестве 0,0015%):

- сангвиритрин, оказывающий противомикробное действие за

счет подавления бактериальной нуклеазы, нарушения проницаемости клеточной стенки, процессов деления и строения нуклеотидов. Эффективен в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, а также грибов;

- диоксидин, препарат, являющийся производным хиноксалина и оказывающий широкое антибактериальное действие;

- метрогил (метронидазол), противопротозойный препарат широкого спектра действия, эффективный также против облигатных анаэробных бактерий.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

- определить антимикробную активность данного мыла по отношению к микроорганизмам, передающимся преимущественно половым путем.

- выявить антимикробную активность по отношению к наиболее клинически значимых грибов.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Исследование антимикробной активности по отношению к грибам *Candida albicans* (штамм ATCC 24433), *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale*, *Aspergillus niger*, *Penicillium brevicompactum* (клинические изоляты) проводили методом серийных разведений в жидкой питательной среде Сабуро (в объеме среды 5мл). При проведении исследований учитывали рекомендации Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам (NCCLS, США), Комитета по антибиотикограммам Французского

Общества микробиологов, Британского общества микробиологов. Готовили разведения тестируемого мыла так, чтобы его концентрация в объеме среды в пробирках уменьшалась от 1/50 до 1/100 000. В каждую пробирку вносили по 0,05 мл физиологического раствора, содержащего 10^6 микробных клеток /мл. Суспензию готовили используя стандарт мутности 0,5 McFarland ($1-2 \times 10^8$ КОЕ/мл) с последующим разведением (без учета величины микробных клеток). Определяли минимальную ингибирующую концентрацию препарата (МИК), соответствующую наибольшему разведению, при котором тормозился рост тест-культуры. Контрольными служили пробирки, не содержащие препарат. Параллельно, с целью контроля, аналогичные исследования проводили с обычным мылом.

Для изучения антибактериальной активности исследуемого образца мыла по отношению к возбудителям, передающимся преимущественно половым путем - *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* (клинические изоляты), использовали аналогичный метод выявления МИК в жидкой питательной среде. Исследовали те же концентрации (от 1/50 до 1/100 000), используя для этой цели соответственно коммерческие среды – «МИКОПЛАЗМА-50», «УРЕАПЛАЗМА-50» и «СВТ-ж» (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера).

Антибактериальная активность к *Neisseria gonorrhoeae* (штамм ATCC 49226) исследовалась на обогащенном GC агаре (рекомендованным NCCLS для определения чувствительности к антибиотикам данной культуры). Использовали диффузионный метод. В качестве обогатительной добавки использовали состав: На 1л дистиллированной воды вносили 1,1 г L-цистеина, 0,03 г гуанина гидрохлорида, 13,0 мг пара-аминобензойной кислоты, 3,0 мг тиамин гидрохлорида, 0,01 г витамина B12, 0,1 г кокарбоксилазы, 0,25 г НАД, 1,0 г аденина, 10,0 г L-глутамина, 100,0 г глюкозы, 0,02 нитрата

железа. Стерилизовали фильтрованием. Полученную смесь асептически вносили в GC агар после автоклавирования и охлаждения до 48-50° С в количестве 1,0 % (объем/объем). Придерживались методики, опубликованной в IX издании Государственной фармакопеи СССР. На поверхность застывшего агара наносили микробную взвесь (10⁶ КОЕ/мл физиологического раствора), для приготовления которой использовали стандарт мутности McFarland. После равномерного распределения излишки суспензии удаляли, а чашки подсушивали в термостате. В агаре пробивали лунки, в которые наносили по 0,1 мл концентрации тестируемого мыла (от 1/50 до 1/100 000 по объему). За минимальную ингибирующую концентрацию принимали то последнее разведение, которое обеспечивала видимое подавление роста бактерий (более 10 мм в диаметре).

Антимикробную активность по отношению к *Treponema pallidum* проводили в реакции иммобилизации бледных трепонем. Использовали тканевой штамм Никольса, культивируемый в яичках кролика. Получение культуры и ход исследования проводили согласно приказу МЗ РФ № 87 от 26. 03. 2001г. Культуру *Treponema pallidum* обрабатывали соответствующими разведениями мыла (от 1/1000 до 1/100000 по объему), накрывали покровными стеклами и исследовали в микроскопе с конденсором темного поля зрения с объективом 40, окуляром 10. Просматривали несколько полей зрения в разных участках препарата, подсчитывая в каждом число подвижных и неподвижных бледных трепонем и рассчитывали процент иммобилизации по следующей формуле:

$$X = \frac{A - B}{A} \times 100, \text{ где}$$

A – число подвижных бледных трепонем в контроле,

В – число подвижных бледных трепонем в опыте,

Х – процент иммобилизации.

Реакцию иммобилизации считали положительной, когда процент иммобилизации был выше 50.

Оценку достоверности различий определяли по Т-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования антимикробной активности по отношению к грибам представлены в таблице №1:

Таблица №1

Тестируемые культуры грибов	МИК для исследуемого мыла (разведение мыла в объеме среды)	МИК для обычного мыла (разведение мыла в объеме среды)
1	2	3
<i>Candida albicans</i> n=20	1/50	Рост при всех концентрациях
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> n=20	1/100	Рост при всех концентрациях
<i>Aspergillus niger</i> n=20	1/50	Рост при всех концентрациях
<i>Penicillium brevi-compactum</i> n=20	1/50	Рост при всех концентрациях

Наибольшая устойчивость к исследуемому мылу была обнаружена у дрожжеподобных грибов рода *Candida* и плесневых грибов *A. niger* и *P. brevi-compactum*. Эти грибы – *C. albicans* и плесневые грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium* - являются одними из самых частых возбудителей оппортунистических микозов. На долю *C. albicans* приходится 80 – 85 % всех случаев кандидоза. Особенности строения клеточной стенки грибов обеспечивают способность противостоять неблагоприятным факторам внешней среды. Так, клеточная стенка *C. albicans* состоит из 6 слоев, что дает возможность препятствовать воздействию антимикробных препаратов.

Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale – возбудитель интердигитального трихофитона, наряду с *Trichophyton rubrum* являются этиологическим фактором одной из наиболее часто встречаемой антропонозной эпидермофитии [2, 3] и онихомикозов. В качестве возбудителей последних нередко также встречаются грибы рода *Candida* и уже упомянутые плесневые грибы [4].

Как видно из таблицы, *Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale* при сравнении с грибами рода *Candida* и исследуемыми плесневыми грибами оказался лишь незначительно больше чувствителен к исследуемому мылу (МИК – в разведении 1/100).

В таблице №2 представлены результаты исследования воздействия экспериментального мыла на *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Trichomonas vaginalis*.

Таблица №2

Тестируемые культуры	МИК для исследуемого мыла (разведение мыла объеме среды)	МИК для обычного мыла (разведение мыла объеме среды)
<i>Mycoplasma hominis</i> n=20	1/1000	1/500
<i>Ureaplasma urealyticum</i> n=20	1/1000	1/500
<i>Trichomonas vaginalis</i> n=20	1/500	1/100

Частота выявления первых двух микроорганизмов среди различных групп населения варьирует в широких пределах от 10 до 80%. Вместе с тем, патогенность этих бактерий связана с массивностью инфицирующей дозы, что определяет значимость местных профилактических мероприятий.

Из представленных в таблице результатов видно, что исследуемые микроорганизмы оказались в высокой степени чувствительны как к экспериментальному мылу, так и к обычному. Это объясняется высокой чувствительностью к воздействию поверхностно-активных веществ представителей класса *Mollicutes*, к которому относятся эти возбудители. Мыла, первичные спирты и анионные детергенты оказывают на них литическое действие (5). Вместе с тем, экспериментальное мыло оказало в 2 раза более эффективное воздействие на эти микроорганизмы благодаря введенному в рецептуру антимикробному компоненту ($P > 0,05$).

Несколько меньшее воздействие оказывало испытуемое мыло на *Trichomonas vaginalis* (МИК отмечалась при разведении данного мыла 1/500).

Neisseria gonorrhoeae и *Treponema pallidum* оказались в высокой степени чувствительны к исследуемому мылу. Экспериментальное мыло задерживало рост культуры гонококка в концентрации 1/10000. Бледная трепонема прекращала двигательную активность при наличие экспериментального мыла в концентрациях 1/100000. Такая высокая чувствительность этих микроорганизмов вполне объяснима, если учитывать высокую степень их чувствительности к антисептикам и поверхностно-активным веществам *in vitro*.

Trichomonas vaginalis, *Neisseria gonorrhoeae* и *Treponema pallidum* являются возбудителями традиционных инфекций, передающихся половым путем (трихомониаз, гонорея, сифилис). В настоящее время, по мнению некоторых исследователей [6, 8], уровень этих инфекций в России достигает пандемической ситуации. В связи с этим, дополнительная профилактическая обработка, осуществляемая местно доступными методами (в том числе с использованием антимикробного мыла) представляется достаточно актуальным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Экспериментальные образцы мыла показали высокую степень антимикробного воздействия на основных возбудителей инфекций, передающихся преимущественно половым путем – гонореи, сифилиса, микоплазмоза, уреаплазмоза и трихомониаза.

Минимально-ингибирующая концентрация для этих возбудителей (*Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis*) находилась в пределах 1/500 – 1/100000, что позволяет использовать экспериментальное мыло при профилактике этих возбудителей в качестве антисептика.

2. Экспериментальное мыло оказывало более высокое антимикробное воздействие на тест-микроорганизмы, чем обычное мыло.
3. Рост исследуемых грибов, в отличие от обычного мыла, экспериментальные образцы мыла подавляли, но в очень высоких концентрациях (1/50 – 1/100). Это позволяет его использовать в целях местной профилактики против этих микроорганизмов только как дополнительный метод, не заменяющий применение антисептиков. Например, в качестве регулярного употребления при профилактике рецидивов молочницы у женщин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Этиология поверхностных кандидозов и резистентность их возбудителей В.А. Горбунов, Л.П. Титов, Т.С. Ермакова, В.А. Молочко //Успехи медицинской микологии /Под. Ред. Академика РАЕН Ю.В. Сергеева. – М., 2003. - Т.1, гл.1 – С. 12 – 13.
2. Особенности микробного «пейзажа» кожи у больных при микозах О.М. Капулер, М.М. Гафаров, Е.Р, Курамшина

- //Ж. Проблемы медицинской микологии. – 2002. – Т4, №2 – С88.
3. Актуальные проблемы дерматомикозов в Украине Б.П. Федотов //Ж. Проблемы медицинской микологии. – 2002. – Т4, №2 – С88.
 4. Орунгал (итраконазол) в комплексном лечении онихомикозов О.В. Беттихер, Е.М. Шуляк, В.В. Конева //Ж. Проблемы медицинской микологии. – 2002. – Т4, №2 – С48-49.
 5. Медицинская микоплазмология / С.В. Прозоровский, И.В. Раковская, Ю.В. Вульфович; РАМН. – М.: Медицина, 1995. – 288с.
 6. Г.А. Дмитриев Лабораторная диагностика бактериальных урогенитальных инфекций. – М.: Медицинская книга, 2003. – 329с.
 7. К вопросу об этиологии онихомикозов Медведева Т.В., Богомолова Т.С., Митрофанов В.С.// Успехи медицинской микологии /Под. Ред. Академика РАЕН Ю.В. Сергеева. – М., 2004. - Т.4, – С. 68 – 69.
 8. Особенности течения микотической патологии в условиях эпидемии инфекций передающихся половым путем (1992-2003гг.) Мельник А.П., Тверская Р.М., Яковлев И.М. /Под. Ред. Академика РАЕН Ю.В. Сергеева. – М., 2004. - Т.4, – С. 112-113.

