

© Русин В.В., Потапчук А.М., Петров В.О., Белей О.Л., Бойко Н.В.

УДК: 616.31:615.32.035

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ БАЦИЛЯРНИХ БІОПРЕПАРАТІВ У СТОМАТОЛОГІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

Русин В.В., Потапчук А.М., Петров В.О., Белей О.Л., Бойко Н.В.

Ужгородський національний університет, медичний факультет, кафедра мікробіології, вірусології, імунології з курсом інфекційних хвороб (вул. Підгірна 46, м. Ужгород, Україна, 88000)

Резюме. В роботі наведено результати експериментальної оцінки антибактеріальної ефективності застосування нових антисептичних гомеопатичних препаратів на основі перстачу прямостоячого Аквапарагель і Парагель у порівнянні з класичними антибіотиками з метою попередження післяопераційних ускладнень в хірургічній стоматології. Досліджено етіологічно значимі мікроорганізми - збудники гнійних процесів, що виникають після екстракції зубів. Показано переважання представників кокової мікрофлори, зокрема стафілококів та стрептококів. При тестуванні їх відношення до антибіотиків, виявлено стійкість до препаратів цефалоспоринового ряду, тетрациклінів і чутливість до захищених цефалоспоринів та аміноглікозидів. Апробовано *in vitro* альтернативний метод профілактики гнійних ускладнень після екстракції зубів шляхом використання активних основ бацилярних біопрепаратів Моноспорино-ПК та Біоспорино (штамів *Bacillus subtilis* і *B. licheniformis*).

Ключові слова: Аквапарагель, Парагель, ротова порожнина, мікроорганізми, пробіотики, дисбіоз, *B. subtilis*.

Вступ

Результати дослідження чутливості ряду патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів, у тому числі і збудників інфекційних процесів ротової порожнини, до антибіотиків свідчать про зростання числа резистентних штамів. Нові синтетичні препарати, захищені від дії бактеріальних β -лактамаз переважно клавулановою кислотою, на відміну від класичних, є високоефективними, однак їхнє призначення обмежене з огляду на сумнівну доцільність систематичного застосування антибіотиків для запобігання виникнення локально ранової інфекції [Sancho-Puchades et al., 2009]. До того ж ці препарати легко адсорбуються на слизових поверхнях і, відповідно, характеризуються високою проникністю. Не дивлячись на справді широкий асортимент оральних антисептиків, що досить успішно застосовуються в оперативній стоматології для місцевого знезараження, пошук нешкідливих високоактивних превентивних засобів природного походження залишається актуальним.

Метою нашої роботи було дослідження протимікробних властивостей класичних і нових антибіотиків у порівнянні з біологічними препаратами, зокрема оральними антисептиками на основі екстрактів перстачу прямостоячого - Аквапарагель і Парагель, та біопрепаратів із бацил - Моноспорино-ПК і Біоспорино.

Матеріали та методи

Забір матеріалу для мікробіологічних досліджень здійснювали за допомогою стерильних ватних тампонів із транспортним поживним середовищем безпосередньо з лунки після екстракції зуба. Висів матеріалу проводили на селективні і хромогенні середовища з паралельним культивуванням на рідкому поживному середовищі

(цукровим бульйоном). Титр ізольованих бактерій у кожній пробі визначали за кількістю колонієутворюючих одиниць в 1 мл (КУО/мл). Посіви інкубували впродовж 24-48 год. при температурі 37°C в термостаті, анаероби - в анаеростаті "Invitrogen" (при 37 °C впродовж 5-7 діб). Для ідентифікації бактерій використовували напівавтоматичні методи біохімічної діагностики за допомогою ентротест, API-тест і LANEМА-тест систем [Скала и др., 2004]. Ізольовані нами грампозитивні коки було додатково тестовано на наборах для Latex-test (BIO-RAD, USA). *S.aureus* від інших виділених штамів стафілококів диференціювали за наявністю плазмокоагулази та за допомогою Pastorex Staph тесту. Належність *Streptococcus* до серологічної групи Lancefield визначали шляхом використання специфічних імунних сироваток (Pastorex Strep), CAMP-тесту, оптохінового тесту та тесту з жовчю.

Із проб матеріалу, взятого із лунки видаленого зуба, одночасно з посівом, виготовляли мазки, фарбували їх по Граму і мікроскопували під імерсійним об'єктивом. Проводили також посів матеріалу та кількісну оцінку росту різних мікроорганізмів, що виростили при первинному посіві на щільних поживних середовищах, тобто визначали загальне мікробне число (ЗМЧ). Для ідентифікації анаеробних мікроорганізмів використовували систему Мікро-Ла-Тест Анаеро23. Інкубацію здійснювали в строго анаеробних умовах від 24 до 48 год. Оцінку результатів реакції проводили за кольоровою шкалою в цифровому виразі за відповідним програмним забезпеченням.

Всі виділені нами штами мікроорганізмів досліджували на чутливість до дії сучасних антибіотиків, а також дезінфікуючих речовин Аквапарагель та Пара-

Таблиця 1. Чутливість виділених мікроорганізмів до антибіотиків (зона затримки росту, мм).

№ з/п	Антибіотики	Скорочення	S. pyogenes	S. pneumoniae	S. salivarius	S. epidermidis	S. aureus	S. haemolyticus	S. saprophyticus	Enterobacteriaceae
1	Лінкоміцин	ЛІН	10	0	0	0	0	12	6	0
2	Ванкоміцин	ВА	10	10	8	0	22	10	20	10
3	Амоксицилін	АМО	5	14	6	0	12	14	16	14
4	Цефтріаксон	ЦФА	10	0	0	0	0	0	0	11
5	Цефалексин	ЦФЛ	0	0	0	12	0	0	0	0
6	Оксацилін	ОКС	0	0	0	0	22	0	0	0
7	Гонтаміцин	ГЕН	15	8	17	12	21	8	8	8
8	Канаміцин	КАН	0	10	11	0	0	0	10	10
9	Доксациклін	ДОК	0	0	0	14	21	0	0	0
10	Цефотаксим	ЦФТ	0	10	0	10	22	10	10	10
11	Еритроміцин	ЕРИ	0	0	0	10	0	0	0	0
12	Цефазолін	ЦФЗ	0	10	0	6	0	10	10	10
13	Ципрофлоксацин	ЦИП	22	18	0	16	22	18	18	18
14	Азитроміцин	АР	14	0	0	0	0	0	0	0
15	Пеніцилін	ПЕН	6	0	0	0	20	0	0	0
16	Офлоксацин	ОФЛ	0	0	0	20	10	0	0	0
17	Рифампіцин	РИФ	0	12	4	0	20	12	12	12
18	Ломефлоксацин	ЛОМ	21	10	0	20	24	10	10	10
19	Ампіцилін	АМП	0	0	0	0	0	0	0	0
20	Фурагін		10	20	26	14	20	20	20	20
21	Стрептоміцин	СТР	9	8	18	0	14	8	8	8
22	Олеандоміцин	ОЛЕ	0	0	0	18	0	0	0	0
23	Цефуроксим	ЦФР	12	25	0	14	20	25	25	25
24	Амікацин	АМК	0	20	20	0	0	20	20	20
25	Тетрациклін	ТЕТ	0	0	0	0	0	0	0	0
26	Цефтазидім	ЦФД **	6	8	14	10	14	15	16	17
27	Цефтазидім/ Клавулонат	СІ 50	21	22	15	10	20	20	16	17
28	Цефоперазон	ЦФП	17	0	20	0	24	0	0	0
29	Цефамандол	ЦМЛ	0	0	0	16	0	0	0	0
30	Цефокситим	ЦФК	0	14	0	14	21	14	14	14
31	Меропенем	МПН	16	20	10	0	30	20	20	20
32	Пефлоксацин	ФЛО	0	20	0	0	0	20	20	20
33	Сизоміцин	СИЗ	0	0	25	0	16	0	0	0

гель. Чутливість виділених бактерій до антибіотиків визначали дифузійним методом Бауера-Кірбі [Егоров, 1965; Серия технических докладов ВОЗ, 1984] з використанням диспенсеру для автоматичного нанесення дисків. Додатково вивчали ефективність дії стосовно ізольованих бактерій альтернативних до зазначених хіміотерапевтичних засобів препаратів, а саме: полівалентного бактеріофагу та пробіотиків на основі бактерій роду *Bacillus* - Моноспорину-ПК (*B.subtilis* 090) та Біоспорину (*B.subtilis* і *B.licheniformis*). Антибактеріальні властивості активних основ біопрепаратів Біоспорину та Моноспорину встановлювали в експериментах *in vitro*. Методом відстроченого антагонізму за Егоровим визначали чутливість досліджуваних тест-штамів за наявністю зон затримки x росту [Егоров, 1965]. Даний метод є лише скринінговим для попереднього виявлення наявності антагоністично активності біопрепаратів сто-

совно бактерій - ізолятів; остаточні висновки про результативність дії обраних біопрепаратів нами зроблено на підставі аналізу змін титрів культур, ізольованих із зубних лунок, внаслідок x сумісного попарного культивування із пробіотичними штамми бацил. Як поживне середовище для сумісного культивування використовували м'ясопептонний бульйон (МПБ). Динаміку росту і розмноження бактерій фіксували за оптичною густиною, що визначали за допомогою денситометру МакФарленда із наступним розсівом серії десятикратних розведень суспензій у чашки Петрі з м'ясопептонним агаром (МПА) і відповідними селективними середовищами для кожного із тестованих видів

до 5 доби культивування включно. Ефективність застосування рідкого дезінфектанту Аквапарагель також визначали методом сумісного культивування (кількісний аналіз), тоді як антибактеріальні властивості препарату Парагель досліджували шляхом його додавання у агаризоване поживне середовище (якісна оцінка дієвості).

Всі мікробіологічні методи дослідження виділень ротово порожнини було адаптовано до наказу МОЗ № 353 "Про уніфікацію мікробіологічних методів дослідження, що застосовуються в клініко-діагностичних лабораторіях" [Наказ МОЗ №353, 2006]. Особливістю даного виду досліджень є те, що в біоматеріалі переважає наявність декількох видів мікроорганізмів.

Для статистично та графічно обробки одержаних даних використано комп'ютерні програми STATISTICA (Stat-Soft, Inc.) версії 6 і Origin (OriginLab Corporation) версій 6-8.

Таблиця 2. Чутливість виділених мікроорганізмів до різних концентрацій Парагелю (якісне визначення).

№ з/п	Парагель	Експозиція розчину	Streptococcus pyogenes	Streptococcus pneumoniae	Streptococcus salivarius	Staphylococcus epidermidis	Staphylococcus aureus	Staphylococcus haemolyticus	Staphylococcus saprophyticus	Candida albicans	Enterobacteriaceae
1	Парагель 1 г	контроль	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2		18 год.	+	+			+			+	+
3	Парагель 2 г	контроль	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4		18 год.	+				+			+	+
5	Парагель 0,1 г	контроль	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6		18 год.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Вихідний титр		$2 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^6$

Примітка: "+" означає наявність росту тест-культури на середовищі, що містить різні концентрації Парагелю, відповідно "-" означає відсутність росту мікроорганізмів.

Результати. Обговорення

На слизовій оболонці та у післяекстракційній лунці нами виявлено полібактеріальну асоціацію аерофільних і анаеробних мікроорганізмів. У всіх обстежених пробах переважала кокова мікрофлора, зокрема стрептококи було знайдено у 90 відсотків проб, стафілококи у 60%, ентеробактерії - у 30%, а мікроскопічні гриби роду *Candida* і бактеродиди (*Bacteroides ovatus* і *B. distasonis*) - відповідно у 10-20%. Стрептококи були представлені в основному видами *Streptococcus salivarius*, *S. agalacticae*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*. Стафілококи належали до родів *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis* і *S. haemolyticus*.

Найбільшою чутливістю до дії тестованих антибіотиків характеризувались штами *S. haemolyticus* і *S. epidermidis* (табл. 1). Такі антибіотики, як левоміцетин, еритроміцин, тетрацилін, ампіцилін, лінкоміцин і навіть гентаміцин, цефалоксин і оксацилін не виявляли антибактеріальну ефективність по відношенню до домінуючої мікрофлори лунки. Зокрема *S. pyogenes* був чутливим лише до ципрофлоксацину і цефтазидиму (клавулонату), *S. pneumoniae* - до цефуроксиму, амікацину, цефтазидиму (клавулонату), меропенему і пefлоксацину; *S. salivarius* - до фурагіну, амікацину, цефоперазону і сизоміцину, *S. epidermidis* і *S. haemolyticus* - як і *S. saprophyticus* виявляли резистентність до більшості тестованих антибіотиків, на відміну від штаму *S. aureus* - який не належить до метицилін чи ванкоміцин-резистентних культур, оскільки є чутливим до 15 із 33 тестованих антибіотиків.

Штами ентеробактерій, ізольовані з вмісту лунки зуба безпосередньо після його екстракції, були чутливими до фурагіну, цефуроксиму, амікацину, меропенему і пefлоксацину. Найбільшою антибактеріальною ефективністю стосовно усіх ізолятів характеризувався ципрофлоксацин, фурагін, амікацин, цефтазидим (клавулонат) і меропенем.

Дані про антибактеріальні властивості інших тестованих нами препаратів (Аквапарагель, Парагель, Біоспорину, Моноспорину-ПК і полівалентних фагів) наведені нами відповідно в табл. 2 та на рис. 1-3.

Аквапарагель характеризувався максимальним антагоністичним впливом у концентрації 2 робочих дози (РД) через 30 хв. після його внесення, 1 РД забезпечувала дещо нижчу ефективність дії (титр бактерій і *Candida albicans* був вищий на 2-3 порядки). Відновлен-

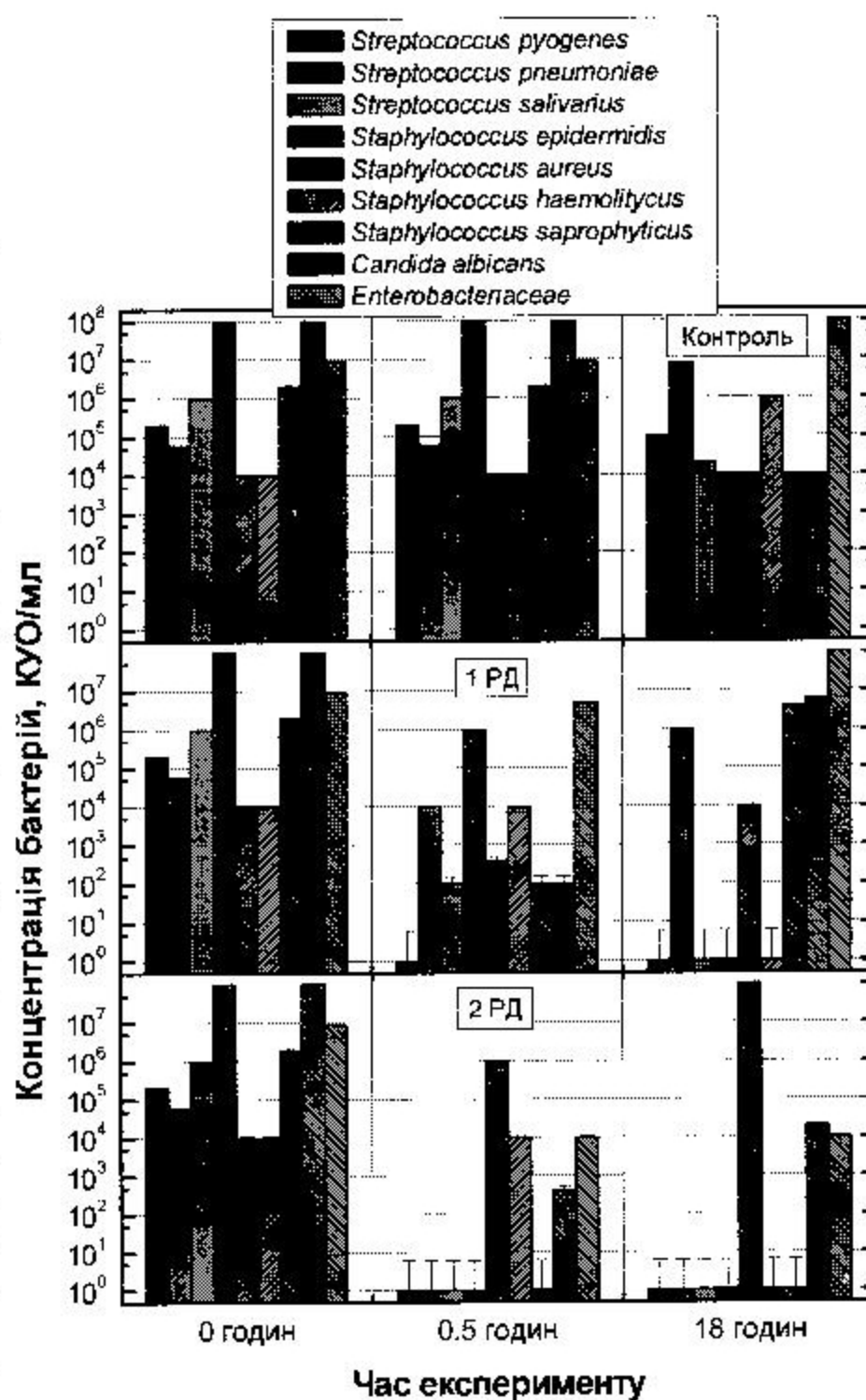


Рис. 1. Антибактеріальні властивості дезінфектантів рослинного походження: Аквапарагель (рідкий).

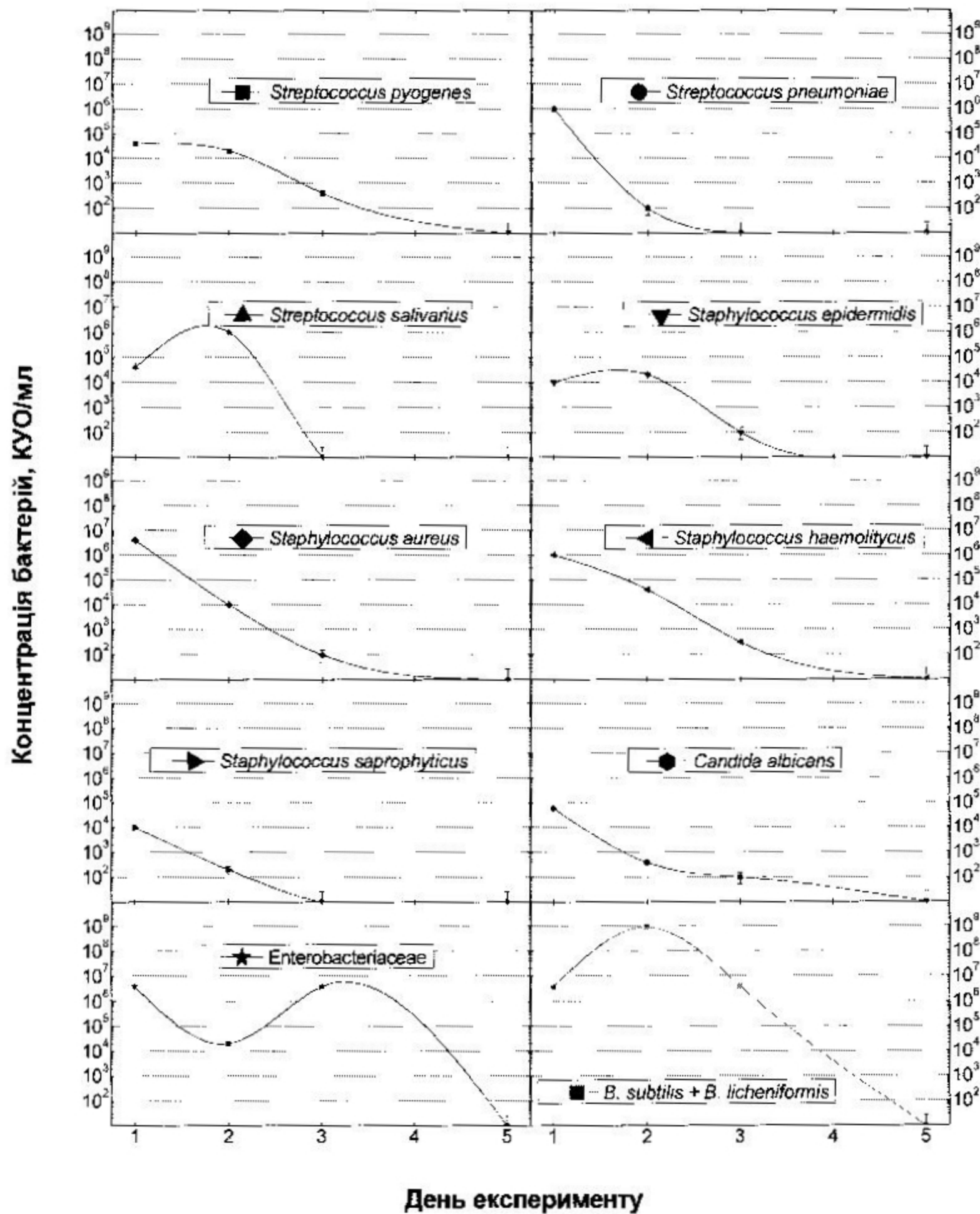


Рис. 2. Антибактеріальні властивості біопрепарату Біоспорин (*B. subtilis* і *B. licheniformis*) стосовно ізолюваних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів.

ня росту деяких мікроорганізмів свідчить про наявність скоріше бактеріостатично, ніж бактерицидно дії (зокрема стосовно культур *S. aureus*). На 18 год. експерименту спостерігали подальше зменшення титрів деяких тест культур бактерій. Парагель виявляв найбільшу ефективність стосовно штамів *S. salivarius*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* і *S. saprophyticus* в концентрації 1г, в дозі 2 г даний антисептик діяв інгібуюче в тому числі і на *S. pneumoniae*. Дезінфектант, взятий в концентрації 0,1 г, не виявляв жодної ефективності по відношенню до

усіх тестованих мікроорганізмів. *C. albicans* і представники родини Enterobacteriaceae були стійкими до дії зазначених дезінфектантів, взятих у всіх тестованих дозах. Антибактеріальні властивості біопрепаратів Біоспорину і Моноспорину-ПК засвідчили більшу ефективність застосування останнього за умов сумісного культивування із зазначеними штамми ізолятів лунок. При застосуванні Біоспорину титри зменшувались повільніше (до 3-5 доби включно), тоді як використання Моноспорину-ПК уже на 3-тю добу зумовлювало пригнічення росту усіх тестованих штамів мікроорганізмів, у тому числі і *C. albicans*. Взяті в експеримент пробіотичні препарати характеризуються більш виразною дієвістю стосовно грампозитивно коково мікрофлори, і нижчою - стосовно ентеробактерій.

Нарешті, всі без винятку мікроорганізми були резистентними до дії полівалентних бактериофагів.

Так, при проведенні експериментів із Секстифагом, не відмічено затримки росту чи утворення зон лізису (бляшок) бактеріальних культур, що в свою чергу свідчить про повну відсутність чутливості до тестованих бактериофагів.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Більшість ізолюваних бактерій характеризувались

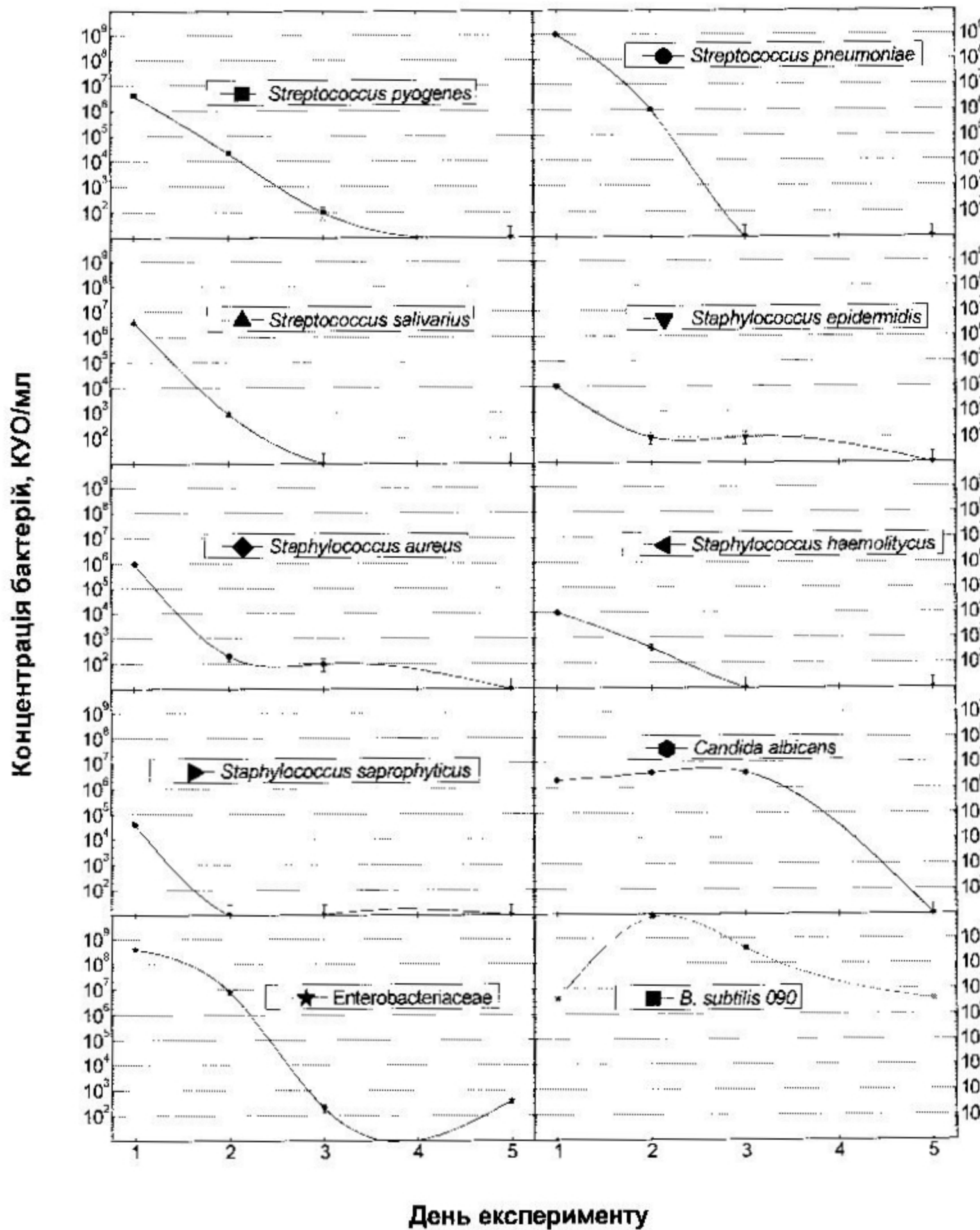


Рис. 3. Антибактеріальні властивості біопрепарату Моноспорин-ПК (*B. subtilis* 090) стосовно ізолюваних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів.

виразною стійкістю до тестованих антибіотиків, що ставить під сумнів можливість їх регулярного призначення і застосування для запобігання рановій інфекції. Ефективність Аквапарагелю була більш значною за умо-

визначення умовно-патогенними мікроорганізмами, у тому числі і в першу чергу штамми, резистентними і помірно-резистентними до дії сучасних антибіотиків.

Література

Бойко Н.В. Коменсальна мікрофлора слизових оболонок в процесах модуляції профілактичних та імунних властивостей організму / Н.В. Бойко // Бюлетень "Ветеринарна біотехнологія". - 2008. - Т. 2, № 13. - С. 7-

23.

Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н.С. Егоров. - М.: Высшая школа, 1965. - 211 с.

Критерии для интерпретации результатов испытаний, основанных на методе Бауэр-Кирби / Серия технических докладов ВОЗ. - Женева. - 1984. - № 873. - С. 147-189.

Наказ МОЗ № 353 "Про уніфікацію

ви його використання у концентрованому вигляді. Ізолювані нами штами ентеробактерій проявляли стійкість до дії обох дезінфектантів, взятих у всіх тестованих дозах.

2. Важлива роль як протиінфекційним засобам належить гомеопатичним та бактеріальним біопрепаратам. Виразні антибактеріальні властивості Біоспорину і Моноспорину-ПК доводять перспективність їх локального застосування як превентивних проти-запальних засобів.

Враховуючи численні літературні дані про здатність досліджуваних штамів бацил стимулювати локально клітинну і гуморальну імунну відповідь організму [Бойко, 2008; Hoa et al., 2000; Cebra et al., 2005], можна вважати перспективним подальше вивчення (*in vivo* та *in situ*) їх перспективності застосування як альтернативних засобів протидії (чи попередження виникнення) запальних процесів при невідкладному протезуванні, що мо-

- мікробіологічних методів дослідження, що застосовуються в клініко-діагностичних лабораторіях" / Збірник нормативних документів - К.: МНІАЦ - 2006. - Т 2. - 370 с.
- Скала Л.З. Практические аспекты современной клинической микробиологии / Л.З. Скала, С.В. Сидоренко, А.Г. Нехорошева. - М.: Триада, 2004 - 310 с.
- Antibiotic prophylaxis to prevent local infection in Oral Surgery: use or abuse? / [M. Sancho-Puchades, J.M. Herraiz-Vilas, L. Berini-Aytes, C. Gay-Escoda] // Med Oral Patol Oral Cir Bucal. - 2009. Vol. 1. - 14. - P. 28-33.
- Characterization of Bacillus species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders / [N.T. Hoa L. Baccigalupi, A. Huxham et al.] // Appl. Environ. Microbiol. - 2000. - Vol. 66. - P. 5241-5247.
- The role of mucosal microbiota in the development, maintenance, and pathologies of the mucosal immune system / [J.J. Cebra, H.-Q. Jiang, N. Boyko, H. Taskalova-Hogenova] // In Mucosal Immunology, 3rd edition. - Elsevier Press, 2005. - P. 335-368.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАЦИЛЛЯРНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ В СТОМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Русин В.В., Потапчук А.М., Петров В.А., Белей О.Л., Бойко Н.В.

Резюме. В статье приведены результаты экспериментальной оценки антибактериальной эффективности применения новых антисептических гомеопатических препаратов на основе перстача равностоячейо Акваларгель и Паргель в сравнении с использованием классических антибиотиков с целью предупреждения послеоперационных осложнений в хирургической стоматологии. Исследованы этиологически значимые микроорганизмы - возбудители нагноительных процессов, возникающих вследствие экстракции зубов. Показано преобладание представителей кокковой микрофлоры, в частности стафилококков и стрептококков. При изучении их отношения к антибиотикам, обнаружено устойчивость к препаратам цефалоспоринового ряда, тетрациклину, и чувствительность к защищенным цефалоспорином и аминогликозидам. Апробирован *in vitro* альтернативный метод профилактики гнойных послеэкстракционных осложнений путем использования активных оснований бациллярных биопрепаратов Моноспорина-ПК и Биоспорина (штаммов *Bacillus subtilis* и *B. licheniformis*).

Ключевые слова: Акваларгель, Паргель, ротовая полость, микроорганизмы, пробиотики, дисбиоз, *B. subtilis*.

PROSPECTS OF THE BACILLI BASED BIOPREPARATIONS' IMPLEMENTATION IN THE DENTAL PRACTICE

Rusyn V.V., Potapchuk A.M., Petrov V.A., Beley O.L., Boyko N.V.

Summary. The results of preliminary experimental estimation of the antibacterial efficacy of implementation of new antiseptic homeopathic biological preparations based on the *Potentilla erecta* - Aquagel and Paragel in comparison to the classic antibiotics usage in order to prevent the postoperative complications in surgical dentistry had been presented. Etiologically significant microorganisms - agents of the purulent processes followed to the tooth extracts had been investigated. Predominant occupation with cocci microflora representatives, particularly staphylococci and streptococci, has been shown. Investigation of their relations with antibiotics demonstrated resistance to the cephalosporin preparations, and tetracycline, and susceptibility to covered cephalosporin and aminoglycosides. The alternative method of prophylactic of purulent complications by the way of bacilli (*Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*) based biopreparation - Monosporyn-ПК and Biosporyn implementations had been probed *in vitro*.

Key words: Aquaparagel, Paragel, oral cavity, microorganisms, probiotics, dysbiosis, *B. Subtilis*.
