

Є.А. Сардиків*, 
О.В. Іщенко, 
О.О. Фастовець 

СТАН МІКРОБІОЦЕНОЗУ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ ЗА РІЗНИХ МЕТОДІВ ЗАМІЩЕННЯ ДЕФЕКТІВ КОРОНКОВИХ ЧАСТИН ЗУБІВ

Дніпровський державний медичний університет
вул. Володимира Вернадського, 9, Дніпро, 49044, Україна
Dnipro State Medical University
Volodymyra Vernadskoho str., 9, Dnipro, 49044, Ukraine
*e-mail: eugenesea2021@gmail.com

Цитування: Медичні перспективи. 2024. Т. 29, № 3. С. 151-161

Cited: Medicni perspektivi. 2024;29(3):151-161

Ключові слова: бактерії, гриби, мікробіологічне дослідження, мікробіота, мікробіоценоз, резистентність, біоплівки, адгезивність

Key words: bacteria, fungi, microbiological study, microbiota, microbiocenosis, resistance, biofilms, adhesiveness

Реферат. Стан мікробіоценозу ротової порожнини за різних методів заміщення дефектів коронкових частин зубів. Сардиків Є.А., Іщенко О.В., Фастовець О.О. Карієс зубів є однією з найпоширеніших проблем сфери охорони здоров'я. Метою дослідження було вивчити спектр мікробіоти, що входить до складу дентальної біоплівки, та її біологічні властивості. У дослідженні задіяно 90 учасників досліджуваної групи та 20 – контрольної. Матеріал – дентальний наліт та слина. Основний метод дослідження – бактеріологічний. Усі зразки від учасників дослідження були позитивні на мікробіоту. При первинному заборі матеріалу було отримано 395 унікальні ізоляти: 338 від пацієнтів з карієсом та 57 – від здорових добровольців. Мікробіоценоз ротової порожнини, асоційований з розвитком карієсу, містив таких еудомінантів, як *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.* та домінантів *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacterales*, *Prevotella spp.* та *Candida albicans*. Натомість еудомінантами здорової ротової порожнини були мікроорганізми з відомими коменсальними властивостями, зокрема *Streptococcus salivarius*, *Aerococcus viridans*, *Veillonella spp.* Після проведення стоматологічного лікування спостерігали значні зрушення в таксономічному складі дентальної біоплівки. Тож склад мікробіоценозу ротової порожнини учасників, які отримали реставрацію дефектів коронкових частин зубів цирконієвими вкладами, наближався до складу мікробіоценозу пацієнтів з профілю здорової когорти учасників. Еудомінантами ротового мікробіоценозу учасників, що отримували пряму реставрацію, були *S. mitis*, *Peptostreptococcus spp.* та *Veillonella spp.*, домінанти – *Propionibacterium spp.* При цирконієвій реставрації еудомінантами були коменсали *S. salivarius* та *A. viridans*. Отримані ізоляти опортуністів мали високі вірулентні властивості. Культури роду *Streptococcus* були чутливими до скринінгу до норфлоксацину лише у 28,6% випадків. Серед культур роду *Staphylococcus* 23,8% були метицилін-резистентними. Представники *Enterobacterales* мали хіміотерапевтичну чутливість, яка значно коливалася залежно від групи протимікробних засобів. З використанням дисків з фенілбороновою кислотою, етилендіамінтетраоцтовою кислотою та клоксаціліном, встановлено, що культури *Klebsiella spp.* були продуцентами карбапенемаз класу А (n=3) та містили *AmpC* (n=3). Продуцентами також карбапенемаз були щонайменше 65,2% досліджуваних культур неферментуючих грамнегативних мікроорганізмів. У нашому дослідженні всі отримані ізоляти також були наділені здатністю до утворення біоплівки. Отже, мікробіологічне дослідження в стоматології має розглядатися як один з об'єктивних методів оцінки здоров'я ротової порожнини, а також матиме переваги у виборі методу корекції дефектів коронкових частин зубів, а в ряді випадків – й ухвалення інформованого рішення про призначення протимікробного лікування.

Abstract. Oral microbiocenosis state under different approaches of replacing dental crown defects. Sardykov Ye.A., Ishchenko O.V., Fastovets O.O. Dental caries is one of the most common health problems. The aim of the research was to study the spectrum of microbiota, which is part of the dental biofilm, and its biological properties. The study involved 90 participants of the study group and 20 of the control group. Dental plaque and saliva were used as principal clinical specimens. The main research method was bacteriological. All samples from study participants were positive for microbiota. At the initial collection of material, 395 unique isolates were obtained: 338 from patients with caries and 57 from healthy volunteers. The microbiocenosis of the oral cavity associated with the development of caries contained such eudodominants as *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*

and dominants *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacterales*, *Prevotella spp.* and *Candida albicans*. In contrast the eudominants of the healthy oral cavity were microorganisms with known commensal properties, in particular *Streptococcus salivarius*, *Aerococcus viridans*, *Veillonella spp.* After the dental treatment, significant shifts in the taxonomic composition of the dental biofilm were observed. Therefore, the composition of the oral cavity microbiocenosis in participants who underwent restoration of the dental crown defects with zirconium inserts approached patients to the healthy cohort participants. The eudominants of the oral microbiocenosis of the participants who underwent direct restoration were *S. mitis*, *Peptostreptococcus spp.* and *Veillonella spp.* In zirconium restoration, the commensals *S. salivarius* and *A. viridans* were eudominants. The obtained isolates of opportunists possessed high virulence properties. *Streptococcus spp.* cultures were sensitive to norfloxacin screening in only 28.6% of cases. Among cultures of the genus *Staphylococcus*, 23.8% were methicillin resistant. Representatives of *Enterobacterales* had chemotherapeutic sensitivity that varied significantly depending on the group of antimicrobial agents. Using disks with phenylboronic acid, ethylenediaminetetraacetic acid and cloxacillin, it was established that *Klebsiella spp.* were producers of class A carbapenemases ($n=3$) and contained *AmpC* ($n=3$). Carbapenemases were also produced by at least 65.2% of the studied cultures of non-fermenting gram-negative microorganisms. In our study, all obtained isolates were also endowed with the ability to form a biofilm. Therefore, microbiological research in dentistry should be considered as one of the objective methods for assessment of health of the oral cavity and will also have advantages in choosing a method of correcting defects of dental crown parts and in some cases, making an informed decision about the prescription of antimicrobial treatment.

Карієс зубів є однією з найпоширеніших проблем сфери охорони здоров'я [1]. Зазвичай цей патологічний процес пов'язують з рядом факторів ризику, які, врешті решт, призводять до екологічного переродження дентальної біоплівки, також відомої як зубний наліт. Серед таких факторів розглядаються харчові звички, особливості гігієни ротової порожнини, соціально-економічний статус та генетично зумовлені особливості, зокрема гіпомінералізація зубів, особливо молярів та різців [2, 3]. З іншого боку, методи стоматологічного втручання також розглядаються в контексті модуляції орального мікробіоценозу та розвитку вторинного карієсу після попередньо проведеного лікування [2].

Розвиток карієсу зубів описує гіпотеза «екологічного нальоту», яка говорить про те, що вище-перераховані факторні ознаки, зокрема харчові звички з високим споживанням сахарози, індують заселення біоплівки карієсогенними мікроорганізмами [2]. Але у фокусі не тільки спектр опортуністів, які можуть брати участь у розвитку карієсної дентальної біоплівки, але й у вірулентних властивостях її складових [4]. Тож метою нашого дослідження було дослідити спектр мікробіоти, що входить до складу дентальної біоплівки та вивчити її біологічні властивості.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проведене на базі Дніпровського державного медичного університету відповідно до Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини в якості об'єкта дослідження». Усі учасники дослідження дали інформовану згоду на медичне втручання. Попередньо дослідження було схвалено комісією університету з біоетики (протокол № 19 від 15.05.2024). Вибір

цільових груп учасників дослідження проводився на систематичній основі. Критерій включення до груп втручання – потреба в заміщенні дефектів коронкової частини зуба, зруйнованого вище ясенного краю, унаслідок карієсу; вік учасників від 21 до 45 років. Критерії виключення – наявність декомпенсованих хронічних захворювань, цукрового діабету, онкологічної патології, імуносупресії будь-якого генезу тощо.

Усі пацієнти були розподілені на 4 групи: з прямими реставраціями ($n=30$); з металокерамічними вкладками ($n=30$); з цирконієвими вкладками ($n=30$); здоровий контроль – пацієнти без дефектів коронки зуба ($n=20$). Від пацієнтів, що потребували заміщення дефектів коронкових частин зубів, матеріал брали у двох повторах – до стоматологічного втручання та через 2 тижні після. Тож досліджено 200 наборів зразків від 110 учасників.

Забір та мікробіологічне дослідження клінічного матеріалу проводилися відповідно до ухвалених стандартів [5]. Матеріал для дослідження відбирали в стоматологічному кріслі під час візиту до лікаря. Для дослідження проводили забір слини активним методом (шприц без голки) та під'ясенного дентального нальоту. Відбір зразків нальоту проводився на рівні зуба, тобто дані з 4 ділянок об'єднували в один набір. Проби брали з мезіальної та дистальної щічної сторони першого моляра, а також обов'язково з поверхні з дефектом. Забір під'ясенного нальоту навколо зубів проводився з використанням кюретки (активний забір) та паперової смужки (метод адсорбції) [6]. Отримані зразки *ex tempore* були взяті в роботу. Для мікробіологічного дослідження проводили центрифугування зразка протягом 15 хв при 10-15 тис. оберт. за температури 4°C; супернатант видаляли, а осад використали для відновлення мікробного росту. Зразки, отримані

методом адсорбції, осаджували методом «пробірка в пробірці» [6].

Для селективного виділення роду *Staphylococcus* використовували манітол-сольовий агар, для роду *Streptococcus* – відповідний селективний агар. Для виділення бактерій сімейства *Enterobacteriaceae* та інших невибагливих грамнегативних мікроорганізмів – середовище МакКонкі. Для виділення грибів патологічний матеріал засівали на агар Сабуро з гентаміцином. Для неселективної культивування, оцінювання гемолітичної активності та вирощування вибагливих мікроорганізмів використовували агар з 5% дефібрированою овечою крові. Засіяні чашки Петрі витримували в термостаті протягом 24-72 год при температурі 37°C. Для селективного виділення анаеробів використовували анаеростат з реагентами для створення необхідних атмосферних умов [5]. Для ідентифікації використали комерційні тест-набори з урахуванням біохімічних властивостей (API-тести, bioMérieux).

Вивчення чутливості до антибіотиків проводили відповідно до рекомендацій Європейського товариства з тестування на чутливість до антибіотиків (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) [7].

Визначення адгезивних властивостей проводили за методикою Бриліса В.І., як показано раніше [7]. Оцінку щільності утворення біоплівки проводили за методикою Christensen [9].

Оброблення отриманих результатів дослідження з використанням біостатистичних методів проводилося за допомогою програмного продукту STATISTICA v.6.1 (Statsoft Inc., США) (ліцензійний № AGAR909E415822FA). Перевірка гіпотези про нормальність розподілу проводилася за критеріями Шапіро-Вілка. Залежно від характеру розподілу використовували параметричні та непараметричні методи з визначенням кількості спостережень (n), середньої величини (M), стандартного відхилення (SD), стандартної похибки середньої (m), довірчого інтервалу (95% ДІ), медіани (Me) з міжквартильним інтервалом (25–75%) та 95% ДІ. Для узагальнення якісних даних використовувалися відносні величини (%). Визначення вірогідності відмінностей середніх величин для непов'язаних груп проводилось за відповідними закону розподілу критеріями Стюдента (t) і Манна-Вітні (U); порівняльний аналіз непов'язаних кількісних даних проводили за допомогою непараметричного критерію Краскала-Уолліса (H), а якісних – критерію хі-квадрат (χ^2). Порівняння пов'язаних даних – критерій Вілкоксона (W). Відмінності вважали статистично достовірними при $p < 0,05$. Для визначення

зв'язку між безперервним кількісним показником і порядковим показником та між двома кількісними показниками, що мали ненормальний розподіл, використовували ранговий кореляційний аналіз Спірмена (r_s). Напрямок кореляційного зв'язку оцінювався як прямий при позитивному значенні r_s та зворотній – при негативному значенні r_s . Зв'язок вважався сильним при значенні коефіцієнта кореляції $\geq 0,7$, середнім – 0,3-0,69, слабким – 0-0,29 [10]. Програмний пакет PAST 3.17 використовували для розрахунку екологічних індексів з метою виявлення відмінностей у мікробному складі ротової порожнини різних груп учасників дослідження, зокрема індексу Шеннона та його 95% ДІ, коефіцієнта видового домінування Сімпсона з 95% ДІ, а також коефіцієнтів Брея-Кертиса та Соренсена.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Мікробіоценоз ротової порожнини пацієнтів з карієсом. Усі зразки від учасників дослідження були позитивні на мікробіоту. При первинному заборі матеріалу було отримано 395 унікальних ізолятів – 338 від пацієнтів з карієсом та 57 – від здорових добровольців без явищ карієсу. В обох групах мікробне навантаження становило 3 (2;4) ізоляти на зразок (рис. 1). Монокультури мали лише у 2,7% зразків (n=3).

Ідентифіковані культури належали до п'яти бактеріальних філ – *Firmicutes* (n=198; 50,1%), *Proteobacteria* (n=50; 12,7%), *Bacteroidetes* (n=37; 9,4%), *Fusobacteria* (n=32; 8,1%), *Actinomycetota* (n=54; 13,7%) та Царства Грибів (n=24; 6,1%). Причому група карієсу, що потребувала реставрації коронки зуба, вирізнялася більшим мікробним навантаженням. На рівні груп частки зазначених таксономічних одиниць становили 44,1% в досліджуваній групі проти 86,0% в контрольній для *Firmicutes*; 13,9% проти 5,3% для *Proteobacteria*; 14,5% проти 8,8% для *Actinomycetota*; культури, що належали до *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* та грибів, були отримані тільки в групі карієсу – 9,5%, 10,9% та 7,1% відповідно ($p < 0,05$). Таксономічний склад мікробіоценозу порожнини рота при карієсі наведений на рисунку 2.

У групі карієсу філа *Firmicutes* була представлена факультативними та суворими анаеробами родів *Staphylococcus* (n=21; 6,2%), *Streptococcus* (n=77; 35,1%), *Peptostreptococcus* (n=32; 9,5%) і *Veillonella* (n=19; 5,6%). Розподіл цієї таксономічної одиниці в групі здорових учасників був таким: *Streptococcus* (n=20; 35,1%), *Peptostreptococcus* (n=5; 8,8%), *Aerococcus* (n=10; 17,5%), *Lactobacillus* (n=4; 7,0%), *Veillonella* (n=10; 17,5%).

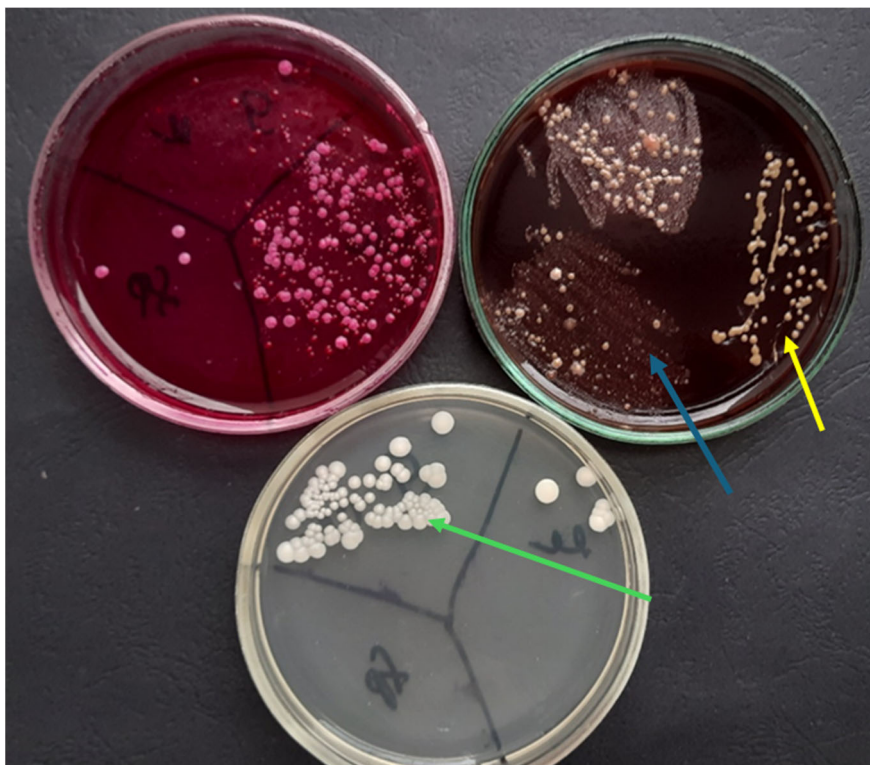


Рис. 1. Змішана культура
C. albicans (зелена стрілка), *Streptococcus* групи *viridans* (синя стрілка),
Fusobacterium spp. (жовта стрілка), отримана від пацієнта СТ0101024.
 За годинниковою стрілкою: агар МакКонки, 5% кров'яний агар, середовище Сабуро

У групі карієсу рід *Staphylococcus* виділили з 23,3% клінічних зразків. Видовий спектр включав *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*. Серед усіх представників роду *Staphylococcus* коагулаза-позитивні ізоляти становили 76,2% (16/21), а саме *S. aureus*. Усі коагулаза-негативні види мали приблизно однакову частку і становили близько 5-6%. Для групи здорових зубів характерною була відсутність таких опортуністів у біологічних зразках.

У групі карієсу рід *Streptococcus* виділили з 76,7% клінічних зразків. Видовий спектр був представлений *Streptococcus pyogenes* (n=14; 4,1%) та групою *viridans* зі значною питомою вагою *Streptococcus mutans* (n=41; 12,1%), а також *Streptococcus mitis* (n=11; 3,3%) та *Streptococcus salivarius* (n=7; 2,1%). Розподіл у групі здорових учасників вирізнявся наявністю комменсалів *Streptococcus pneumoniae* (n=4; 7,0%) та більшою кількістю ізолятів *S. salivarius* (n=10; 18,7%), але відсутністю *S. anginosus* та *S. mutans*, а також обмеженням *S. pyogenes* (n=1; 1,8%). У цій групі ізоляти роду *Streptococcus* були виділені з 65,0% біологічних зразків.

Культури родів *Peptostreptococcus* та *Veillonella* були відновлені з 35,6% та 21,1% відібраних

з групи дослідження проб відповідно. У групі контролю ростові показники становили 25,0% і 50% відповідно.

Наступними за чисельністю в обох групах були представники філи *Actinomycetota*. У групі карієсу таксономічна одиниця була представлена *Rothia mucilaginosa* (n=23; 6,8%) та *Propionibacterium spp.* (n=26; 7,7%). Показники в групі здорових добровольців становили 3,5% (n=2) і 5,3% (n=3) відповідно. Культури *Rothia spp.* були відновлені з 25,6% та 10,0%, а *Propionibacterium spp.* – з 36,6% та 15% клінічних зразків груп дослідження та контролю відповідно.

Третіми за чисельністю в обох групах були представники філи *Proteobacteria*. У групі карієсу таксономічна одиниця була представлена родами *Escherichia* (n=13; 3,8%), *Klebsiella* (n=10; 3,0%), *Haemophilus* (n=13; 3,8%), *Acinetobacter* (n=3; 0,9%) та *Pseudomonas* (n=6; 2,4%). Загалом Enterobacterales та неферментуючі грамнегативні мікроорганізми (НФГНМО) були відновлені з 25,6% та 10% клінічних зразків відповідно. Група зі здоровими зубами відрізнялася відсутністю зазначених опортуністів у мікробному спектрі ротової порожнини, але колонізацією непатогенними *Neisseria spp.* (n=3).

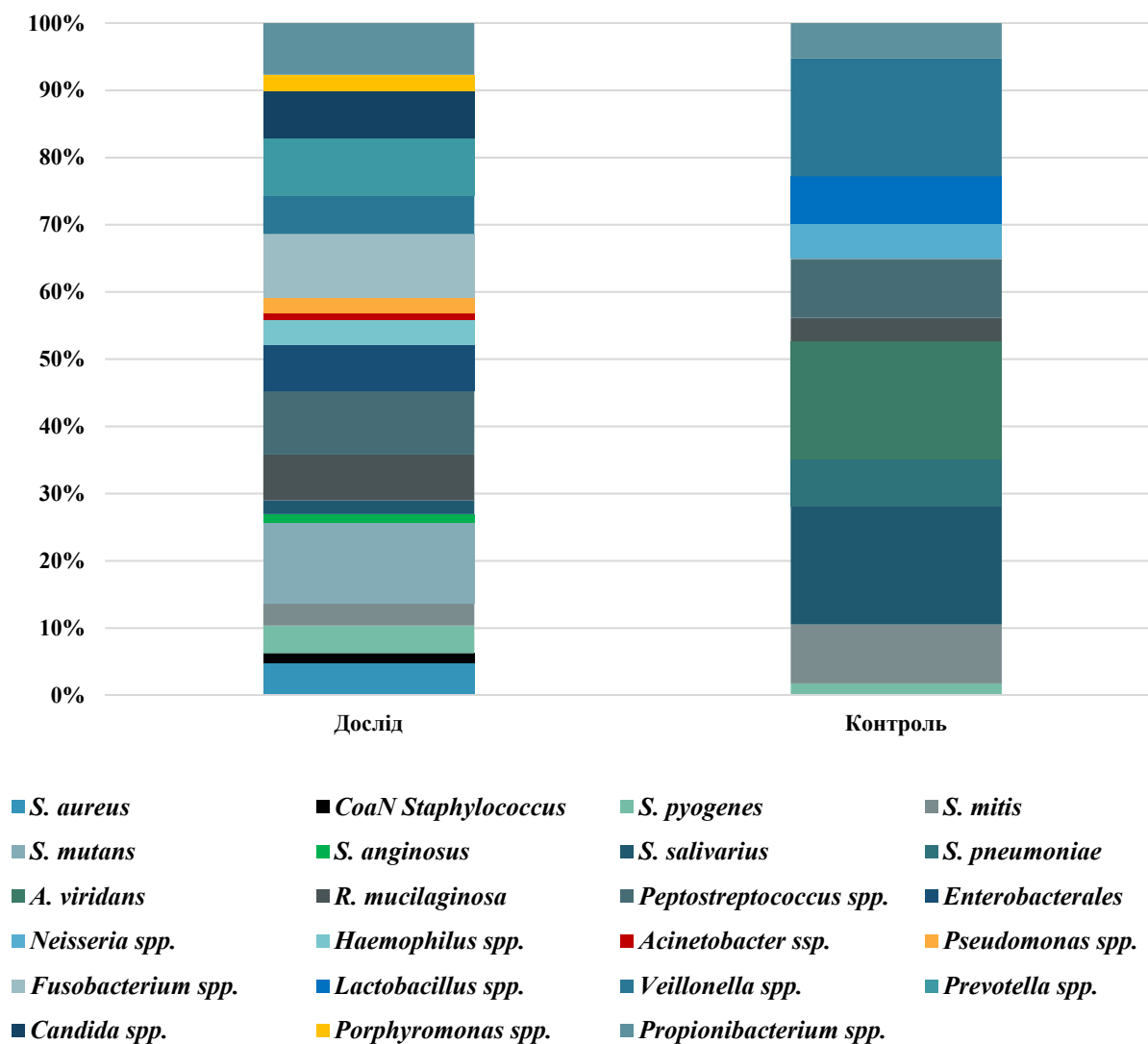


Рис. 2. Таксономічний склад мікробіоценозу ротової порожнини при карієсі та в стані здоров'я в учасників дослідження (n=395, %). Відмінності у видовому багатстві клінічних зразків досліджуваної та контрольної груп за індексом Шеннона, $p < 0,05$; індекс видової відмінності Брея-Кертиса, $BC = 0,83$

Мікроорганізми, що належали до філ *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* та грибів, були виділені тільки від учасників групи карієсу та були отримані з 35,6%, 36,7% та 26,7% проб. Серед ізолятів філи *Bacteroidetes* було ідентифіковано роди *Porphyromonas* (n=6; 2,5%) та *Prevotella* (n=29; 10,4%).

Виділені гриби належали до роду *Candida*, отримані з 26,7% зразків (n=24). Рід *Candida* був представлений видом *Candida albicans*.

Індекс видового біорізноманіття Шеннона в групі карієсу становив 2,75, у групі зі здоровими зубами – 2,21 (t-тест; $p < 0,05$); індекс домінування Сімпсона становив 0,07 у групі дослідження та 0,12 у групі контролю (t-тест; $p < 0,05$). При оцінюванні видової подібності різноманіття двох

порівнюваних екосистем виявлено значні відмінності: коефіцієнт Соренсена $C = 0,4$, індекс Брея-Кертиса $BC = 0,8$.

Аналізуючи внесок кожного роду в загальну пропорцію, ми встановили, що мікробіоценоз ротової порожнини, асоційований з розвитком карієсу, містив таких еудомінантів, як *S. mutans*, *Peptostreptococcus spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.* (>10%) та домінантів *S. pyogenes*, *Enterobacteriales*, *Prevotella spp.* та *C. albicans* (5,0-9,9%). Натомість еудомінантами здорової ротової порожнини були мікроорганізми з відомими коменсальними властивостями, зокрема *S. salivarius*, *A. viridans*, *Veillonella spp.*

Тож мікробіом ротової порожнини в пацієнтів з карієсом був багатим на патогени. Також характерним був дефіцит коменсалів та надмірний ріст облигатних анаеробних мікроорганізмів.

Відомий факт, що видовий склад мікроорганізмів, які населяють ротову порожнину, налічує сотні [11]. Шляхом використання молекулярно-генетичних досліджень було показано, що таке значне мікробне навантаження забезпечує існування збалансованої екосистеми, у якій мікроорганізми контролюють один одного. Надмірний ріст або відсутність певного таксону порушує цей баланс, унаслідок чого можуть виникати різні захворювання. Було показано, що карієс зубів також пов'язаний не стільки із зовнішніми факторами, скільки з порушенням балансу в структурі мікробного співтовариства, яке існує в нормальному здоровому стані [12]. Основні мікробні карієсогенні фактори – *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. pyogenes*, *Lactobacillus spp.* та *Candida spp.* з розвинутою системою відчуття кворуму, продукцією глюканів [13, 14, 15], а також здатністю грибів до стимуляції росту згаданих *Streptococcus*

[16, 17]. Наші результати є зіставними з опублікованими раніше та підтверджують значну роль родів *S. mutans*, *S. pyogenes* та *Candida* в розвитку карієсу зубів.

Вплив різних методів реставрації дефектів коронкових частин зубів на мікробіоценоз ротової порожнини. Учасники дослідження, залежно від клінічної ситуації, були рівномірно розподілені на 3 групи та отримали реставрацію прямим методом, металокерамікою або цирконієм. Через два тижні стан мікробіоценозу ротової порожнини порівняли між ними та з групою контролю.

При повторному заборі клінічного матеріалу від групи дослідження отримано 90 унікальних зразків, з яких було відновлено 326 ізоляти. Кількість ізолятів на зразок у середньому становила 3,1. Після проведення реставрації зубів відбувалася зміна мікробної композиції ротової порожнини. Розподіл ідентифікованих ізолятів залежно від методу реставрації наведений у таблиці та на рисунку 3.

Мікробний спектр ротової порожнини залежно від вибору методу реставрації дефектів коронкових частин зубів (% ізолятів)

	Пряма, %	Металокерамічна, %	Цирконієва, %	Здорові, %
<i>Firmicutes</i>	57,1	63,3	87,9	86,0
<i>Fusobacterium</i>	7,6	7,1	0,0	0,0
<i>Proteobacteria</i>	5,7	7,1	1,5	5,3
<i>Bacteroidetes</i>	8,6	8,2	0,0	0,0
<i>Actinomycetota</i>	13,3	9,2	10,6	8,8
Гриби роду <i>Candida</i>	7,6	5,1	0,0	0,0

Примітки: $\chi^2=59,9$; $p<0,01$.

Тож після проведення реставрації зубів основним представником орального мікробіоценозу залишалася філа *Firmicutes*. У пацієнтів, що отримали реставрацію цирконієвими вкладками, ця таксономічна одиниця була представлена родами *Streptococcus* (n=21; 31,8%), *Aerococcus* (n=10; 15,2%), *Peptostreptococcus* (n=17; 25,8%), *Veillonella* (n=10; 15,2%). Після проведеної корекції відмітили відсутність колонізації *Staphylococcus spp.*, зменшення частки *S. mutans*, а також збільшення *S. salivarius* та *A. viridans* (W-критерій; $p<0,05$). Важливо зазначити, що в інших групах, зокрема при використанні металокерамічних конструкцій та прямої реставрації, частка *Staphylococcus spp.* та

карієсогенних *Streptococcus spp.* залишалася на вихідному рівні, хоча й спостерігалася тенденція до накопичення коменсалів ($p\leq 0,1$).

Кількість культур, що належали до філи *Actinomycetota*, була рівнозначною серед усіх груп учасників дослідження, включно з групою здорових волонтерів. Але аналізуючи вплив методу реставрації, варто зазначити, що в групі з використанням металічних та цирконієвих вкладок спостерігали зникнення колонізації карієсогенними *R. mucilaginosa* та тенденцію до накопичення роду *Propionibacterium* (W-критерій; $p<0,05$). У групі з прямою реставрацією суттєвої позитивної динаміки не спостерігали.

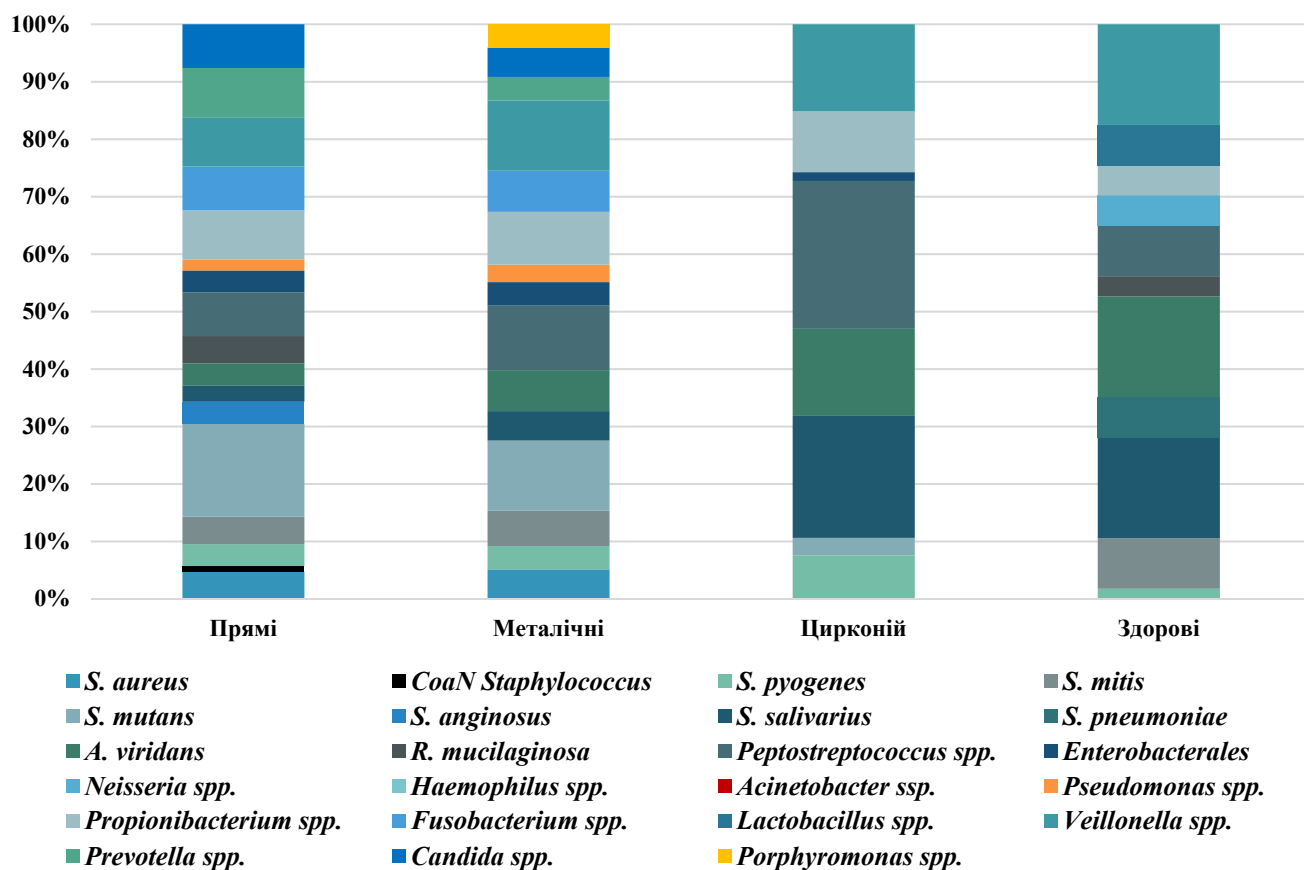


Рис. 3. Мікробний спектр ротової порожнини залежно від вибору методу реставрації дефектів коронкових частин зубів (n=326; % ізолятів). Відмінності у видовому багатстві клінічних зразків від пацієнтів з різними методами заміщення дефектів коронкових частин зубів, індекс видової відмінності: ВС пряма і металокераміка =0,8; ВС пряма і цирконієві вкладки =0,56; металокерамічні вкладки та цирконієві вкладки =0,43; здорові волонтери та цирконієві вкладки =0,37

У середині філи *Proteobacteria* також спостерігали зміну колонізаторів. Зокрема для групи з цирконієвими вкладками характерною була втрата колонізації патогенами, зокрема родами *Escherichia*, *Klebsiella*, *Haemophilus*, *Acinetobacter* та *Pseudomonas* (W-критерій; $p < 0,05$). Група з металокерамічними вкладками залишалася вразливою до неферментуючих грамнегативних мікроорганізмів (НФГНМО), зокрема *Pseudomonas aeruginosa* (n=3; 3,1%). У групі з прямою реставрацією *Enterobacteriales* та НФГНМО мали значну частку – до 6% сумарно.

Від учасників з цирконієвою реставрацією не отримували культур, ідентифікованих як *Fusobacterium*. Проте інші методи стоматологічного лікування суттєво не впливали на наявність цього таксону в мікробіоті ротової порожнини. Аналогічні результати отримані для грибів роду *Candida*.

Тож описаний таксономічний розподіл мікробіоценозу ротової порожнини учасників, які отримали реставрацію дефектів коронкових частин зубів цирконієвими вкладками, набли-

жався до пацієнтів з профілю здорової когорти учасників. Еудомінантами ротового мікробіоценозу учасників, що отримували пряму реставрацію, були *S. mutans*, домінанти – *Propionibacterium spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*. При цирконієвій реставрації відбувся суттєвий зсув – еудомінанти коменсали *S. salivarius* та *A. viridans*.

Розрахунковий показник видової несхожості, індекс Брея-Кертиса, також показав, що реставрації коронкових частин зубів з використанням прямого методу та металокерамічних вкладок призводили до подібних зрушень у біоценозі ротової порожнини (ВС=0,2) та не наближали до подібності зі здоровими добровольцями. Таксономічний розподіл у групі з цирконієвими вкладками суттєво відрізнявся від інших методів реставрації (ВС пряма =0,56; ВС металічні =0,43) та наближався до розподілу групи здорового контролю, ВС=0,37. Аналогічні результати отримано при аналізі індексу домінування Сімпсона: пряма реставрація – 0,08 (95%ДІ

0,07 – 0,11), металокерамічна – 0,08 (95%ДІ 0,08 – 0,11), цирконієва – 0,18 (95%ДІ 0,16-0,23).

Можливе обґрунтування отриманих результатів полягає в особливостях матеріалу, який використовується для заміщення коронкових частин зубів, зруйнованих вище ясенної борозни. При проведенні прямої реставрації проблемою є недостатнє усадження, притаманне всім пломбувальним матеріалам. Наслідком є проникнення карієсогенних мікробних факторів через пломбувальний матеріал і подальший розвиток вторинного карієсу [18, 19]. Відповідні результати були отримані і в нашому дослідженні: зокрема, відновлення спектру карієсогенних мікроорганізмів від осіб, яким реставрацію зуба проведено прямим методом.

Металокерамічні вкладки розглядаються як більш перспективний матеріал задля забезпечення достатньо тривалого функціонального стояння ортопедичної конструкції. Проте недостатньо щільне прилягання зруйнованої частини зуба із вкладкою також може сприяти проникненню карієсогенних факторів під конструкцію до порожнини зуба [18]. Розвиток вторинного карієсу після проведення реставрації незмінними конструкціями було продемонстровано в дослідженнях [2].

У нашому дослідженні найкращі результати отримані серед учасників дослідження, яким реставрацію зубів проведено з використанням цирконієвих вкладок. Цирконієві вкладки забезпечують найбільш ефективно закриття дефекту, а також є найбільш біосумісними за фізичними та хімічними властивостями [20]. Динаміка мікробіоти після заміщення дефектів коронкових частин зубів з використанням цирконієвих вкладок у нашому дослідженні була зіставна з опублікованими раніше результатами, де показано суттєве зменшення мікробного навантаження *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium spp.*, та *Corynebacterium anaerobium* порівняно з металокерамічними конструкціями [21].

Профіль чутливості до антибіотиків мікроорганізмів, асоційованих з розвитком карієсу коронкових частин. Усі ізоляти роду *Streptococcus* групи *viridans* були чутливими до β-лактамних антибіотиків, глікопептидів та макролідів. Чутливість до скринінгу з норфлораксацином становила 28,6% (n=22) ізолятів. Ізоляти, резистентні до скринінгу, протестовані індивідуально до левофлораксацину та моксифлораксацину – стійких не виявлено.

Аналогічно до групи *viridans*, усі культури *S. pyogenes* були сприйнятливими до скринінгу з

бензилпеніциліном, що вказувало на чутливість до всіх β-лактамних антибіотиків. Чутливість до скринінгів з норфлораксацином, еритроміцином та тетрацикліном також була абсолютною. Також не було ізолятів, стійких до глікопептидів та рифампіцину. Серед усіх ізолятів *S. pyogenes* сім були стійкими до хлорамфеніколу та триметоприм/сульфаметоксазолу.

За результатами тестування на чутливість до цефокситину, 23,8% культур роду *Staphylococcus* виявилися метицилін-резистентними. Такі ізоляти показували резистентність і до еритроміцину, гентаміцину, норфлораксацину та ципрофлораксацину, хлорамфеніколу та триметоприм-сульфаметоксазолу. Загалом чутливість роду *Staphylococcus* до норфлораксацину, еритроміцину та тетрацикліну становила 80,9%, 57,2% та 95,2% відповідно. Чутливими до всіх аміноглікозидів були 71,4% культур.

Представники Enterobacterales мали хіміотерапевтичну чутливість, яка значно коливалася залежно від групи протимікробних засобів. Сприйнятливими до ампіциліну та амоксициліну виявилися лише 21,7% ізолятів, проте чутливість до ампіцилін/сульбактаму, піперациліну, піперацилін/тазобактаму, тикарциліну та тикарциліну/клавуланової кислоти коливалася в межах 52,2,0 – 82,6%. Чутливість до цефалоспоринів була варіабельною – найкращі результати отримані для цефідероколу та цефтолозан/тазобактаму (100%), а також цефтазидиму, цефтазидим/авібактаму та цефепіму – 69,6%, 91,3% і 73,9% відповідно. Шляхом використання дисків з фенілбороновою кислотою, етилендіамінтетраоцтовою кислотою та клоксациліном встановлено, що отримані резистентні культури були продуцентами карбапенемаз класу А (n=3) та містили AmpC (n=3).

Чутливість до карбапенемів (доріпінем, іміпенем, іміпенем-релебактам, меропенем, меропенем-ваборбактам) коливалася в межах 52,2% – 100%, з мінімальними показниками для ертапенему і максимальними для іміпенему-релебактаму.

За результатами скринінгу до норфлораксацину, чутливість до фторхінолонів становила 21,7%, але стійкі до норфлораксацину ізоляти були протестовані індивідуально до ципрофлораксацину, левофлораксацину та моксифлораксацину – показники сприйнятливості коливалися в межах 43,5-60,9%.

Усі культури роду НФГНМО були чутливими до іміпенему – релебактаму та тобраміцину. Чутливість до амікацину була на середньому рівні – 54,5%. Продуцентами карбапенемаз були щонайменше 63,6% досліджуваних культур. За результатами тестування на фенотип резистентності

встановлено, що 36,3% ізолятів НФГНМО були продуцентами метало- β -лактамаз.

Опубліковані керівництва EUCAST з додатками та оновленнями містять рекомендації щодо тестування на чутливість до антибіотиків строгих анаеробів, зокрема – *Bacteroides* (включаючи *Porphyromonas*), *Veilonella spp.* та *Fusobacterium spp.* Строгі анаероби загалом мали хорошу хіміотерапевтичну чутливість. Сприйнятливості до метронідазолу була абсолютною. Чутливість до β -лактамів становила 78,0% для піперациліну-тазобактаму та 91,5% для меропенему. Чутливими до кліндаміцину були 84,7% отриманих культур. Чутливість до бензилпеніциліну в *Bacteroides spp.* та *Veilonellaspp.* становила 52,4%.

У 2019 році Центр з контролю і профілактики захворювань (CDC) опублікував перелік патогенів, що становлять глобальну загрозу людству. Серед інших до них належать карбапенем-стійкі *Acinetobacter*, карбапенем-стійкі Enterobacterales, метицилін-резистентні *Staphylococcus aureus*, еритроміцин-стійкі *Streptococcus A*, кліндаміцин-стійкі *Streptococcus B* [22]. Зазначені збудники часто асоційовані з гнійно-запальними процесами, зокрема в ротовій порожнині, а тому раціоналізація впливу на них є актуальним питанням сьогодення.

Стійкість до антибіотиків – це глобальна проблема. У країнах з низьким та середнім рівнем доходу проблеми є значними через слабкість лабораторних потужностей та обмеженість ресурсів [23]. Дослідження чутливості карієсогенних збудників в Ефіопії також показало, що серед карієсогенних мікроорганізмів профіль розширеної лікарської стійкості мали 40,4% ізолятів, зокрема 39,1% *S. aureus* та 38,7% культур роду *Staphylococcus*. Автори також зазначають, що ізоляти збудників карієсу були наділені резистентністю щонайменше до одного антибіотика [24]. Дослідники в Нігерії виявили значну поширеність (до 100%) стійкості до фторхінолонів (ципрофлоксацину, офлоксацину) в їхній країні [25]. На відміну від їхніх результатів, у нашому дослідженні таких ізолятів не було.

Адгезивна здатність мікроорганізмів, асоційованих з розвитком карієсу коронкових частин зубів. Дослідження ефективності біоплівкоутворення культур роду *Staphylococcus*, *Streptococcus*, а також Enterobacterales та НФГНМО, отриманих від пацієнтів з каріозним ураженням коронкових частин зубів, показало, що всі клінічні ізоляти були здатні утворювати біоплівки.

Індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ) роду *Staphylococcus* становив 5,0 (95%ДІ 3,2-5,9)%. Між адгезивним потенціалом стафілококів

та їх біоплівко-утворювальною активністю існувала пряма кореляційна залежність, розрахунковий показник кореляції Спірмена $r_s=0,81$ (95%ДІ 0,71-0,93). При цьому 66,7% ізолятів мали помірну щільність утворення біоплівки, 28,6% – слабку, 4,7% – високу.

ІАМ роду *Streptococcus* становив 4,7 (95%ДІ 3,1 – 5,7)%. Між адгезивним потенціалом стрептококів та їх біоплівкоутворювальною активністю також існувала пряма кореляційна залежність, розрахунковий показник кореляції Спірмена $r_s=0,84$ (95%ДІ 0,72-0,93). При цьому 70,1% ізолятів мали помірну щільність утворення біоплівки, 26,0% – слабку, 3,9% – високу.

ІАМ Enterobacterales становив 6,5 (95%ДІ 4,0-7,1)%. Між адгезивним потенціалом Enterobacterales та біоплівкоутворювальною активністю існувала пряма кореляційна залежність, розрахунковий показник кореляції Спірмена $r_s=0,81$ (95% ДІ 0,45-0,95). При цьому 43,5% ізолятів мали помірну щільність утворення біоплівки, 26,1% – слабку, 30,4% – високу.

ІАМ роду НФГНМО становив 8,3 (95%ДІ 6,5-8,1)%. Між адгезивним потенціалом НФГНМО та біоплівкоутворювальною активністю існувала пряма кореляційна залежність, розрахунковий показник кореляції Спірмена $r_s=0,91$ (95% ДІ 0,73-0,96). При цьому половина ізолятів НФГНМО мала високі показники щільності утвореної біоплівки.

У нещодавньому дослідженні також було встановлено, що карієсогенні збудники є активними продуцентами біоплівок. Загалом результати узгоджуються з нашими. З отриманих у закордонному дослідженні 327 унікальних ізолятів бактерій 311 (95,1%) були визнані продуцентами біоплівкоутворювальними. Серед продуцентів 53,7% мали високу щільність біоплівки, 34,4% – помірну. Проте, на відміну від наших результатів, рід *Streptococcus*, а саме *S. mutans*, був активнішим продуцентом біоплівки порівняно із *S. aureus* та коагулаза-негативними видами роду *Staphylococcus* [23].

ВИСНОВКИ

1. Мікробіота ротової порожнини відіграє важливу роль у розвитку патологічних процесів у тканинах зуба, зокрема може бути пов'язаною з розвитком карієсу зубів. У нашому дослідженні мікробіоценоз ротової порожнини при каріозному процесі був багатим на відомі карієсогенні мікроорганізми, зокрема *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, а також містив опортуністичних збудників Enterobacterales, неферментуючі грамнегативні мікроорганізми та *Candida albicans*. Роль останніх у патології

людини на сьогодні залишається обговорюваною, але наші результати свідчать, що вона є значущою в патогенезі карієсу. Ще однією характеристикою при каріозному процесі є зменшення біологічного навантаження мікроорганізмами з відомими захисними властивостями, зокрема *Streptococcus salivarius*, *Aerococcus viridans* та *Veillonella spp.*

2. Підходи до корекції коронкових частин зубів, зруйнованих вище ясенного краю, мають різний вплив на оральний мікробіоценоз. При порівнянні наслідків корекції при використанні прямої реставрації, металокерамічних вкладок та цирконієвих вкладок виявлено, що останні мали найбільш сприятливий вплив на оральний мікробіоценоз. Використання цирконієвих вкладок призводило до накопичення коменсалів *Streptococcus salivarius* та *Aerococcus viridans*, а також найбільш вираженого, порівняно з іншими методами, наближення мікробного спектру до здорової когорти учасників дослідження, а значить – до стану еубіозу.

3. Мікроорганізми, пов'язані з розвитком каріозного процесу в тканині зуба, наділені високими вірулентними властивостями, зокрема резистентністю до антибіотиків. Отримання культур *Streptococcus* зі стійкістю до фторхінолонів, метицилін-резистентних ізолятів *Staphylococcus*, а також продуцентів бета-лактамаз розширеного спектру та карбапенемаз в Enterobacterales та неферментуючих грамнегативних мікроорганізмів насторожує, адже може бути пов'язане з подальшим горизонтальним переносом генів ре-

зистентності, а також, зокрема, позагоспітальною трансмісією стійких збудників. Тож підтримка стану еубіозу може розглядатися як компонент стримування поширення резистентності на видовому та популяційному рівні.

4. Опортуністи, пов'язані з розвитком карієсу, мають високі адгезивні властивості та здатність до утворення складних мікробних консорціумів – біоплівки, що ефективно конкурують за поживний субстрат у полімікробному середовищі. Тож така властивість є додатковим фактором стримування коменсальної колонізації та може призводити до подальших негативних зсувів в оральному мікробіоценозі.

5. Мікробіологічне дослідження в стоматології має розглядатися як один з об'єктивних методів оцінки здоров'я ротової порожнини, а також матиме переваги у виборі методу корекції дефектів коронкових частин зубів, а в ряді випадків й ухваленні інформованого рішення про призначення протимікробного лікування.

Внески авторів:

Сардиків С.А. – концептуалізація, методологія, дослідження, написання рукопису;

Іщенко О.В. – формальний аналіз, дослідження;

Фастовець О.О. – курація, рецензування, ведення, адміністрування.

Фінансування. Дослідження не має зовнішніх джерел фінансування.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

REFERENCES

- Giacaman RA, Fernández CE, Muñoz-Sandoval C, León S, García-Manríquez N, Echeverría C, et al. Understanding dental caries as a non-communicable and behavioral disease: Management implications. *Front Oral Health*. 2022;3:64479. doi: <https://doi.org/10.3389/froh.2022.764479>
- Thanetchaloempong W, Koontongkaew S, Utipan K. Fixed Orthodontic Treatment Increases Cariogenicity and Virulence Gene Expression in Dental Biofilm. *J Clin Med*. 2022;11(19):5860. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm11195860>
- Spatafora G, Li Y, He X, Cowan A, Tanner ACR. The Evolving Microbiome of Dental Caries. *Microorganisms*. 2024;12(1):121. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010121>
- Trottini M, Campus G, Corridore D, Cocco F, Cagetti MG, Vigo MI, et al. Assessing the Predictive Performance of Probabilistic Caries Risk Assessment Models: The Importance of Calibration. *Caries Res*. 2020;54(3):258-65. doi: <https://doi.org/10.1159/000507276>
- Carroll CK, Pfaller AM. *Manual of Clinical Microbiology*, 4 Volume Set. 13-st ed. ASM Books; 2023. 3456 p.
- Efimenko AO, Ishchenko OV. [Features of microbiological research in dental practice]. *Perspektyvy ta innovatsiyi nauky*. 2023;14(32):969-86. Ukrainian. doi: [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-969-986](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-969-986)
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0 [Internet]. 2023 [cited 2024 Mar 15]. Available from: <http://www.eucast.org>
- Ishchenko OV, Plotnikova MM, Stolyetova YuYu, Sharun OV, Stepanskyi DO. [The influence of different concentrations of pectin on the adhesive properties of clinical isolates obtained from patients with cystic fibrosis.] *Vistnyk problem biolohiyi i medytsyny*. 2020;1(155):137-40. Ukrainian. doi: <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2020-1-155-137-140>
- Toc DA, Csapai A, Popa F, Popa C, Pascalau V, et al. Easy and Affordable: A New Method for the Studying of Bacterial Biofilm Formation. *Cells*. 2022;11(24):4119. doi: <https://doi.org/10.3390/cells11244119>

10. Ryzhov OA, Penkin YuM. [Statistical methods of processing the results of medical and biological research]. *Magnolia*; 2022. 160 p. Ukrainian.
11. Zhang L, Chen X, Ren B, Zhou X, Cheng L. *Helicobacter pylori* in the Oral Cavity: Current Evidence and Potential Survival Strategies. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 7;23(21):13646. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms232113646>
12. Zhu Y, Wang Y, Zhang S, Li J, Li X, Ying, et al. Association of polymicrobial interactions with dental caries development and prevention. *Front Microbiol*. 2023;14:1237596. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1237596>
13. Lei L, Long L, Yang X, Qiu Y, Zeng Y, Hu T, et al. The VicRK Two-component system regulates *Streptococcus mutans* virulence. *Curr Issues Mol Biol*. 2019;32:167-200. doi: <https://doi.org/10.21775/cimb.032.167>
14. Acet Ö, Erdönmez D, Acet B, Odabaşı M. N-acyl homoserine lactone molecules assisted quorum sensing: Effects consequences and monitoring of bacteria talking in real life. *Arch Microbiol*. 2021;203:3739-49. doi: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02381-9>
15. Lu Y, Lin Y, Li M, He J. Roles of *Streptococcus mutans*-*Candida albicans* interaction in early childhood caries: a literature review. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023 May 16;13:1151532. doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1151532>
16. Li Y, Huang S, Du J, Wu M, Huang X. Current and prospective therapeutic strategies: tackling *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* cross-kingdom biofilm. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1106231. doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1106231>
17. Kim HE, Liu Y, Dhall A, Bawazir M, Koo H, Hwang G. Synergism of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* Reinforces Biofilm Maturation and Acidogenicity in Saliva: An In Vitro Study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Feb 19;10:623980. doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.623980>
18. Contaldo M, Lucchese A, Lajolo C, Rupe C, Di Stasio D, Romano A, et al. The Oral Microbiota Changes in Orthodontic Patients and Effects on Oral Health: An Overview. *J Clin Med*. 2021;10(4):780. doi: <https://doi.org/10.3390/jcm10040780>
19. Ionescu AC, Hahnel S, Delvecchio P, Ilie N, Moldovan M, Zambelli V, et al. Microbiological models for accelerated development of secondary caries in vitro. *J Dent*. 2022;127:104333. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2022.104333>
20. Bollen C, Hakobayan G, Jörgens M. One-piece versus two-piece ceramic dental implants. *Br Dent J*. 2024;236(5):383-7. doi: <https://doi.org/10.1038/s41415-024-7123-3>
21. D'Ambrosio F, Santella B, Di Palo MP, Giordano F, Lo Giudice R. Characterization of the Oral Microbiome in Wearers of Fixed and Removable Implant or Non-Implant-Supported Prosthesis in Healthy and Pathological Oral Conditions: A Narrative Review. *Microorganisms*. 2023;11(4):1041. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041041>
22. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC [Internet]. 2019 [cited 2024 Mar 15]. doi: <http://dx.doi.org/10.15620/cdc:82532>
23. Iskandar K, Molinier L, Hallit S, Sartelli M, Hardcastle TC, Haque M, et al. Surveillance of antimicrobial resistance in low- and middle-income countries: a scattered picture. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021;10(1):63. doi: <https://doi.org/10.1186/s13756-021-00931-w>
24. Kiros A, Saravanan M, Niguse S, Gebregziabher D, Kahsay G, Dhandapani R, et al. Bacterial Profile, Antimicrobial Susceptibility Pattern, and Associated Factors among Dental Caries-Suspected Patients Attending the Ayder Comprehensive Specialized Hospital and Private Dental Clinic in Mekelle, Northern Ethiopia. *Biomed Res Int*. 2022;2022:3463472. doi: <https://doi.org/10.1155/2022/3463472>
25. Philips OO, Timothy O, Charlse II, Osamuyimen I. Susceptibility Pattern of Bacterial Isolates from Dental Caries Patients Attending Clinic at Irrua Specialist Teaching Hospital, Irrua, Nigeria. *J Biomed Res Environ Sci*. 2021;2(9):784-9. doi: <https://doi.org/10.37871/jbres1311>

Стаття надійшла до редакції 02.04.2024;
затверджена до публікації 01.07.2024

