

Object and methods of the research. The object of the research was antibiotic resistance of biofilm forming strains of staphylococci isolated from the nasal cavity of persons with non-allergic rhinitis. Microscopic and bacteriological methods were used to isolate and identify the staphylococci. The study of the ability to form a biofilm was performed on 96-well plastic plates. Antibiotic susceptibility was determined according to CLSI standards.

The results of the study and their discussion. It was found that the most common manifestations of non-allergic rhinitis in the microbiota of the nasal cavity are: *S. aureus* – 64.4% (31), *S. epidermidis* – 18.8% (9), *S. saprophyticus* – 10.4% (5) and *Staphylococcus* spp. – 6.3% (3). 87.5% (42) of the isolated strains of staphylococci were able to form a biofilm after 72 h of cultivation. Of these: all strains of *S. epidermidis* (9), 90.3% (28) – *S. aureus*, 80% (4) – *S. saprophyticus* and 1 – *Staphylococcus* spp.

It was found that more than 50% were resistant to doxycycline. For other antibiotics, the best effect was found for meropenem, to which only 21.4% (6) and 33.3% (3) of *S. aureus* and *S. epidermidis* strains were resistant, respectively.

Conclusions. The predominance of *S. aureus* strains among other staphylococci in the microbiota of the nasal cavity in persons with non-allergic rhinitis: 64.6% (31) cases. It was determined that most strains of staphylococci of different species have a tendency to form a biofilm: 87.5% (42) of cases. It has been determined that azithromycin, amoxicillin / clavulanic acid and ofloxacin may be recommended as drugs of choice for the treatment of rhinitis in surveyed contingent. The reserve drug is meropenem, and doxycycline can be used only in determining the sensitivity to it in a particular strain.

Key words: staphylococci, nasal cavity, non-allergic rhinitis, biofilm, antibiotic resistance.

Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 23.12.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2021-2-160-180-183

УДК 617.3+597.6

¹Кривцова М. В., ¹Костенко Є. Я., ¹Скляр І. І., ¹Костенко С. Б., ²Саламон І.

ПЕРСИСТЕНЦІЯ УМОВНО-ПАТОГЕННІЙ МІКРОБІОТИ У РОТОВІЙ ПОРОЖНИНІ ХВОРИХ ІЗ ЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПАРОДОНТУ

¹ДВНЗ «Ужгородський національний університет» (м. Ужгород)

²Прешовський університет в Прешові (м. Прешов, Словаччина)

maryna.krivcova@uzhnu.edu.ua

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дана робота є фрагментом НДР «Клініко-лабораторне дослідження сучасних стоматологічних технологій та експертна оцінка якості методик лікування», номер державної реєстрації 0118U004526 та «Мікробіологічні, біохімічні та біотехнологічні аспекти використання лікарських рослин та продуктів на їх основі щодо антибіотикорезистентних штамів мікроорганізмів в умовах різних біологічних систем», номер державної реєстрації 0120U100516.

Вступ. Однією з основних ценотичних груп мікроорганізмів ротової порожнини є факультативна мікробіота, етіологічна значущість та роль якої на сучасному етапі у розвитку запальних захворювань та післяопераційних ускладнень значно підвищується [1]. Перебуваючи у ротовій порожнині та інших органах, як представники нормальної мікробіоти, за певних умов (зниження імунного статусу організму, оперативні втручання, соматичні захворювання і т. д.), умовно-патогенні мікроорганізми викликають запальні процеси різної локалізації [2].

Важливим аспектом вивчення даної групи мікроорганізмів в мікробіоті ротової порожнини є стрімке зростання полімедикаментозної резистентності (стійкості) до антибіотичних препаратів. Основними причинами втрати активності антибіотиків є їх нераціональне та нецільове використання (особливо при самолікуванні) та застосування у різних галузях сільськогосподарства. Внаслідок цього лікування багатьох інфекційних захворювань, стає важчим: подовжується період перебування хворих у стаціонарі, зростають витрати на лікування та збільшуються показники смертності. Полімедикаментозну стійкість на сьогодні,

виявляють як у патогенних бактерій, так і коменсальних мікроорганізмів. Формування антибіотикорезистентності генетично зумовлено, внаслідок мутацій, набуття нової генетичної інформації або завдяки зміні рівня експресії власних генів бактерійної клітини [3]. Важливим напрямком досліджень є вивчення резистентності не тільки патогенних бактерій, але й мікроорганізмів, що живуть у навколишньому середовищі. Із цим певною мірою пов'язане поняття глобальної резистентності, як сукупності всіх генів резистентності до АБ у геномах усіх мікроорганізмів – патогенних і непатогенних, що живуть у природних умовах і різних біологічних середовищах. До складу резистентності входять потенційні гени резистентності, які кодують білки, що визначають помірну антибіотикорезистентність (забезпечують афінність до АБ) [4-6].

У зв'язку із стрімкою зміною вірулентності та патогенності представників факультативної мікробіоти, актуальності набувають роботи з вивчення складу, рівня персистенції та біологічних властивостей умовно-патогенних мікроорганізмів при запальних процесах різної етіології, в тому числі ротової порожнини та з'ясування їх ролі в ускладненнях запальних захворювань пародонту [5, 6].

Метою даної роботи було дослідити спектр, рівень персистенції та чутливість до антибіотиків умовно-патогенних мікроорганізмів пародонтальних тканин в умовах запальних захворювань пародонту.

Об'єкт і методи дослідження. Клінічною базою для виділення ізолятів, що персистували на фоні запальних процесів тканин пародонту була «Університетська стоматологічна поліклініка» ДВНЗ «УжНУ»; мікробіологічні дослідження проводили у мікробіоло-

гічної лабораторії кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології ДВНЗ «УжНУ».

Біоматеріал із осередку запального процесу 38 хворих із пародонтитом висівали на поживні середовища методом секторного посіву за Голдом, використовуючи поживні середовища (HiMedia): Sabouraud Dextrose Agar, для культивування мікроскопічних грибів; кров'яний агар (МПА + 5% крові) - бактерій роду *Streptococcus* та *Neisseria*; стрептококів – *Streptococcus Selective Agar*; середовища Ендо та Левіна (Farmaktiv, Ukraine) – бактерій родини *Enterobacteriaceae*, жовтково-сольовий агар з манітом - бактерій роду *Staphylococcus*, виділення ентерококів проводили на середовищі *Bile Esculin Azide Agar*, *Pseudomonas aeruginosa - Pseudomonas Isolation Agar* (HiMedia). Письмова інформована згода була отримана від усіх пацієнтів, які брали участь у дослідженні. Бактерії і мікроскопічні гриби ідентифікували за морфологічними, тинкторіальними та біохімічними ознаками з використанням систем для ідентифікації ENTERO-test, STREPTO-test, STAPHYLO-test виробництва Erba Lachema (Чехія) [9].

Антибіотикочутливість бактерій та мікроскопічних грибів визначали диско-дифузійним методом згідно (Наказ МОЗ України № 167 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості

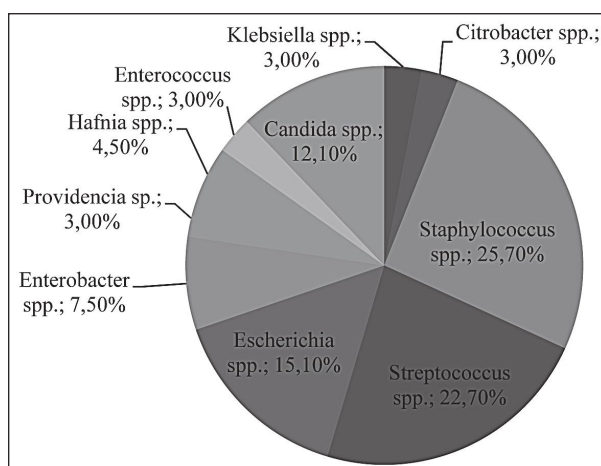


Рисунок 1 – Біотичний склад та частота персистенції умовно-патогенних мікроорганізмів при запальних захворюваннях пародонту в межах родів.

мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів»; EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). При дослідженні чутливості мікроорганізмів застосовували стандартні диски з антибіотиками виробництва «Фармактив» (Україна), відповідно до переліку, рекомендованого МОЗ України.

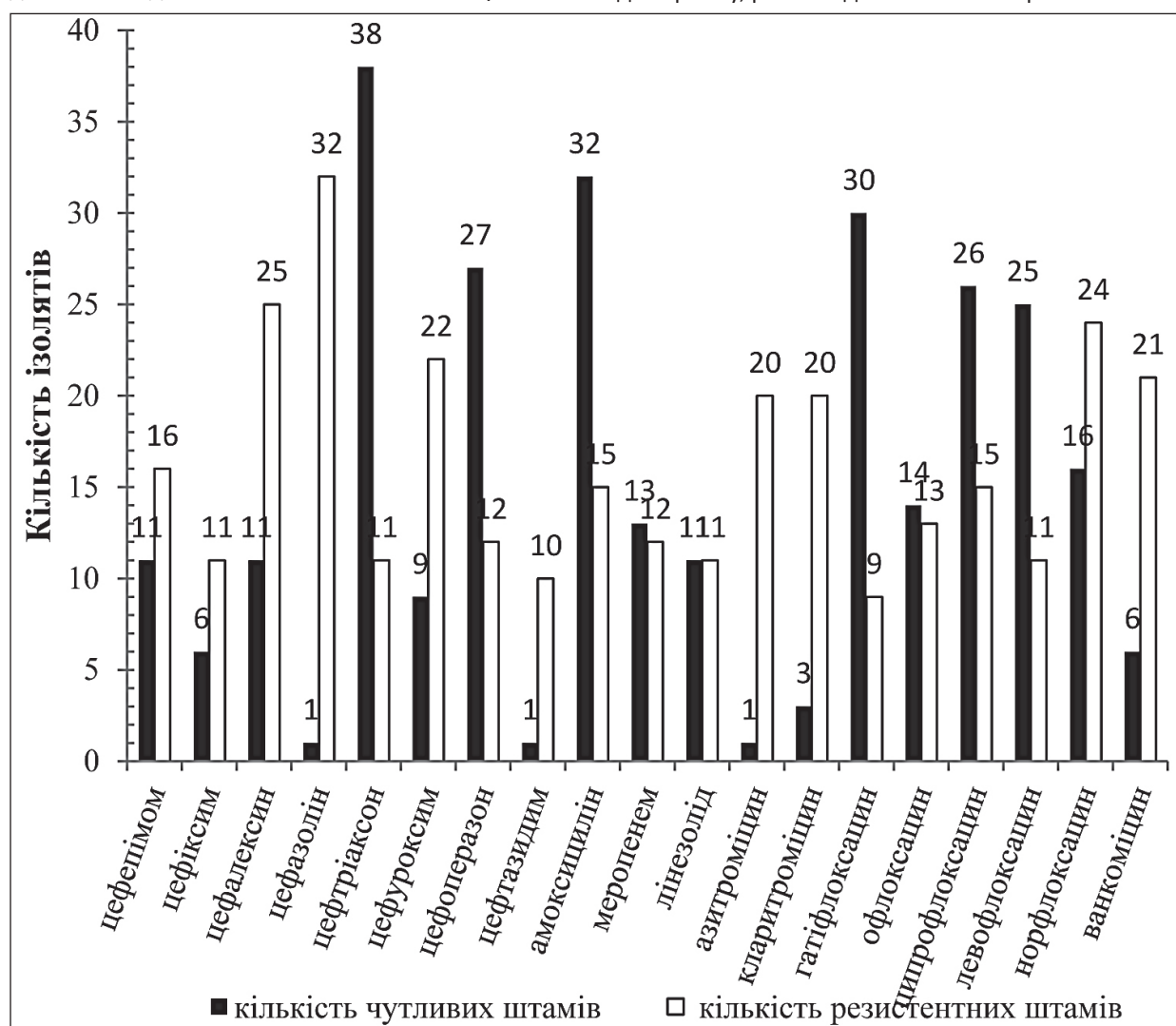


Рисунок 2 – Кількість чутливих та резистентних ізолятів бактерій із ротової порожнини до антибіотиків.

Примітка: * (без урахування помірно чутливих).

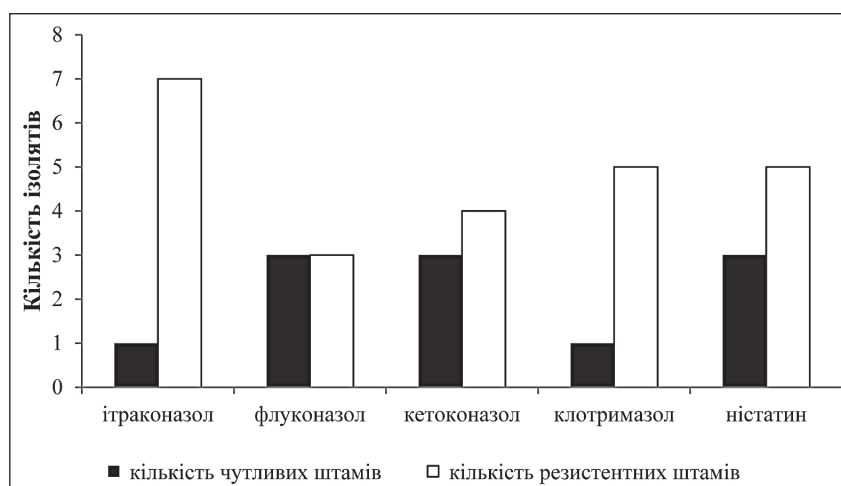


Рисунок 3 – Чутливість грибів роду *Candida* spp. до антибіотиків.

Результати дослідження та їх обговорення. Для досліджень було використано біоматеріал з ротової порожнини 38-ми пацієнтів з запальними захворюваннями пародонту. Біотичний склад умовно-патогенної мікробіоти хворих включав: 10 родів, 17 видів та 66 штамів мікроорганізмів (рис. 1).

Виходячи з вище наведених даних, при запальних процесах пародонту найчастіше зустрічаються бактерії роду *Staphylococcus* spp. – 25,7%, *Streptococcus* spp. – 22,7%. У середньому значенні виділяли мікроорганізми родів *Escherichia* spp. – 15,1%, *Candida* spp. – 12,1%, *Enterobacter* spp. – 7,5%; найменшу частоту персистенції мали: *Hafnia* spp. – 4,5%, *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Providencia* spp., *Enterococcus* spp. – по 3%. Водночас загальний відсоток мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* становив 36,1%. За видовим спектром у межах роду *Staphylococcus* spp. – найчастіше зустрічається золотистий та гемолітичний стафілокок. Найвищу частоту персистенції в межах роду *Streptococcus* spp. мали види *Streptococcus viridians* та *Streptococcus pyogenes*, найменшу – *Streptococcus pneumoniae*. Серед представники роду *Enterococcus* spp. ізолювали *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*. Серед бактерій родини *Enterobacteriaceae* виділяли: *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia* spp., *Escherichia coli*, *Candida* spp., *Hafnia alvei*; рід *Enterobacter* spp. був представлений двома видами *Enterobacter aerogenes* та *Enterobacter cloacae*. Слід відмітити, що умовно-патогенні мікроорганізми із осередку запального процесу, виділяли у клінічно значущих титрах (10^6 - 10^{12} КУО/мл).

Слід відзначити, що з 38-ми пацієнтів у 22-ох (57,9% випадків) були виявлені асоціації мікроорганізмів. При виділенні асоціацій клінічні прояви хвороби були більш виразними. У 17-ти хворих виявлені два асоці-

анти (77,2% від числа пацієнтів з асоціаціями), а у 4-ох – асоціація з трьох мікроорганізмів (18,18%) та в одного пацієнта асоціація з 4-ох мікроорганізмів (4,54%).

Вивчення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків показало, що з 66 ізолятів найбільше було чутливих до цефтріаксону, гатіфлоксацину, амоксицилін/клавулонату. Найвища кількість резистентних ізолятів виявлена стосовно цефазоліну, цефалексіну, азитроміцину. Отже, найвищий рівень резистентності виявляли до незахищених макролідів та цефалоспоринов I покоління (рис. 2).

Аналіз чутливості мікроскопічних грибів роду *Candida* до антибіотиків показав (рис. 3), що найбільше штамів були чутливими до флуконазолу, кетоназолу та ністатину – по 3 штами, найменше до ітраконазолу і клотримазолу – по 1 ізолят.

Наведені результати та дані наших попередніх досліджень [7-10] вказують на високий рівень персистенції умовно-патогенних мікроорганізмів у пародонтальних тканинах хворих на запальні захворювання пародонту, з високим рівнем резистентності до антимікробних препаратів. Така тенденція вказує також на формування дисбактеріозу ротової порожнини, що ускладнює запальні та деструктивні зміни слизової оболонки та тканин пародонту.

Висновки. Гнійні ураження асоціюються з факультативними мікроорганізмами родів *Staphylococcus*, родини *Enterobacteriaceae*. Відмічається кореляція між ступенем пародонтиту та дисбактеріозу. Залежність ступеня запальних та дистрофічних змін тканин пародонту від наявності асоціацій умовно-патогенних мікроорганізмів у клінічно значущих кількостях (10^8 - 10^{12} КУО/мл) можна пояснити впливом метаболітів бактерій на тканини пародонту.

Отримані нами результати є важливим етапом правильної стратегії антимікробної терапії при пародонтиті та демонструють виключну необхідність проведення аналізу антибіотикочутливості при раціональному використанні антимікробних препаратів за умов лікування пародонтиту.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним є комплексна оцінка мікробіоти ротової порожнини при запальних захворюваннях пародонту з врахуванням антибіотикочутливості анаеробної мікробіоти пародонтальних тканин.

Література

- Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. Protein Cell. 2018;9(5):488-500.
- Cruz QSM, Díaz SP, Arias SD, Mazón BGM. Microbiota of oral cavity ecosystems. Rev Cubana Estomatol. 2017;54(1):84-99.
- Romanyuk LB, Kravets NY, Klimnyuk SI, Kopcha VS, Dronova OY. Antibiotikorezistentnost umovno-patogennih mikroorganizmiv: aktualnist, umovi viniknennya, shlyahi podolannya. Infektsiyni hvorobi. 2019;4:63-71. [in Ukrainian].
- Vinogradova KA, Bulgakova VG, Polin VN, Kozhevin PA. Ustoychivost mikroorganizmiv k antibiotikam: rezistoma ee raznoobrazie i razvitiye. Antibiotiki i himioterapiya. 2013;5.6(58):38-50. [in Russian].
- Gutierrez A, Laureti L, Crussard S, Abida H, Rodríguez-Rojas A, Blázquez J, et al. B-lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. Nat. Commun. 2013;4:1610-1623.
- Gromov VO, Rozhkova NV, Knava OE. Razvitiye disbiozov polosti rta pri razlichnyih vidah zubnogo protezirovaniya. Visnik stomatologii. 2008;1:11-12. [in Ukrainian].

7. Kryvtsova MV, Kostenko YeYa. Perspektyvy vykorystannya fito- ta antyseptychnykh preparativ dlya korektsiyi mikrobioty rotovoyi porozhnyny z urakhuvannyam individual'nykh osoblyvostey asotsiatsiy umovno-patohennykh mikroorhanizmiv. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2019;4.2(154):382-5. [in Ukrainian].
8. Kryvtsova MV, Kostenko YeYa. Dominant microbial associations of the oral cavity in the conditions of generalized periodontitis and features of there sensitivity to antibacterial drugs. Studia Biologica. 2020;14(1):51-62.
9. Kryvtsova MV, Király J, Koščová J, Kostenko YeYa, Bubnov RV, Spivak MYa. Determination of biofilm formation and associated gene detection in Staphylococcus genus isolated from the oral cavity under inflammatory periodontal disease. Studia Biologica. 2020;14(3):49-64.
10. Kryvtsova MV, Kostenko YY. Korektsiya mikrobioty rotovoyi porozhnyny pry zapal'nykh zakhvoryuvannyakh parodontu. Visnyk problem biolohiyi i medytsyny. 2020;3(157):331-336. [in Ukrainian].

ПЕРСИСТЕНЦІЯ УМОВНО-ПАТОГЕННІ МІКРОБІОТИ У РОТОВІЙ ПОРОЖНИНІ ХВОРИХ ІЗ ЗАПАЛЬНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ПАРОДОНТУ

Кривцова М. В., Костенко Є. Я., Скляр І. І., Костенко С. Б., Саламон І.

Резюме. Хронічний пародонтит є захворюванням мультифакторного генезу. У його формуванні важливу роль відіграють порушення рівноваги між інфекційними факторами (пародонтопатогенами) та імунною реактивністю у тканинах пародонту. Водночас в умовах порушення мікробіоти ротової порожнини зростає етіологічна роль інших мікроорганізмів, в тому числі умовно-патогенних, що набувають додаткових факторів патогенності та характеризуються високим рівнем стійкості до антимікробних препаратів.

Метою даної роботи було дослідити спектр, рівень персистенції та чутливості до антибіотиків умовно-патогенних мікроорганізмів пародонтальних тканин в умовах запальних захворювань пародонту.

Забір біологічного матеріалу із ротової порожнини людей з хронічним генералізованим пародонтитом II-III ступеня проводили з використанням стерильного аплікатора у транспортній пробірці (AMIES). Матеріал висівали на поживні середовища методом секторного посіву за Голдом, використовуючи диференційно-діагностичні поживні середовища (Himedia), з наступною ідентифікацією тест системами Erba Lachema (Чехія). Антибіотикочутливість бактерій та мікроскопічних грибів визначали диско-дифузійним методом згідно відповідно до рекомендацій EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Наведені результати та дані наших попередніх досліджень вказують на високий рівень персистенції антибіотикорезистентних умовно-патогенних мікроорганізмів у пародонтальних тканинах хворих на пародонтит. Умовно-патогенні мікроорганізми із осередку запального процесу, виділяли у клінічно значущих титрах (10^6 - 10^{12} КУО/мл). Найчастіше зустрічались бактерії роду *Staphylococcus sp.* – 25,7%, *Streptococcus sp.* – 22,7%; водночас загальний відсоток мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* становив 36,1%. З 38-ми пацієнтів у 22-ох (57,9% випадків) були виявлені асоціації мікроорганізмів. При виділенні асоціацій клінічні прояви хвороби були більш виразними.

Вивчення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків показало найвищий рівень резистентності до макролідів та цефалоспоринов І покоління. Отримані нами результати є важливим етапом правильної стратегії антимікробної терапії при пародонтиті та демонструють виключну необхідність проведення аналізу антибіотикочутливості при раціональному використанні антимікробних препаратів за умов лікування запальних захворювань пародонту.

Ключові слова: антибіотикорезистентність, мікробіота ротової порожнини, умовно-патогенні мікроорганізми.

PERSISTENCE OF OPPORTUNISTIC MICROBIOTA IN THE ORAL CAVITY OF PATIENTS SUFFERING FROM INFLAMMATORY PERIODONTAL DISEASES

Kryvtsova M. V., Kostenko Ye. Ya., Skliar I. I., Kostenko S. B., Salamon I.

Abstract. Chronic periodontitis is known to be a disease of multifactorial genesis. An important role in its formation is played by imbalances between the infective factors (periodontal pathogens) and immune reactivity in periodontal tissues. At the same time, in conditions of disordered oral microbiota, the etiological role of other microorganisms, including opportunistic ones that acquire additional pathogenic power and are highly resistant to antimicrobial preparations, is growing.

The objective of this work was to study the range, persistence level and antibiotic susceptibility of opportunistic microorganisms of periodontal tissues affected by inflammatory periodontal diseases. Biological sampling from the oral cavities of patients suffering from generalized levels II and III periodontitis was performed with the use of a sterile applicator in transport tubes (AMIES). The material was inoculated onto nutrient media by sector inoculation according to Gold, with the use of differentially diagnostic nutrient media (Himedia), with subsequent identification with the help of Erba Lachema test systems (Czechia). The antibiotic susceptibility of bacteria and microscopic fungi was identified by disk diffusion test, according to EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) recommendations.

The quoted results and data of our previous studies indicate to a high level of persistence of antibiotic-resistant opportunistic microorganisms in the periodontal tissues of patients suffering from periodontitis. The opportunistic microorganisms were isolated from the nidus of the inflammatory process in clinically significant titres (10^4 - 10^{12} CFU/ml). The most frequently bacteria were *Staphylococcus sp.* – 25.7%, *Streptococcus sp.* – 22.7%; at the same time, the total percentage of *Enterobacteriaceae* genus microorganisms equalled to 36.1%. Bacterial associations were identified in 22 patients, out of the 38 examined (57.9% cases). When associations were isolated, clinical manifestations of the diseases were more pronounced.

The study of bacterial susceptibility to antibiotics proved the highest level of resistance to unprotected first generation beta-lactams, macrolides, tetracyclines, and cephalosporins. The obtained data are an important stage of the correct strategy for antimicrobial therapy against periodontitis, and they show an exceptional need to perform analysis of antibiotic susceptibility in case of the rational application of antimicrobial preparations to treat inflammatory periodontal diseases.

Key words: antibiotic resistance, opportunistic microorganisms, oral (cavity) microbiota.

Рецензент – проф. Небесна З. М.
Стаття надійшла 10.01.2021 року