

БІОПЛІВКОУТВОРЮЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ ГРАМПОЗИТИВНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ

Резюме. Умовнопатогенні мікроорганізми мають вирішальне значення у розвитку інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації. В статті наведені результати вивчення біоплівкоутворюючих властивостей клінічних штамів грампозитивних мікроорганізмів, збудників інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації. Біоплівкоутворюючі властивості досліджено на 145 клінічних штамів умовнопатогенних мікроорганізмів (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus sanguinis* та *Kocuria kristinae*), виділених від пацієнтів з інфекційними одонтоімплантаційними ускладненнями за допомогою спектрофотометричного методу (MtP-test "microtiter plate test", за G.D. Christensen). Встановлено, що клінічні штами *S. aureus*, *S. epidermidis* та *S. sanguinis* володіють високими біоплівкоутворюючими властивостями, *K. kristinae* - середніми. *S. warneri* мали найменші показники біоплівкоутворення.

Ключові слова: біоплівки, інфекційно-запальні ускладнення, мікроорганізми.

Вступ

Основними інфекційно-запальними ускладненнями одонтоімплантації вважають периімплантатний мукозит та периімплантит, які співвідносяться як гінгівіт з пародонтитом і є різними стадіями одного інфекційно-запального процесу. Їх виникнення пов'язують з реакцією організму на встановлений імплантат. Умовнопатогенні мікроорганізми ротової порожнини мають вирішальне етіологічне значення в їх спричиненні. В наш час відомо близько 90% вивчених видів бактерій, які володіють властивостями утворювати біоплівки на поверхнях тканин макроорганізму, імплантатів та медичних матеріалів. Формування біоплівок у вогнищі запалення призводить до виникнення важких бляшко-асоційованих ускладнень, сприяє хронічному перебігу інфекційного процесу [5, 8].

Відомо, що першочергова роль у розвитку біоплівок належить грампозитивним мікроорганізмам нормальної мікрофлори ротової порожнини, які володіють вираженими факторами специфічної адгезії. Грампозитивні мікроорганізми першими колонізують слизові оболонки або поверхні імплантатів і активно утворюють біоплівки [2, 6, 7].

Інфекційно-запальні процеси, пов'язані з утворенням біоплівок, потребують особливої тактики лікування, оскільки мікроорганізми в складі біоплівки володіють високим синергізмом і представляють собою високоорганізовану тривимірну біологічну форму життєдіяльності бактерій, здатну протистояти зовнішнім факторам агресії. Важливою властивістю біоплівки є захист мікроорганізмів від несприятливих факторів зовнішнього середовища, дії протимікробних засобів та факторів імунної системи макроорганізму [1, 9]. З цих позицій, актуальним є дослідження біоплівкоутворення та чутливості до протимікробних засобів клінічних штамів мікроорганізмів у складі мікробних біоплівок, що дозволить суттєво розширити уявлення про їх біологічні властивості та підвищити ефективність профілактики, лікування інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації.

Мета - дослідження біоплівкоутворюючих властивостей клінічних штамів грампозитивних мікроорганізмів, збудників інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації.

Матеріали та методи

У дослідженні було обстежено 94 пацієнти середньої вікової групи за ВООЗ (середній вік 48±6,59 років) з включеними дефектами зубних рядів у боковій ділянці, яким встановлено від 1 до 4 розбірних титанових імплантатів, за результатами клінічних і рентгенологічних методів діагностовано периімплантатний мукозит та периімплантит. Для виділення, дослідження біологічних властивостей аеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори виконували забір матеріалу з периімплантатної кишені за допомогою стерильного паперового ендодонтичного штифта стандартного розміру (№30), довжиною 1 см, з подальшим культивуванням на елективних, селективних середовищах та ідентифікацією мікроорганізмів стандартними мікробіологічними методами.

Від обстежених хворих було виділено, ідентифіковано за морфологічними, тинкторіальними, культуральними, біохімічними властивостями 145 штамів грампозитивних мікроорганізмів. Серед них штамів *Staphylococcus aureus* (n=49), *Staphylococcus epidermidis* (n=32), *Staphylococcus warneri* (n=22), *Streptococcus sanguinis* (n=24) та *Kocuria kristinae* (n=18). В якості порівняння використовували музейні еталонні штами *S. aureus* ATCC 25923 та *S. epidermidis* ATCC 14990, одержані відповідно з музею живих культур мікроорганізмів бактеріологічної лабораторії кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (Вінниця) та колекції ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України" (Київ).

Клінічні ізоляти культивували протягом 24-48 годин на тіогліколовому поживному середовищі, з додаван-

ням 1,5% агару "Дифко", 5% крові та 0,5-1% дріжджового гідролізату, як стимулятора росту мікроорганізмів при температурі 37°C. Заключну ідентифікацію проводили за допомогою автоматичного бактеріологічного аналізатора Vitec - 2 compact bioMérieux (Франція) згідно інструкції виробника.

Вивчення біоплівкоутворюючих властивостей клінічних ізолятів визначали за допомогою спектрофотометричного методу за G.D. Christensen (MtP-test "microtiter plate test"). Біоплівки відтворювали в лунках стерильного плоскодонного 96-лункового полістеролового планшету (Corning, США) та забарвлювали 1%-м розчином кристалічного фіолетового. Властивості мікроорганізмів утворювати біоплівки оцінювали за ступенем поглинання барвника у одиницях щільності (ОЩ) за допомогою спектрофотометра (570 нм). Інтерпретацію результатів проводили відповідно відомої методики. Так, здатність мікроорганізмів до утворення біоплівок оцінювали як низьку (ОЩ<0,120), середню (ОЩ=0,121-0,239) та високу (ОЩ>0,240) [3, 9].

Результати. Обговорення

За даними досліджень встановлено, що переважна більшість грампозитивних збудників, які колонізували слизові оболонки пацієнтів з інфекційно-запальними ускладненнями дентальної імплантації, володіють середньою та високою здатністю до утворення біоплівок. Виключення становили клінічні ізоляти *S. warneri*, в яких встановлено низькі біоплівкоутворюючі властивості за показником ступеню поглинання барвника (ОЩ<0,120; рис. 1).

Встановлено, що найвищими властивостями до утворення біоплівок володіли клінічні штами *S. aureus* та *S. epidermidis*. Серед 49 досліджуваних штамів *S. aureus* та 32 штамів *S. epidermidis* лише 6 ізолятів (по 3 в межах кожного виду) виявили низьку здатність до утворення біоплівок, що свідчить про високі біоплівкоутворюючі властивості грампозитивних мікроорганізмів, які спричиняли інфекційні ускладнення при імплантації зубів. Ступінь поглинання барвника біоплівками, які продукували клінічні штами *S. epidermidis* ($0,280 \pm 0,13$) не мав достовірної різниці за своїм значенням від показників ОЩ біоплівок клінічних штамів *S. aureus* ($0,293 \pm 0,13$; $p > 0,05$).

Відомо, що *S. sanguinis* в числі перших заселяє порожнину рота дітей. Даний мікроорганізм асоціюють з раннім карієсом в дитячому віці, а також його часто визначають як збудника інфекційних ендокардитів, важких ендovasкулярних інфекцій у імунodefіцитних осіб. За даними наукової літератури такі властивості, пов'язують з високими ад-

гезивними властивостями та здатністю утворювати біоплівки на поверхні твердих тканини зубів, запускаючи процес бляшкоутворення [2].

У дослідженні доведено, що ступінь поглинання барвника біоплівками, утвореними клінічними штамами *S. sanguinis*, знаходився в межах $0,242 \pm 0,86$ ОЩ. Тобто, досліджувані збудники цього виду володіли високою біоплівкоутворюючими властивостями. Варто відмітити, що серед 24 клінічних штамів *S. sanguinis* низькі біоплівкоутворюючі властивості було встановлено лише в одному випадку. В досліджуваних ізолятах *S. warneri* встановлено низькі властивості до утворення біоплівок. Так, ОЩ поглинання барвника біоплівками, які дані штами продукували, становила $0,120 \pm 0,06$. Високі біоплівкоутворюючі властивості визначили тільки у 2 клінічних штамів *S. warneri*.

В науковій літературі мало відомо про біологічні властивості умовнопатогенних мікроорганізмів роду *Kosuria*, зокрема про їх здатність утворювати біоплівки на поверхнях тканин організму людини та матеріалах медичного призначення. Проте, клінічні штами *Kosuria* spp. все частіше ідентифікують як збудників опортуністичних катетер-асоційованих, вентилятор-асоційованих інфекцій в пацієнтів відділень інтенсивної терапії [4].

Згідно наших досліджень, у клінічних штамів *K. kristinae*, які колонізували периімплантатну ділянку за умов інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації, встановлено біоплівкоутворюючі властивості. Так, показники ОЩ ($0,233 \pm 0,10$) свідчили про середню здатність до утворення біоплівок у клінічних штамів *K. kristinae*. Серед 18 досліджуваних ізолятів 4 штами *K. kristinae* володіли низькими біоплівкоутворюючими властивостями. Встановлено, що в третини досліджуваних штамів *K. kristinae* ($n=7$) показниками ОЩ поглинання барвника перевищували 0,240, що відповідало високим біоплівкоутворюючим властивостям.

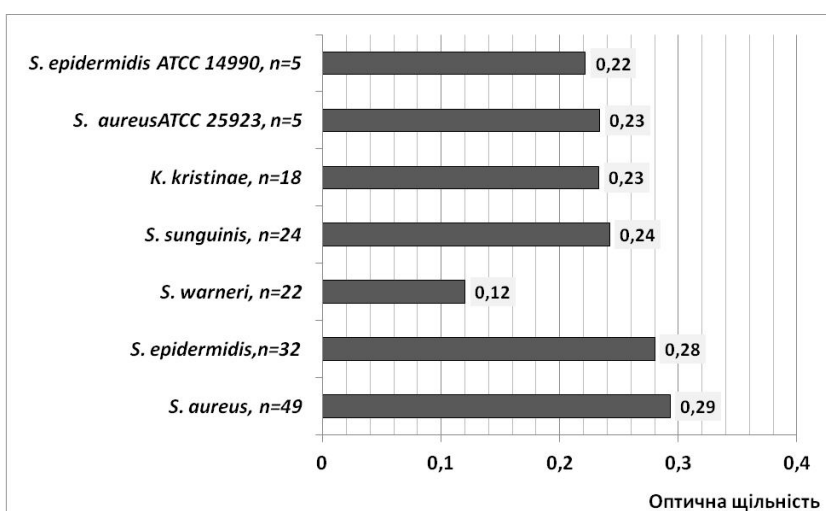


Рис. 1. Характеристика біоплівкоутворюючих властивостей клінічних штамів грампозитивних мікроорганізмів за показником поглинання барвника біоплівками (ОЩ).

У музейних штамів *S. aureus* ATCC 25923 та *S. epidermidis* ATCC 14990, також встановлено біоплівкоутворюючі властивості, які визначали за показником ОЩ як середні. В порівнянні з еталонними штамми золотистого та епідермального стафілококів, у клінічних ізолятів, збудників інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації, не було встановлено достовірних відмінностей у здатності утворювати біоплівки ($p > 0,05$).

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Грампозитивні мікроорганізми, що колонізують слизову оболонку порожнини рота в пацієнтів з інфекційно-запальними ускладненнями одонтоімплантації

мають варіабельні властивості до утворення біоплівки.

2. Клінічні штами *S. aureus*, *S. epidermidis* та *S. sanguinis* володіють високими біоплівкоутворюючими властивостями, *K. kristinae* - середніми. *S. warneri* мають найменші показники біоплівкоутворення.

3. Клінічні ізоляти *S. aureus*, *S. epidermidis* проявляють біоплівкоутворюючі властивості, які достовірно не відрізняються від таких у музейних штамів *S. aureus* ATCC 25923 та *S. epidermidis* ATCC 14990 ($p > 0,05$).

Перспективним є дослідження впливу протимікробних засобів на властивості утворювати біоплівки клінічними штамми грампозитивних збудників інфекційно-запальних ускладнень для покращення заходів боротьби з ними.

Список посилань

1. Голуб, А. В. (2012). Бактериальные биопленки - новая цель терапии. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*, 14(1), 23-29.
2. Фаустова, М. О., Назарчук, О. А., & Ананьева, М. М. (2017). Протистрептококова активність антибіотиків і антисептиків. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії*, 2 (58), 58-60.
3. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey E. H. (1985), Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
4. Kandi, V., Palange, P., Vaish, R., Bhatti, A. B., Kale, V., Kandi, M. R., & Bhoomagir, M. R. (2016). Emerging Bacterial Infection: Identification and Clinical Significance of *Kocuria* Species. *Cureus*, 8(8): e731. doi: 10.7759/cureus.731.
5. Lee, A., & Wang, H. L. (2010). Biofilm related to dental implants. *Implant Dentistry*, 19(5), 387-393. doi: 10.1097/ID.0b013e3181effa53.
6. Pace, J. L., Rupp, M., & Finch, R. G. (Eds.). (2006). *Biofilms, infection, and antimicrobial therapy*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
7. Phillips, P. L., Wolcott, R. D., Fletcher, J., & Schultz, G. S. (2010). Biofilms Made Easy. *Wounds International*, 1(3). Retrieved from: <http://www.woundsinternational.com>.
8. Shahabouee, M., Rismanchian, M., Yaghini, J., Babashahi, A., Badrian, H., & Goroohi, H. (2012). Microflora around teeth and dental implants. *Dental Research Journal*, 9(2), 215-220. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3353701/>.
9. Vasanthi, R., Karthikeyan, D., & Jeya, M., (2014). Study of biofilm production and antimicrobial resistance pattern of the bacterial isolates from invasive devices. *International Journal of Research in Health Sciences*, 2(1), 274-280.

Назарчук А.А., Фаустова М.А.

БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Резюме. Условнопатогенные микроорганизмы играют ключевую роль в развитии инфекционно-воспалительных осложнений одонтоимплантации. В статье приведены результаты изучения биопленкообразующих свойств клинических штаммов грамположительных микроорганизмов, возбудителей инфекционно-воспалительных осложнений одонтоимплантации. Биопленкообразующие свойства исследованы при помощи спектрофотометрического метода (MtP-test "microtiter plate test", за G.D. Christensen) на 145 клинических штаммах условнопатогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus sanguinis*, *Kocuria kristinae*), выделенных от пациентов с инфекционными одонтоимплантационными осложнениями. Установлено, что клинические штаммы *S. aureus*, *S. epidermidis* и *S. sanguinis* обладают высокими способностями образовывать биопленки, *K. kristinae* - средними. *S. warneri* имели наименьшие показатели биопленкообразования.

Ключевые слова: биопленки, инфекционно-воспалительные осложнения, микроорганизмы.

Nazarchuk O.A., Faustova M.O.

BIOFILMPRODUCING PROPERTIES OF CLINICAL STRAINS OF GRAM POSITIVE MICROORGANISMS

Summary. In more than 90% of cases the implant osseointegration in the alveolar bone is reported to be successful, but implant placement may also be accompanied by some complications that can occur during the procedure of dental implant placement as well as in the postoperative period. The article presents the results of the study of bio-film-forming properties of clinical strains of gram-positive microorganisms, pathogens of infectious-inflammatory complications of odontoplasty. Biofilm-forming properties were investigated on 145 clinical strains of conditionally pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Streptococcus sanguinis* та *Kocuria kristinae*), isolated from patients with infectious odonto-implant related complications, using the spectrophotometric method (MtP-test "microtiter plate test", by G.D. Christensen). Clinical strains of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. sanguinis* have been established to have high biofilm-forming properties, and *K. kristinae* - obtained medium ones. *S. warneri* had the lowest biofilm formation.

Key words: biofilms, infectious-inflammatory complications, microorganisms.

Рецензент - д.мед.н., проф. Палій Г.К.

Стаття надійшла до редакції 15.04.2017 р.

Назарчук Олександр Адамович - к.мед.н., старший викладач кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова; nazarchukoa@gmail.com
Фаустова Марія Олексіївна - викладач кафедри мікробіології, вірусології та імунології ВДНЗ України "Українська медична стоматологічна академія"; mashafaustova@ukr.net

©Бобир В.В., Понятовський В.А., Дюжикова О.М., Назарчук О.А., Настенко В.Б., Ширококов В.П.

УДК: 578.835.1:616.34-008.87-008.6

Бобир В.В.¹, Понятовський В.А.¹, Дюжикова О.М.¹, Назарчук О.А.², Настенко В.Б.¹, Ширококов В.П.¹

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця (пр. Перемоги, 34, м. Київ, 03057, Україна)¹, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018 Україна)²

ВПЛИВ КИШКОВОЇ МІКРОФЛОРИ НА ЗБЕРЕЖЕННЯ ІНФЕКЦІЙНОСТІ ЕНТЕРОВІРУСІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Резюме. В роботі наведені результати дослідження впливу бактеріальної мікрофлори кишківника на тривалість збереження інфекційності ентеровірусів в умовах *in vivo* та *in vitro*. За результатами дослідження показано здатність ентеровірусів зберігати інфекційну активність у фекальних масах тварин зі збереженою мікрофлорою та при антибіотикоіндукованому дисбіозі. Встановлено зв'язок між зростанням титру вірусів у фекальних масах тварин та наявністю мікроорганізмів. Доведено, підвищення життєздатності вірусу поліомієліту 1 типу (штам Lsc2ab) під час зберігання за умов присутності бактерій. Встановлено, що присутність *Vacillus subtilis* та *Lactobacillus plantarum* найкраще сприяє збереженню інфекційності вірусів до 60 діб. Сформульовано наукову гіпотезу про можливий противірусний ефект антибіотиків на фоні формування дисбіотичних станів.

Ключові слова: антибіотики, дисбіоз, ентеровіруси, інфекція, кишкова мікрофлора.

Вступ

Кишкова мікрофлора здатна суттєво впливати на фізіологічні функції організму людини. Разом з тим, при вираженій дії синантропних бактерій, роль вірусів, які присутні у шлунково-кишковому тракті в умовах гомеостазу, є не зовсім визначеною. Сьогодні, на прикладі норовірусів (MNV), зроблено припущення про здатність вірусів підтримувати гомеостаз кишківника, формувати імунітет його слизової оболонки та, можливо, компенсувати шкідливий вплив лікування антибіотиками [5].

Не зважаючи на значні обмеження в технічних можливостях, направлених на виявлення вірусів в шлунково-кишковому тракті, нещодавні метагеномні дослідження з використанням методу секвенування дозволили виявити існування складного кишкового вірому [11, 16]. Дослідники позиціонують його як вірусний компонент нормальної мікрофлори. До таких вірусів, крім норовірусів [7], які можуть залишатись в кишківнику після захворювання, відносять представників родини *Anelloviridae* *Circoviridae*, які виявляються у здорових осіб [10, 12], а також деякі некласифіковані віруси, у яких при секвенуванні нуклеотидна послідовність нуклеїнових кислот значно відрізняється від відомих нині вірусів [8, 9]. Аналіз кишкового вірому у макак-резус, інфікованих мавпячим вірусом імунодефіциту (SIV), показав, що багато вірусів присутні в низьких концентраціях і знаходяться під контролем імунної системи [3]. Сьогодні доказано, що інфікованість MNV вірусом (PHK (+) - вірусом з родини *Caliciviridae*) здатна запобігати розвитку гострих діарейних синдромів у мишей [4, 17]. PHK-віруси часто виявляються при безсимптомних формах у немовлят і дітей, а також в осіб після перенесеного гострого гастроентериту [1, 2].

Відомі наукові повідомлення, в яких йдеться про зниження частоти виділення ентеровірусів, норовірусів та реовірусів в осіб з вираженим дисбіозом кишківника на фоні ВІЛ/СНІД [13, 15]. Досліджуючи фекалії ВІЛ-інфікованих дітей, зроблено висновок, що такі кишкові віруси не є причиною розвитку діареї у цієї групи хворих [6]. Іншими вченими зафіксовано захисну роль кишкової мікробіоти при розвитку вірусних інфекцій. Наприклад, синантропна мікрофлора комарів роду *Aedes aegypti* побічно зменшує передачу вірусу Денге [18]. Припускають, що ендогенна бактеріальна флора стимулює противірусну імунну систему комарів. Крім того, за даними дослідників, видалення антибіотиками нормальної мікрофлори мишей підвищує сприйнятливість тварин до вірусу грипу типу А. Отже, все вищеперераховане вказує на складні взаємовідносини кишкової нормальної мікрофлори та вірусів у кишківнику людини і, безумовно, потребує глибоких фундаментальних досліджень.

Мета - з'ясувати вплив бактеріальної мікрофлори кишківника на тривалість збереження інфекційності ентеровірусів в умовах *in vivo* та *in vitro*.

Матеріали та методи

В якості експериментальної моделі використано лабораторних нелінійних білих мишей. Тварини утримувалися згідно "Стандартних правил по упорядкуванню, обладнанню і утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)" [21]. Досліди проводили з прототипним вакцинним штамом вірусу поліомієліту 1 типу (штам Lsc2ab). Титування вірусу проводили мікрометодом з використанням культури клітин HEp-2 [19] та