

УДК: 579. 61:616-078

Фаустова М.О.

ВИВЧЕННЯ БІОПЛІВКОУТВОРЮЮЧИХ ТА АДГЕЗИВНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ *KOCURIA SPP*

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Етіопатогенетичним чинником інфекційно-запальних захворювань слизових оболонок порожнини рота є формування бактеріальних біоплівочок умовно-патогенними мікроорганізмами. Саме тому, вивчення перебігу запальних процесів з урахуванням особливостей адгезивності та біоплівкоутворення їх домінуючих збудників сприяє перегляду та вдосконаленню до сьогодні відомих методів профілактики та лікування даних захворювань. Метою даного дослідження було вивчення адгезивних та біоплівкоутворюючих властивостей клінічних штамів *K. kristinae*, виділених з порожнини рота пацієнтів з інфекційно-запальними захворюваннями слизових оболонок. Матеріали та методи дослідження. Об'єктом дослідження стали 18 клінічних штамів *K. kristinae*, виділені від обстежених хворих. Адгезію досліджуваних мікроорганізмів визначали на формалізованих еритроцитах людини групи крові O (1) Rh+ за методикою Бріліса. Адгезивні властивості оцінювали за допомогою індексу адгезивності мікроорганізмів. Вивчення біоплівкоутворюючих властивостей клінічних ізолятів *K. kristinae* визначали за допомогою спектрофотометричного методу за G.D. Christensen. Властивості мікроорганізмів утворювати біоплівку оцінювали за ступенем поглинання барвника у одиницях щільності. Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою стандартних пакетів програм "STATISTICA+" та "Microsoft Excel 2010". Наявність зв'язку між адгезивністю та біоплівкоутворенням штамів *K. kristinae* оцінювали за коефіцієнтом кореляції (r-Пірсона). Результати. Представники роду *Kocuria* виділяють у 70% пацієнтів з інфекційно-запальними захворюваннями СОПР. Встановлено, що дані збудники володіють високими адгезивними та біоплівкоутворюючими властивостями. Коефіцієнт кореляції r-Пірсона між даними показниками штамів *K. kristinae* вказує на наявність прямої кореляційної залежності.

Ключові слова: *Kocuria spp.*, адгезія, біоплівкоутворення, запалення, слизова оболонка

Дана робота виконана в рамках НДР «Вивчення ролі умовно-патогенних та патогенних інфекційних агентів з різною чутливістю до антимікробних і противірусних препаратів у патології людини» (№ ДР 0118и004456).

Вступ

За сучасними даними представники нормальної мікрофлори порожнини рота налічують понад 700 видів. Сучасні дослідження з використанням молекулярно-біологічних методів, електронної мікроскопії та культивування бактерій дозволяють розширити знання про етіологічну структуру та патогенез захворювань порожнини рота [1,2].

Доведено, що мікроорганізми роду *Kocuria* зустрічаються на шкірних покривах та слизових оболонках у більше ніж 80% здорового населення. При чому, частіше штамми вказаних бактерій виділяють з різних відділів порожнини рота (48,7%) [3]. Останнім часом в закордонній літературі все частіше з'являються дані щодо зв'язку умовно-патогенних *Kocuria spp.* з розвитком тяжких септичних станів, менінгіту, ендокардиту, холециститу та остеомієліту у імунокомпрометованих осіб [4,5,6,7].

Згідно змін в таксономії і номенклатурі бактерії *Kocuria* – нова назва мікроорганізмів, які раніше відносився до *Micrococcus spp.* Однак, базуючись на філогенетичних та хемотаксономічних особливостях, виділили окремо рід *Kocuria* [1,2]. Тому закономірною є відсутність остаточних даних щодо їх біологічних властивостей, а, відповідно, і підходить до лікування інфекцій, викликаних *Kocuria spp.*

Безперечно, етіопатогенетичним чинником інфекційних захворювань порожнини рота є формування бактеріальних біоплівочок умовно-

патогенними мікроорганізмами на поверхнях твердих тканин зубів, слизових оболонках та ортопедичних конструкціях. Саме тому, вивчення перебігу запальних процесів з урахуванням особливостей адгезивності та біоплівкоутворення їх домінуючих збудників, сприяє перегляду та вдосконаленню до сьогодні відомих консервативних та хірургічних методів лікування даних захворювань, а також профілактиці їх розвитку [8,9,10,11].

Мета дослідження

було вивчення адгезивних та біоплівкоутворюючих властивостей клінічних штамів *K. kristinae*, виділених з порожнини рота пацієнтів з інфекційно-запальними захворюваннями слизових оболонок.

Матеріали та методи дослідження

У дослідженні було обстежено 20 пацієнтів середньої вікової групи за ВООЗ (середній вік 48±4 років) з інфекційно-запальними захворюваннями слизової порожнини рота (СОПР). Для вивчення аеробної та факультативно-анаеробної мікрофлори виконували забір матеріалу з поверхні СОПР за допомогою стерильного паперового ендодонтичного штифта стандартного розміру (№30), довжиною 1 см, з подальшим культивуванням та ідентифікацією. Заключена ідентифікація проводилась за допомогою автоматичного бактеріологічного аналізатора Vitec – 2compact bioMérieux (Франція).

Об'єктом дослідження стали 18 клінічних

штамів *K. kristinae*, виділені від обстежених хворих.

Адгезію досліджуваних мікроорганізмів визначали на формалізованих еритроцитах людини групи крові O (1) Rh+ за методикою Бріліса [12]. Адгезивні властивості оцінювали за допомогою індексу адгезивності мікроорганізмів (IAM) шляхом підрахунку середньої кількості мікробних клітин, що прикріпилися до одного еритроциту, який приймає участь у адгезивному процесі. Адгезивність вважали нульовою при IAM нижче 1,75, низькою – при IAE від 1,76 до 2,5, середньою – від 2,51 до 4,0, високою – вище 4,0.

Вивчення біоплівкоутворюючих властивостей клінічних ізолятів *K. kristinae* 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 з довжиною хвилі 570 нм. Здатність мікроорганізмів до утворення біоплівок оцінювали як низьку (ОЩ<0,120), середню (ОЩ = 0,121-0,239) та високу (ОЩ>0,240) [13].

Статистичний аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою стандартних пакетів програм "STATISTICA+" та "Microsoft Excel 2010". З метою визначення наявності зв'язку між адгезивністю та біоплівкоутворенням штамів *K. kristinae* визначали коефіцієнт кореляції (r-Пірсона), абсолютною величиною якого характеризували силу зв'язку.

Результати та їх обговорення

Результатами дослідження доведено етіологічне значення умовно-патогенних мікроорганізмів *Kocuria spp.* у розвитку інфекційно-запальних захворювань СОПР. Так, представники даного роду виділяли у 70% пацієнтів. Загальна частка клінічних ізолятів *Kocuria spp.* серед всіх виділених мікроорганізмів сягала 18,3%.

Значимість умовно-патогенних мікроорганізмів у розвитку інфекційних захворювань безпосередньо пов'язана з наявністю факторів патогенності, серед яких одним із найвагоміших є адгезія [10]. Адже саме адгезія запускає каскад імунологічно-опосередкованих реакцій, що визначають специфіку інфекційного процесу, і є його пусковим механізмом. Оскільки, долаючи захисні бар'єри макроорганізму збудники специфічно взаємодіють з клітинами слизових оболонок, шкіри, прикріплюючись до них [11].

Представники виду *K. kristinae* проявили високу здатність до адгезії на еритроцитах. Оскільки їх IAM складав $4,11 \pm 0,53$. При чому частка еритроцитів, що прийняли участь у адгезивному процесі ($61,67 \pm 7,63$ %) була досить високою і перевищувала половину досліджених (рис.1).

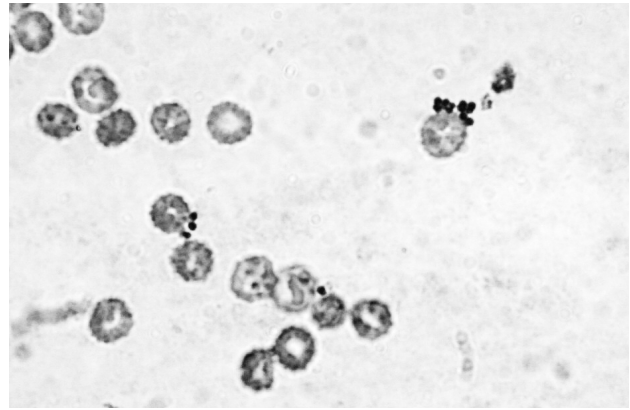


Рис. 1. Адгезія клінічних штамів *K. Kristinae* до еритроцитів людини. Забарвлення за Грамом. Збільшення: об'єктив x100, окуляр x10.

Встановлено, що клінічні штами *K. kristinae*, що колонізували СОПР пацієнтів, володіли високими властивостями утворювати біоплівки. Оптичні щільності біоплівок даних мікроорганізмів становили $0,241 \pm 0,09$ ОЩ протягом 24 годин культивування. При чому, їх біоплівкоутворення на другу добу експерименту закономірно збільшувалося ($0,267 \pm 0,08$ ОЩ).

Коефіцієнт кореляції r-Пірсона (+0,87) між адгезією та здатністю утворювати біоплівки ізолятів *K. kristinae* вказував на наявність прямої кореляційної залежності. Тобто, зі збільшенням IAM даних мікроорганізмів зростала їх здатність утворювати біоплівки.

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 [12,14,15].

Наявність специфічних протеїнів на поверхні бактеріальних клітин даних збудників, подібно іншим грампозитивним патогенам, обумовлює специфічне рецепторне з'єднання з клітинами організму людини, ініціюючи колонізацію тканин макроорганізму та біоплівкоутворення на їх поверхнях [13]. Тому високий показник адгезивності та здатності утворювати біоплівки є досить закономірним для представників *Kocuria spp.*

Висновки та перспективи

Представники роду *Kocuria* виділяють у пацієнтів з інфекційно-запальними захворюваннями СОПР з частотою до 70%.

Встановлено, що дані збудники володіють високими адгезивними та біоплівкоутворюючими властивостями. Коефіцієнт кореляції r-Пірсона між даними показниками штамів *K. kristinae* вказує на наявність прямої кореляційної залежності.

Отже, отримані дані розширяють уявлення про їх властивості та роль у розвитку інфекційно-запальних захворювань порожнини рота та сприяють перегляду тактики їх профілактики та лікування, враховуючи особливості домінуючої мікрофлори.

References

1. Ananieva MM, Faustova MO, Basarab IO, Loban G. A. *Kocuria rosea*, *kocuria kristinae*, *leuconostoc mesenteroides* as caries-causing representatives of oral microflora. *Wiad Lek.* 2017;70(2 pt 2):296-298.
2. Faustova MO, Ananieva MM, Basarab YO, Dobrobolska OV, Vovk IM, Loban GA. Bacterial factors of cariogenicity (literature review). *Wiad Lek.* 2018;71(2 pt 2):378-382.
3. Szczerba I. Occurrence and number of bacteria from the *Micrococcus*, *Kocuria*, *Nesterenkonia*, *Kytococcus* and *Dermacoccus* genera on skin and mucous membranes in humans. *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia.* 2003; 55(1): 67-74.
4. Aydin Malik, Rainer Ganschow, Martin Jankofsky. *Kocuria kristinae*-caused sepsis in an infant with congenital tufting enteropathy. *Turk J Pediatr.* 2017; 59(1): 93-96.
5. Kiling Adnan, et al. Maxillary Osteomyelitis Caused by *Kocuria* Species in a Patient Who Is on Long-Term Uncontrolled Use of Methylprednisolone. *Journal of Craniofacial Surgery.* 2018; 29(2): 118-120.
6. Gunaseelan Priyadarshini, et al. Native valve endocarditis caused by *Kocuria rosea* complicated by peripheral mycotic aneurysm in an elderly host. *Journal of postgraduate medicine.* 2017; 63(2): 135.
7. Oncel Eda Karadag, Meryem Seda Boyraz, Ates Kara. Black tongue associated with *Kocuria* (*Micrococcus*) *kristinae* bacteremia in a 4-month-old infant. *European journal of pediatrics.* 2012; 171(3): 593-593.
8. Faustova MO, Nazarchuk OA, Ananieva MM. Etiologichna struktura, biologichni vlastyvoli dominuyuchykh zbudnykiv peryimplantatnogo mukozytu [The etiological structure, biological properties of causative agents of peri-implant mucositis]. *Zaporozhye medical journal.* 2017; 5(104): 652-657. [Ukrainian]
9. Poli Pier Paolo, et al. Peri-implant mucositis and peri-implantitis: A Current understanding of their diagnosis, clinical implications, and a report of treatment using a combined therapy approach. *Journal of Oral Implantology.* 2017; 43(1): 45-50.
10. Kotsakis Georgios A, et al. Investigation of the association between cement retention and prevalent peri - implant diseases: a cross - sectional study. *Journal of periodontology.* 2016; 87(3): 212-220.
11. Jepsen Søren, et al. Primary prevention of peri - implantitis: Managing peri - implant mucositis. *Journal of clinical periodontology.* 2015; 42: 152-157.
12. Kushnareva MV, Khar'kova RM, Abrosimova NA. Metod opredelenyya vlyanyaya grudnogo moloka na adgezyvne svojstva mykroorganizmiv [A method of determining the effect of breast milk on the adhesive properties of microorganisms]. *Lab Delo.* 1990;(3):69-71. [Russian]
13. Christensen Gordon D, et al. 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.* 1985; 22(6): 996-1006.
14. Nazarchuk O, Faustova M. Mikrobiologichne doslidzhennya vlastyvostry grampozytyvnykh zbudnykiv infekcyjno-zapalnykh peryimplantacijnykh uskladnen [The microbiological investigation of the properties of gram-positive pathogens of infectious and inflammatory periimplantation complications]. *Reports of Vinnytsia National Medical University.* 2017;21(2):392-6. [Ukrainian]
15. Nazarchuk O, Faustova M. Bioplivkoutvoryuyuchi vlastyvoli klinichnykh shtamiv grampozytyvnykh mikroorganizmiv [Biofilm-producing properties of clinical strains of grampositive microorganisms]. *Biomedical and Biosocial Anthropology.* 2017; (29):7-10. [Ukrainian]

Реферат

ИЗУЧЕНИЕ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ И АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *KOCURIA SPP.*

Фаустова М.А.

Ключевые слова: *Kocuria spp.*, адгезия, биопленкообразование, воспаление, слизистая оболочка

Этиопатогенетическим фактором инфекционно-воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта является формирование бактериальных биопленок условно-патогенными микроорганизмами. Именно поэтому изучение течения воспалительных процессов с учетом особенностей адгезивности и биопленкообразования их доминирующих возбудителей способствует пересмотру и совершенствованию известных методов профилактики и лечения данных заболеваний. Целью данного исследования было изучение адгезивных и биопленкообразующих свойств клинических штаммов *K. kristinae*, выделенных из полости рта пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями слизистых оболочек. Материалы и методы исследования. Объектом исследования стали 18 клинические штаммы *K. kristinae*, выделенные от обследованных больных. Адгезию исследуемых микроорганизмов определяли на формализованных эритроцитах человека группы крови O (1) Rh + по методике Брилиса. Адгезивные свойства оценивали с помощью индекса адгезивности микроорганизмов. Изучение биопленкообразующих свойств клинических изолятов *K. kristinae* определяли с помощью спектрофотометрического метода по G.D. Christensen. Свойства микроорганизмов образовывать биопленки оценивали по степени поглощения красителя в единицах плотности. Статистический анализ полученных результатов осуществляли с помощью стандартных пакетов программ "STATISTICA +" и "Microsoft Excel 2010". Наличие связи между адгезивностью и биопленкообразованием штаммов *K. kristinae* оценивали по коэффициенту корреляции (r-Пирсона). Результаты. Представители рода *Kocuria* выделяют у 70% пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями слизистых оболочек полости рта. Установлено, что данные возбудители обладают высокими адгезивными и биопленкообразующими свойствами. Коэффициент корреляции r-Пирсона между данными показателями штаммов *K. kristinae* указывает на наличие прямой корреляционной зависимости.

Summary

INVESTIGATION OF BIOFILM-FORMING AND ADHESIVE PROPERTIES OF CLINICAL STRAINS *KOCURIA SPP*

Faustova M.O.

Key words: *Kocuria spp.*, adhesion, biofilm formation, inflammation, mucous membrane

The etiopathogenetic factor of infectious inflammatory diseases of the oral mucous membranes is the formation of bacterial biofilms by opportunistic microorganisms. Therefore studying the course of inflammatory processes taking into account the characteristics of adhesion and biofilm formation by their dominant pathogens contributes to the revision and improvement of the known methods in prevention and treatment of these diseases. The purpose of this study was to investigate the adhesive and biofilm-forming properties of clinical strains of *K. kristinae*, isolated from the oral cavity of patients with infectious inflammatory diseases of

the mucous membranes. Materials and methods. The objects of the study were 18 clinical strains of *K. kristinae*, isolated from the examined patients. Adhesion of the studied microorganisms was evaluated on the formalized human red blood cells of the blood type O (1) Rh + by the Brilliss technique. Adhesive properties were evaluated by adhesion index of microorganisms. The study of bio-film-forming properties of clinical isolates of *K. kristinae* was performed by using the spectrophotometric method of G.D. Christensen. Properties of microorganisms to form a biofilm were evaluated by the degree of absorption of the dye in units of density. The statistical analysis of the findings obtained was carried out by standard "STATISTICA +" and "Microsoft Excel 2010" software packages. The relationship between adhesiveness and biofilm formation of *K. kristinae* strains was assessed by the correlation coefficient (r-Pearson). Results. Representatives of the genus *Kocuria* are found in 70% of patients with infectious-inflammatory diseases of oral mucous membrane. It has been established that these pathogens possess high adhesive and biofilm-forming properties. The coefficient of correlation r-Pearson between these indices of *K. kristinae* strains indicates direct correlation dependence.

УДК 616.31-002.-/007.17-06:618.15-022.7]-036.4-08

Шульженко А.Д.

КЛІНІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ ЛІКУВАННЯ ЗАПАЛЬНИХ ТА ЗАПАЛЬНО-ДИСТРОФІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ПАРОДОНТА ЖІНОК ІЗ БАКТЕРІАЛЬНИМ ВАГІНОЗОМ У НАЙБЛИЖЧІ ТЕРМІНИ СПОСТЕРЕЖЕННЯ

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

*Запальні, запально-дистрофічні хвороби пародонта зазвичай виявляються на тлі загальносоматичних патологій. Урогенітальні патології, особливо дисбіотичні стани статевого тракту, вкрай рідко взаємопов'язують з патологіями пародонта. В той час як пародонтит і бактеріальний вагіноз поєднують спільність хвороботворного фактору (біоплівковій інфекції), висока розповсюдженість, особливості патогенезу, хронізація, та рецидивність. Окрім того, зовсім відсутні протоколи курації стоматологічних пацієнтів із дисбіозами генітального тракту, в тому числі жінок із бактеріальним вагінозом. Мета. Клініко-лабораторна оцінка ефективності нового запатентованого комплексу лікування запальних та запально-дистрофічних захворювань тканин пародонта жінок із бактеріальним вагінозом. Матеріали і методи. Було обстежено 54 пацієнтки репродуктивного віку (18-45 років) з бактеріальним вагінозом. Обстежені особи розподілені на 2 групи в залежності від призначеної схеми лікування. Проведена індексна оцінка стану пародонта за допомогою індексів РМА та КПІ за Леусом, аміно-тест ротової рідини. Також досліджена ротова рідина на вміст *slgA* до лікування, на 14 та 28 день після початку лікування. Результати. Одним із критеріїв ефективності лікування є період ліквідації запального процесу в тканинах пародонта. На 14-й день зникнення клінічних ознак запалення ясен серед осіб I групи діагностовано у 46,2% (12 жінок), у II групі – у 75% (21 жінка), на 28 добу аналогічний результат діагностовано у 84,6% (22 жінки) та 96,4% (27 жінок), відповідно. Також відмічено зниження показників РМА у пацієнток I групи у 1,6 рази порівняно із показниками до лікування, тоді як в осіб II групи – у 3,8 рази. Кількісні показники аміно-тесту осіб I групи на 14-й день знизились у 1,67, а на 28-й день – у 1,68 рази. У представників II групи на 14-ту добу інтенсивність реакції знизилась у 5,9 рази та залишалась сталою до 28-го дня. На 28-у добу після проведеного лікування концентрація *slgA* прийшла до норми в обох групах жінок, але результат пацієнток II групи був достовірно вищим у 1,3 рази порівняно із результатами аналогічного обстеження жінок I групи. Висновок. Отримані результати дають змогу констатувати, що у пацієнток, яких лікували за запропонованим протоколом, клінічні явища запалення ясен зникали на 14 днів раніше, ніж у жінок, яким призначається традиційний курс лікування.*

Ключові слова: бактеріальний вагіноз, аміно-тест, гінгівіт, пародонтит.

Зазначений фрагмент роботи входить до прикладної НДР, що виконується за рахунок коштів державного бюджету, НДІ генетичних та імунологічних основ розвитку патологій та фармакогенетики Української медичної стоматологічної академії «Механізми впливу хвороботворних факторів на стоматологічний статус осіб із соматичною патологією, шляхи їх корекції та блокування» (№ ДР 0115 У001138) 2015-2018рр.

Вступ

Загальноновизнаним є той факт, що всі слизові оболонки в організмі поєднані в єдину систему, яка формує мікробіом людини з певною колонізаційною резистентністю та спільною системою місцевого імунітету слизових оболонок. Тому стан слизових оболонок відкритих порожнин слід розглядати у тісному взаємозв'язку, особливо в аспекті їх перехресного інфікування, що є актуальним та мало вивченим.

Запальні, запально-дистрофічні хвороби пародонта зазвичай виявляються на тлі загальносоматичних патологій. Урогенітальні патології, особливо дисбіотичні стани статевого тракту, вкрай рідко взаємопов'язують з патологіями пародонта. В той час як пародонтит і бактеріальний вагіноз (БВ) поєднують спільність хвороботворного фактору (біоплівковій інфекції), висока розповсюдженість, особливості патогенезу, хронізація та рецидивність [1,2,3,4]. Окрім того зовсім