

Колчанова Н. Э.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

Окулич В. К.

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Беларусь*

АНАЛИЗ МИКРОБНОГО ПРОФИЛЯ И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ, ОБРАЗУЮЩИХ БИОПЛЕНКУ, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ПЕРИОДОНТИТОМ

В настоящее время распространенность болезней пародонта в мире составляет 98 % и является основной причиной потери зубов у лиц старше 40 лет [1]. Нерешенными аспектами проблемы воспалительных заболеваний пародонта остаются вопросы этиологии, патогенеза, лечения и профилактики. Образование биопленок бактериями пародонтального кармана является важным звеном в патогенезе хронического пародонтита. Форма существования бактерий в составе биопленки предоставляет им массу преимуществ в условиях организма. Связано это с тем, что микрофлора биопленки более устойчива к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы [4].

Целью исследования являлось изучение биопленкообразующих микроорганизмов, выделенных у пациентов с хроническим пародонтитом, и их антибиотикорезистентность в составе биопленки.

Материалы и методы. Лабораторную и экспериментальную части исследования проводили на кафедре клинической микробиологии и клинко-диагностической лаборатории УО ВГМУ, в микробиологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии». Материалом для изучения микрофлоры полости рта служило содержимое десневой борозды или пародонтального кармана. Идентификацию микроорганизмов проводили с использованием тест-систем в биохимическом анализаторе АТВ Expression (bioMérieux, Франция). Количество стрептококков в пародонтальном кармане определяли путем подсчета колониеобразующих единиц по методу Мельникова–Царева. Молекулярно-генетическое исследование проводили с использованием ПЦР в режиме реального времени тест-системой «Дентоскрин» с флуоресцентной детекцией результата («Литех», РФ) в амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология», Россия). Определение способности микроорганизмов пародонтального кармана к образованию биопленки проводили с применением 96-луночкового полистиролового планшета, в качестве красителя использовали генцианвиолет [2, 3]. Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение. В ходе клинко-лабораторных исследований бактериологическим методом из десневой борозды и пародонтальных карманов было выделено и идентифицировано 127 микроорганизмов, из них были представители

рода *Streptococcus spp.* (n = 121; 95,3 %), *Staphylococcus spp.* (n = 3; 2,4 %), *Candida spp.* (n = 3; 2,4 %). Установлено, что самыми многочисленными микроорганизмами в полости рта были стрептококки, которые являются представителями «желтого комплекса». При количественном анализе характера условно-патогенной микрофлоры, выделенной бактериологическим методом, установлено, что у пациентов с хроническим периодонтитом количество условно-патогенных микроорганизмов выше, чем в контрольной группе (Me, LQ–UQ; 4,7, 4–5 lgКОЕ/мл). В группе пациентов с легкой степенью данный показатель составил 5, 4,7–5,7 lgКОЕ/мл (p < 0,01), со средней — 6,7, 6–6,7 lgКОЕ/мл (p < 0,001) и тяжелой степени хронического периодонтита — 8, 7,7–8 lgКОЕ/мл (p < 0,001). При более тяжелом течении процесса в тканях периодонта увеличивается количество бактерий по сравнению с легкой, средней степенью тяжести хронического периодонтита (p < 0,001).

С применением молекулярно-генетического метода при качественном исследовании поддесневой области на наличие периодонтопатогенных микроорганизмов установлено, что статистически значимо (p < 0,001) частота выделения периодонтопатогенных видов 1-го и 2-го порядков при хроническом периодонтите (96 %) выше по сравнению с контрольной группой (30 %). Относительная частота выявления периодонтопатогенов 1-го порядка у пациентов с хроническим периодонтитом возросла в сравнении с контрольной группой, для вида *T. forsythia* в 14,7 раз. Микроорганизмы *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* были идентифицированы только в группах с патологией периодонта. Для периодонтопатогенов 2-го порядка также было характерно увеличение относительной частоты выявления у пациентов с хроническим периодонтитом в сравнении с контрольной группой: для *P. intermedia* — в 12,2 раза, *T. denticola* — в 10 раз, *F. nucleatum* — в 5 раз, *P. endodontalis* — в 7,4 раза. Ассоциации периодонтопатогенов 1-го и 2-го порядков от 4 до 6 видов встречались только при хроническом периодонтите. При прогрессировании воспалительного процесса статистически значимо (p < 0,001) возрастает концентрация периодонтопатогенов (геном-эквивалент/мл) у пациентов с хроническим периодонтитом от $3,6 \times 10^6$; $3,5 \times 10^5$ – $1,3 \times 10^8$ при легкой степени, $1,5 \times 10^7$; $4,3 \times 10^6$ – $1,6 \times 10^8$ — при средней степени и до $5,7 \times 10^7$; $1,8 \times 10^7$ – $7,3 \times 10^8$ — при тяжелой степени заболевания. Количество микроорганизмов «желтого комплекса» у пациентов увеличивается в 4 раза при хроническом периодонтите легкой степени тяжести, в 64 раза — при средней степени, в 2154 раза — при тяжелой степени. Количество периодонтопатогенов способно возрастать в 295 раз при легкой степени, в 439 раз — при средней степени, в 2667 раз — при тяжелой степени по сравнению с контрольной группой. Выявлено влияние количества микроорганизмов «желтого комплекса» (p < 0,001), массы биопленки, образованной стрептококками (p < 0,001), и наличия в ассоциации периодонтопатогенов 1-го порядка (p < 0,001) на тяжесть течения хронического периодонтита.

В статических условиях микроорганизмы «желтого комплекса», выделенные от лиц контрольной группы, формировали биопленку массой 0; 0–5,29 мкг/лунку (min = 0, max = 23). Для микроорганизмов, выделенных от пациентов с хроническим периодонтитом, была характерна зависимость формирования массы биопленки от степени

тяжести заболевания: легкая степень — 3,83; 0–5,57 мкг/лунку, средняя — 8,85; 5,7–19,26 мкг/лунку, тяжелая — 22,94; 15,2–40,06 мкг/лунку. Статистически значимо масса биопленки, образуемая микроорганизмами «желтого комплекса», выше при тяжелой степени течения хронического периодонта, чем в контрольной группе, а также в группах с легкой и средней степенью течения заболевания ($p < 0,001$). Выявлена средняя положительная корреляция тяжести хронического периодонтита с массой биопленки, образованной микроорганизмами «желтого комплекса» ($r = 0,62$; $p < 0,001$).

При сравнении МПК₉₀ для изолятов *Streptococcus spp.* в составе биопленки обнаружено, что МПК увеличилась от 2 до 512 раз для всех антибиотиков по сравнению с их МПК₉₀ для планктонных форм, кроме моксифлоксацина. Увеличение МПК₉₀ наблюдалось для β -лактамов — пенициллинов (бензилпенициллин — в 32 раза, амоксициллин-клавуланат — в 512 раз; для карбапенемов (имипенем — в 2 раза, меропенем — в 16 раз); для глицилциклинов (тигециклин — в 2 раза); для фторхинолонов (ципрофлоксацин — в 4 раза).

Выводы:

1. У пациентов с хроническим периодонтитом выявлены комплексные изменения микрофлоры ротовой полости: увеличение количества бактерий «желтого комплекса» и массы образованного ими экзополимерного матрикса; увеличение количества выделенных периодонтопатогенных возбудителей *P. endodontalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*; присоединение микроорганизмов видов *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis*; возрастание количества периодонтопатогенов в ассоциациях.

2. Для стрептококков в составе биопленки характерна более высокая минимальная подавляющая концентрация антибактериальных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Денисова, Ю. Л. Современные концепции развития болезней периодонта / Ю. Л. Денисова // Стоматолог. Минск. 2012. № 2 (5). С. 76–77.
2. Колчанова, Н. Э. Устойчивость матрикса моно- и многокомпонентных биопленок, образованных микрофлорой периодонтального кармана, в статических и динамических условиях среды *in vitro* и их антибиотикорезистентность / Н. Э. Колчанова // Вестн. ВГМУ. 2017. Т. 16, № 5. С. 136–144.
3. Способ определения минимальной подавляющей концентрации антибиотика для бактерий, способных формировать биопленку : пат. Респ. Беларусь, МПК С 12 Q 1/18 / В. К. Окулич [и др.] ; заявитель и патентообладатель Витебский гос. мед. ун-т. № а 20150466 ; заявл. 21.09.15 ; опубл. 30.08.18 // Афіц. бюл. № 4. С. 90.
4. Pratten, J. Use of biofilm model systems to study antimicrobial susceptibility / J. Pratten, D. Ready // Methods. Mol. Biol. 2010. Vol. 642. P. 203–215.