



Експериментальна оцінка антибактеріальної ефективності сучасних біопрепаратів на мікрофлору постекстракційних лунок зубів на етапі іммедіат-імплантації

Experimental Estimation of the Antibacterial Efficiency of Modern Biological Preparations on the Microflora of Postextractional Tooth Sockets During the Stage of Immediate Implantation

Резюме 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, однак чутливість до захищених цефалоспоринів та аміноглікозидів. Апробовано *in vitro* альтернативний метод профілактики гнійних ускладнень після екстракції зубів шляхом використання активних основ бацилярних біопрепаратів Моноспорину-ПК та Біоспорину (штамів *Bacillus subtilis* і *B. licheniformis*).
Summary Etiologically significant microorganisms – the agents of the purulent processes following the tooth extraction have been investigated. Predominant occupation with cocci microflora, particularly staphylococci and streptococci, has been demonstrated. While investigating their relations with antibiotics the resistance to the cephalosporin preparations, and tetracycline has been revealed, however, the susceptibility to covered cephalosporin and aminoglycosides has also been discovered. The alternative method of the prophylaxis of purulent complications by means of using bacilli (*Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*) based biopreparation – Monosporyn-PK and Biosporyn has been probed *in vitro*.

Ключові слова порожнина рота, мікроорганізми, антибіотики, пробіотики, дисбіоз, *B. subtilis*
Key words oral cavity, microorganisms, antibiotic, probiotics, dysbiosis, *B. subtilis*

Вступ

Незважаючи на широку палітру антибактеріальних засобів на ринку України, число післяопераційних ускладнень гнійно-запального характеру щелепно-лицевої ділянки нестримно зростає. Результати дослідження чутливості ряду патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів до антибіотиків, у тому чис-

лі і збудників інфекційних процесів щелепно-лицевої ділянки, 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 виникненню локальної ранової інфекції [9]. До того ж ці препарати легко адсорбуються на слизових поверхнях і, відповідно, характеризуються високою проникністю. Незважаючи на справді широкий асортимент оральних антисептиків, що досить успішно застосовуються в оперативній стоматології для місцевого знезараження, пошук нешкідливих високоактивних превен-

тивних засобів природного походження залишається актуальним [2]. Оскільки постекстракційні лунки, як правило, інфіковані, а це може негативно впливати на остеointegraційні процеси при іммедіат-імплантації, ми провели мікробіологічні дослідження ізолятів лунок. Метою нашої роботи було дослідження протимікробних властивостей класичних і нових антибіотиків порівняно з біологічними препаратами.

Матеріали та методи дослідження

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 бульйоні). Титр ізолюваних бактерій у кожній пробі визначали за кількістю колонієтворних одиниць в 1 мл (КУО/мл). Посіви інкубували впродовж 24–48 год. при температурі 37 °С в термостаті, анаероби – в анаеростаті «Invitrogen» (при 37 °С впродовж 5–7 діб). Для ідентифікації бактерій використовували напівавтоматичні методи біохімічної діагностики за допомогою ентест-тест, API-тест і LANEMA-тест систем [6]. Ізолювані нами грампозитивні коки додатково тестували 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, забарвлювали їх за Грамом та мікроскопували під імерсійним об'єктивом. Проводили також посів матеріалу та кількісну оцінку росту різних мікроорганізмів, що виростили при первинному посіві на щільних по-

живних середовищах, тобто визначали загальне мікробне число (ЗМЧ). Оцінювали також анаеробний склад мікробного ценозу порожнини рота. Для проведення ідентифікації анаеробних мікроорганізмів використовували систему Мікро-Ла-Тест Анаеро23. Інкубацію здійснювали в строго анаеробних умовах від 24 до 48 годин. 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 Парагель. Чутливість виділених бактерій до антибіотиків визначали дифузійним методом Бауера-Кірбі [3; 4] з використанням диспенсеру для автоматичного нанесення дисків. Додатково вивчали ефективність дії стосовно ізолюваних 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 Єгоровим визначали чутливість досліджуваних тест-штамів за наявністю зон затримки їх росту [3]. Даний метод є лише скринінговим для попереднього виявлення антагоністичної активності біопрепаратів стосовно бактерій – ізолятів; остаточні висновки про результативність дії обраних біопрепаратів нами зроблено на підставі аналізу змін титрів культур, ізолюваних із зубних лунок, внаслідок їх 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 денситометра МакФарленда із наступним розсівом серії десятикратних розведень суспензій у чаш-

ки 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 порожнини рота було адаптовано до наказу МОЗ № 353 «Про уніфікацію мікробіологічних методів дослідження, що застосовуються в клініко-діагностичних лабораторіях» [5]. Особливістю даного виду досліджень є те, що в біоматеріалі переважає наявність декількох видів мікроорганізмів. Для статистичної та графічної обробки одержаних даних використано комп'ютерні програм STATISTICA (StatSoft, Inc.) версії 6 і Origin (OriginLab Corporation) версій 6–8.

Результати дослідження та їх 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 виявлено у 90 відсотків проб, стафілококи у 60%, ентеробактерії – у 30%, а мікроскопічні гриби роду *Candida* та бактероїди (*Bacteroides ovatus* і *B. distasonis*) – 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* та *S. haemolyticus*. Найбільшою чутливістю до дії тестованих антибіотиків характеризувались штами *S. haemolyticus* і *S. epidermidis* (табл. 1). Такі антибіотики, як левоміцетин, еритроміцин, тетрациклін, ампіцилін, лінкоміцин і навіть гентаміцин, цефалоксин і оксидилін не виявляли антибактеріальну ефективність щодо домінуючої мікро-

флори лунки. Зокрема *S. pyogenes* був чутливим лише до ципрофлоксацину і цефтазидиму (клавулонату), *S. pneumoniae* – до цефуроскиму, амікацину, цефтазидиму (клавулонату), меропенему та пефлоксацину; *S. salivarius* – до фурагіну амікацину цефоперазону та 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, цефуроскиму, амікацину, меропенему і пефлоксацину (помірно резистентні).

Найбільшою антибактеріальною ефективністю стосовно усіх ізолятів характеризувався ципрофлоксацин, фурагін, амікацин, цефтазидим (клавулонат) і меропенем.

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

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

№ з/п	Антибіотики	Скорочення	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	Enterobacteriaceae
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
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	Гентаміцин	ГЕН	15	8	17	12	21	8	8	8
8	Канаміцин	КАН	0	10	11	0	0	0	10	10
9	Доксацилін	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	Офлксацин	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	Цефуроскисим	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	Цефтазидим	ЦФД	6	8	14	10	14	15	16	17
27	Цефтазидим/ 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	СІЗ	0	0	25	0	16	0	0	0

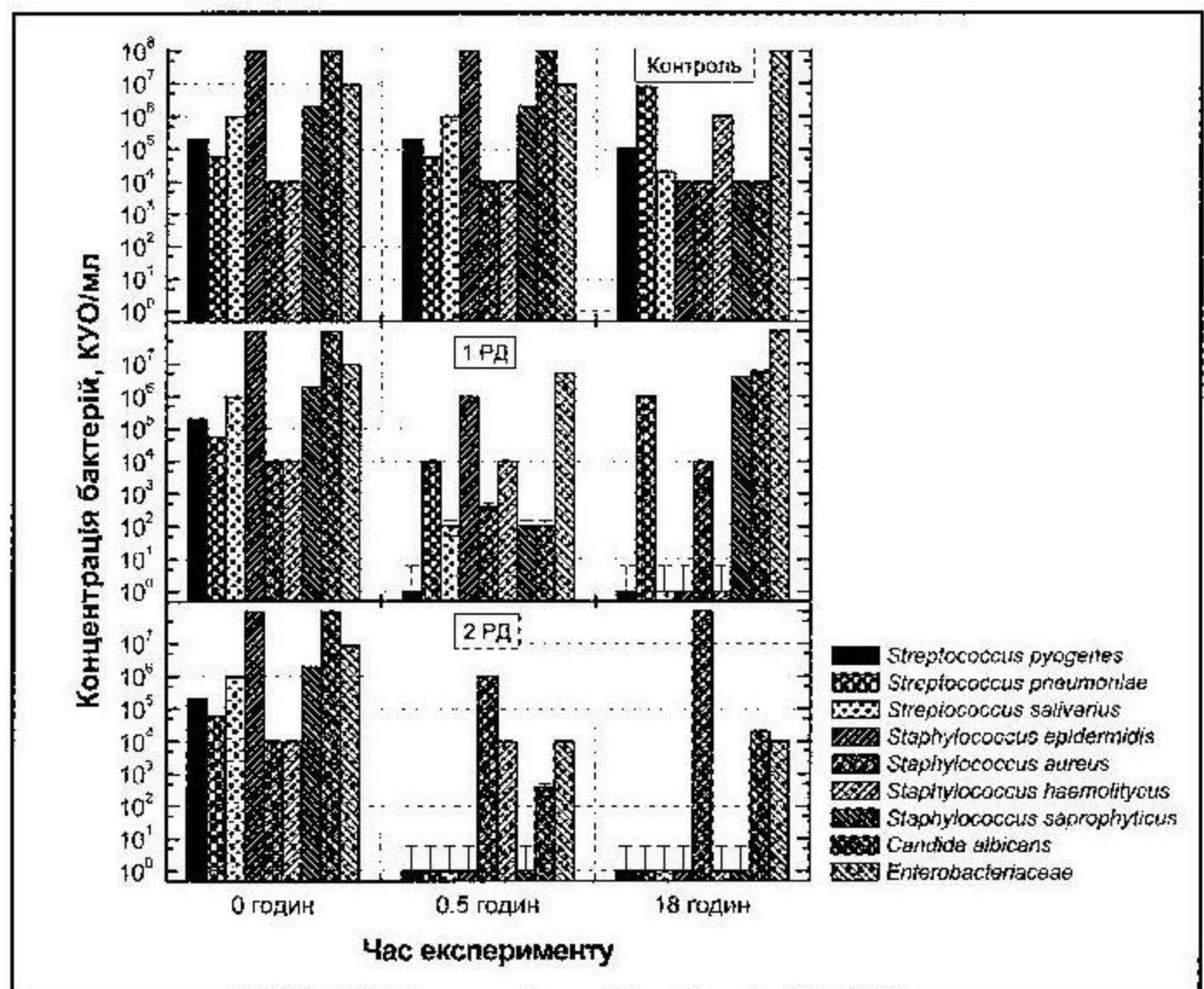
Таблиця 2. Чутливість виділених мікроорганізмів до різних концентрацій Парагелю (якісне визначення)

№ 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		$2 \cdot 10^7$	$6 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^8$	$1 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^8$

Примітка:

«+» означає наявність росту тест-культури на середовищі, що містить різні концентрації Парагелю, відповідно «-» означає відсутність росту мікроорганізмів

Аквапарагель характеризувався максимальним антагоністичним впливом у концентрації 2 РД через 30 хв. після його внесення, 1 РД забезпечувала дещо нижчу ефективність дії (за титром бактерій та *Candida albicans* вищий на 2–3 порядки). Відновлення росту деяких мікроорганізмів свідчить про наявність скоріше бактеріостатичної, ніж бактерицидної дії (зокрема, стосовно культур *S. aureus*). На 18 годину експерименту спостерігали подальше зменшення титрів деяких тест культур бактерій. Парагель виявляв найбільшу ефективність стосовно штамів *S. salivarius*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* та *S. saprophyticus* у концентрації 1 г, у 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 щодо усіх тестованих мікроорганізмів. *C. albicans* і представники родини *Enterobacteriaceae* були стійкими до дії зазначених дезінфектантів, взятих у всіх тестованих дозах. Антибактеріальні властивості біопрепаратів Біоспорину та Моноспорину-ПК засвідчили більшу ефективність застосування останнього за умов їх 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 чис-



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

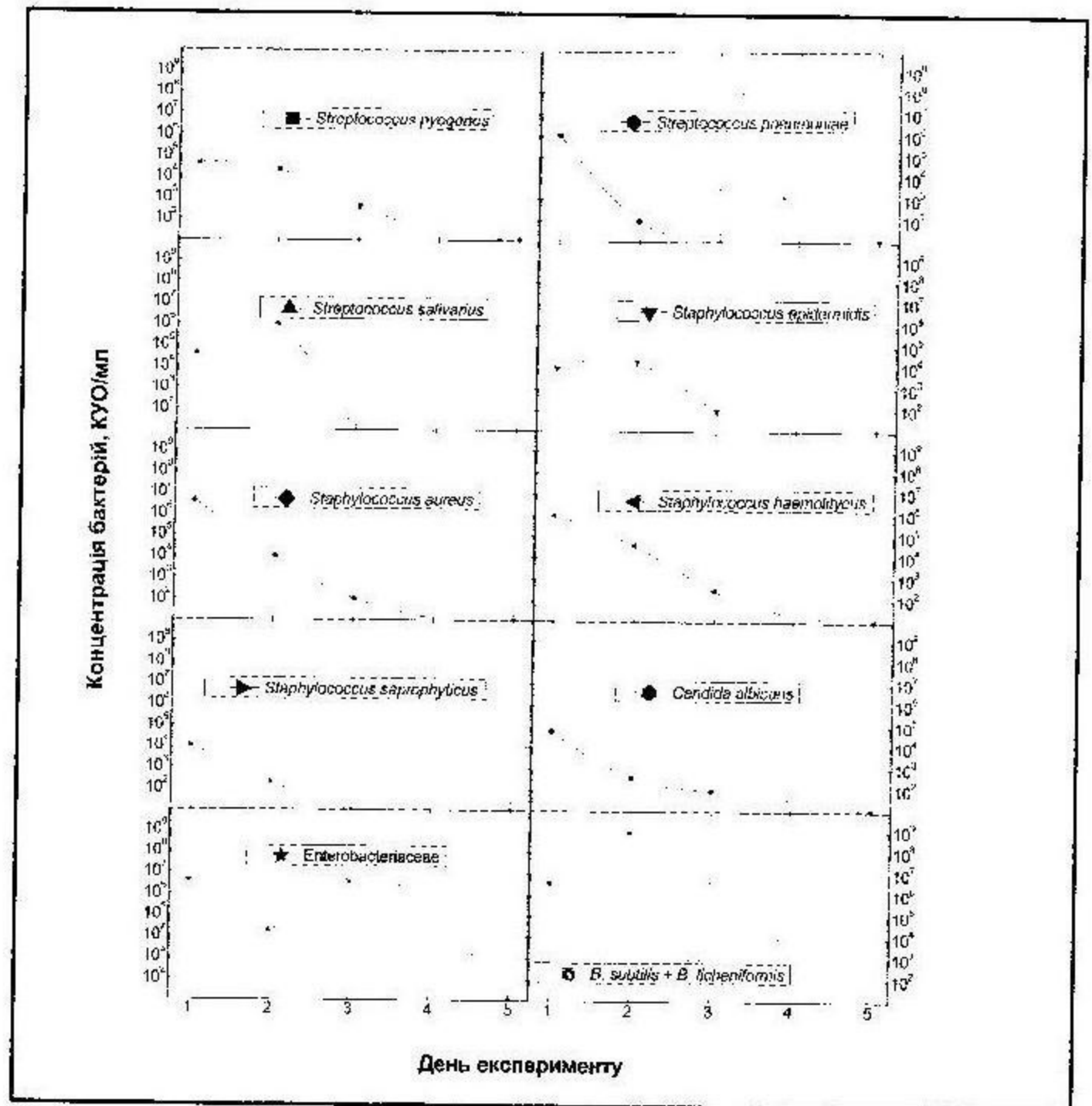
лі і *C. albicans*. Взяті до експерименту пробіотичні препарати характеризуються виразнішою дієвістю стосовно грампозитивної кокової мікрофлори, і нижчою – стосовно представників ентеробактерій. До того ж, всі без винятку мікроорганізми виявили високу резистентність до дії полівалентних бактериофагів. Так, при проведенні експериментів із Секстифагом, не відмічено затримки росту чи утворення зон лі-

зису (бляшок) бактеріальних культур, що, своєю чергою, свідчить про повну відсутність їх чутливості до тестованих бактериофагів.

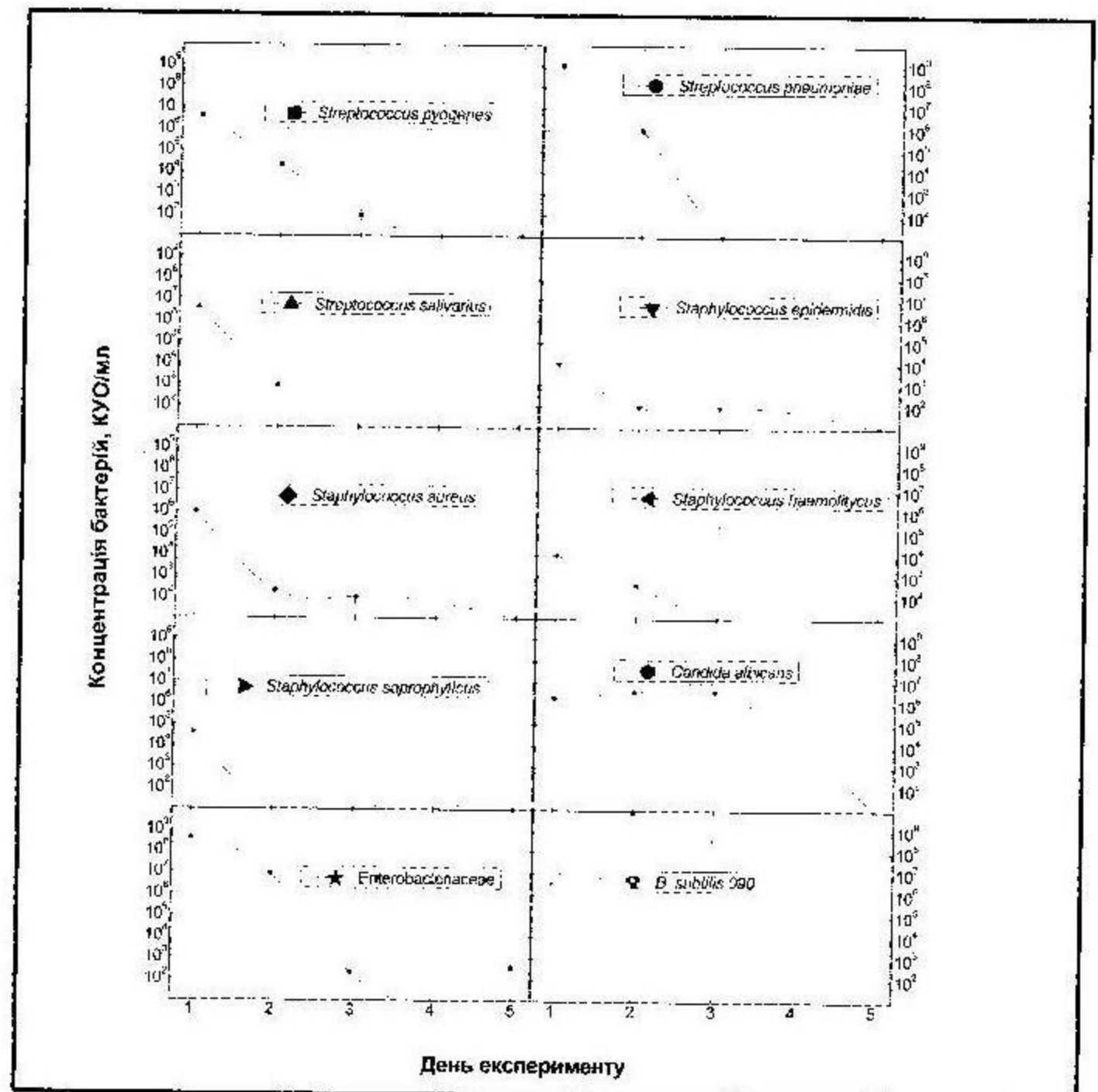
Висновки

Більшість ізольованих бактерій характеризувались виразною стійкістю до тестованих антибіотиків, що ставить під сумнів можливість їх реї улярного призначення і застосування для запо-

Мал. 2. Антибактеріальні властивості біопрепарату Біоспорино (*B. subtilis* 31 та *B. licheniformis* 3) стосовно ізолюваних штамів



Мал. 3. Антибактеріальні властивості біопрепарату Моноспорин-ПК (*B. subtilis* 090) стосовно ізолюваних штамів



бігання рановій інфекції. Ефективність Аквапарагелю була вищою за умови його використання у концентровано-му вигляді, тоді як Парагель виявляв дещо нижчу ефективність. Ізольовані нами штами ентеробактерій виявляли стійкість до дії обох дезінфектантів, взятих у всіх тестованих дозах. Виразні антибактеріальні властивості біопрепаратів Біоспорину та Моноспорину-ПК до-

водять перспективність їх локального застосування як превентивних протизапальних засобів. Враховуючи виявлену нами в експериментах *in vitro* високу антагоністичну активність досліджуваних штамів бацил, а також численні дані літератури про здатність біопрепаратів на їх основі стимулювати локально клітинну і гуморальну імунну відповідь організму [8], можна вважати перспек-

тивним подальше вивчення (*in vivo* та *in situ*) їх застосування як альтернативних засобів протидії (профілактики) запальних процесів та забезпечення успішності імплантації, що можуть бути зумовлені умовно-патогенними мікроорганізмами, у тому числі перш за все штамми, резистентними і помірно-резистентними до дії сучасних антибіотиків.

Література

1. Бойко Н. В. Коменсальна мікрофлора слизових оболонок в процесах модуляції профілактичних та імунних властивостей організму / Бойко Н. В. // Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія». – 2008. – Т. 2, №13. – С. 7–23.
2. Русин В. В. Перспективи використання бациллярних біопрепаратів у стоматологічній практиці / В. В. Русин, А. М. Гогапчук, В. О. Петров, О. Л. Белей, Н. В. Бойко // *Biomedical and biosocial anthropology*. – 2010. – P.134-139.
3. Егоров Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н. С. Егоров. – М.: Высшая школа, 1965. – 211 с.
4. Критерии для интерпретации результатов испытаний, основанных на методе Бауэр-Кириби / Серия технических докладов ВОЗ. – Женева. – 1984. – № 873. – С.147-189.
5. Наказ МОЗ № 359 «Про уніфікацію мікробіологічних методів дослідження, що застосовуються в клініко-діагностичних лабораторіях» / Збірник нормативних документів. – К.: МНІАЦ – 2006. – 2 т. – 296 с.
6. Скала В. З. Практические аспекты современной клинической микробиологии / В. З. Скала, С. В. Сидоренко, А. Г. Нехорошева. – М.: Триад, 2004. – 310 с.
7. Cebra J. J. The role of mucosal microbiota in the development, maintenance, and pathologies of the mucosal immune system / Cebra J. J., Jiang H.-Q., Boyko N., Plaskova-Hogenova H. // *Mucosal immunology*, 3rd edition – Elsevier Press, 2005. – P. 335–368.
8. Hoa N. T. Characterization of Bacillus species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyaxis of gastrointestinal disorders / N. T. Hoa, L. Baccigalupi, A. Nohizan et al. // *Appl Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 6. – P. 5241–5247.
9. Sancho-Puchades M. Antibiotic prophylaxis to prevent local infection in Oral Surgery: use or abuse? / M. Sancho-Puchades, J. M. Hernandez-Vilas, L. Berini-Aytés, C. Gay-Escoda // *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. – 2009. – V. 14(1): 28–33.

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ СТОМАТОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
АСОЦІАЦІЯ ГІГІЄНІСТІВ ЗУБНИХ УКРАЇНИ

СУЧАСНІ МЕТОДИ ЛІКУВАННЯ ЗУБОЩЕЛЕПНИХ АНОМАЛІЙ ПРОФІЛАКТИКА ОСНОВНИХ СТОМАТОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ПРИ ОРТОДОНТИЧНОМУ ЛІКУВАННІ Міжнародна науково-практична конференція

У конференції візьмуть участь:

К. мед. н. Шевченко О. В. (Росія),
Проф. Коррадо Паганеллі (Італія),
Проф. Покровський М.М. (Львів, Україна),
Проф. Куроєдова В.Д. (Полтава, Україна),
Проф. Деньга О.В. (Одеса, Україна)

Проф. Смаглюк Л.В. (Полтава, Україна),
Д. мед. н. Мірчук Б.М. (Одеса, Україна)
Д. мед. н. Дрогомирецька М.С. (Київ, Україна),
Д. мед. н. Чумакова Ю.Г. (Одеса, Україна),
К. мед. н. Горохівський В.Н. (Одеса, Україна),
Проф. Дорошенко С.І. (Київ, Україна)

Організатори:

тел: (048) 728 24 81, 050 336 55 53, 050 336 74 48
e-mail: shvartsnau@gmail.com