

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ДНІПРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова праця  
на правах рукопису

ЄФІМЕНКО АНАСТАСІЯ ОЛЕГІВНА

579:616.314-089.843-06-022.7-093(043.3/.5)

## ДИСЕРТАЦІЯ

### **«ВЛАСТИВОСТІ ОРАЛЬНОГО МІКРОБІОЦЕНОЗУ, АСОЦІЙОВАНОГО З ІНФЕКЦІЙНИМИ УСКЛАДНЕННЯМИ ДЕНТАЛЬНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ ТА МІКРОБІОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ВПЛИВУ НА НЬОГО»**

спеціальність – 222 «Медицина»

галузь знань – 22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Анастасія ЄФІМЕНКО

Науковий керівник – Дмитро Олександрович Степанський, доктор медичних наук, професор

Дніпро – 2023 р.

## АНОТАЦІЯ

*Єфіменко А. О.* «Властивості орального мікробіоценозу, асоційованого з інфекційними ускладненнями дентальної імплантації та мікробіологічне обґрунтування впливу на нього». – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії, галузь знань – 22 «Охорона здоров'я», спеціальність – 222 «Медицина». – Міністерство охорони здоров'я України, Дніпровський державний медичний університет, Дніпро, 2023 р.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології й медико-біологічної фізики та інформатики Дніпровського державного медичного університету. Дисертація є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології й медико-біологічної фізики та інформатики та кафедри біохімії та медичної хімії Дніпровського державного медичного університету «Багатофункціональні полімерні матеріали з потужними антимікробними властивостями для антисептичної обробки ранових поверхонь та знезараження повітря і води» (№ державної реєстрації 0120U101548), термін виконання 01.2019 – 11.2022 р. р.

Дисертація присвячена мікробіологічному обґрунтуванню етіотропного впливу на мікробіоту, асоційовану з інфекційними ускладненнями дентальної імплантації.

В ході досліджень вивчено склад біоплівки, що колонізує поверхню періімплантних тканини, та встановлено відмінності в мікробному спектрі при інфекційно-запальних ускладненнях дентальної імплантації та при стоянні здорового імплантату. Описано біологічні особливості мікроорганізмів, які колонізують періімплантаційну ділянку слизової оболонки ротової порожнини; вперше з мікробіологічної точки зору *in vitro* обґрунтовано доцільність застосування антисептика природного походження N-

хлортуарину (NCT) для контролю мікробного росту при інфекційно-запальних ускладненнях дентальної імплантації.

Дослідження проведене за участі дослідної та контрольної групи. Загалом досліджено 127 набори зразків від 103 пацієнтів. До дослідної групи належали пацієнти з імплантатами, які необхідно було видалити в період остеоінтеграції (рання втрата, 44 пацієнтів з 55 імплантатом) або після періоду загоєння (пізня втрата, 32 пацієнтів з 42 імплантатами). Групи втрат імплантатів порівнювали з контрольною групою – пацієнти без втрати кісткової тканини щонайменше через чотири місяці після встановлення імплантату (27 пацієнтів з 30 імплантатами).

Встановлено, що біоплівка пошкоджених зубних імплантатів є неоднорідною. Основними інфекційними агентами, асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації, були *Staphylococcus spp.*, *Porphyromonas spp.* та *Fusobacterium spp.* Видовий склад мікробіоти періімплантної ділянки з гнійно-запальним потенціалом відрізнявся більшою питомою вагою родів *Fusobacterium* і *Porphyromonas*, особливо при пізній втраті імплантату. Рання втрата дентального протезу була пов'язана з надмірним росту мікроорганізмів виділенням *Haemophilus spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Actinomycetales*, *Staphylococcus aureus*. Біоплівка періімплантної ділянки здорових імплантатів мала більшу різноманітність та включала роди *Aerococcus*, *Peptostreptococcus* та *Prevotella*.

В дослідженні також встановлено спектр факторів, пов'язаних з ускладненням дентальної імплантації, та доведено роль мікробіоти в розвитку гнійно-запальних процесів в ділянці стояння дентального імплантату. В групі втрати імплантату куріння відмічали в 62,2% випадків – проти 26,5% в контрольній групі ( $p < 0,01$ ). Для групи втрати імплантату також було характерним діагностування пародонтиту. Пацієнти з втратою імплантату мали пародонтит у 66,7% випадків, контрольна група – 26,5% ( $p < 0,01$ ). При чому така тенденція однаково зберігалася, як при ранній, так і при пізній втраті імплантату ( $p > 0,05$ ). Регулярне полоскання порожнини рота також достовірно

впливало на збереження імплантату – в дослідній групі регулярно полоскання порожнини рота практикували в 20,7% випадків, в контрольній – 41,2% ( $p < 0,05$ ).

Натомість інші фактори, зокрема область імплантації та стать не мали достовірного впливу на наслідки одонтоімплантації ( $p > 0,05$ )

При вивченні біологічних властивостей мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації, показано важливість моніторингу спеціальних морфотипів традиційних патогенів, зокрема малих колоніальних форм (МКФ) *S. aureus*. Мікробіота порожнини рота при гнійно-запальних процесах периімплантних тканини мала виокі біоплівко-утворювальні та адгезивні властивості, а між адгезивним потенціалом мікроорганізмів та щільністю утвореної ними біоплівки існував прямий сильний кореляційний зв'язок – *S. aureus*  $r_s = 0,85$  (95%ДІ 0,71-0,93); *Streptococcus spp.*  $r_s = 0,84$  (95%ДІ 0,72-0,93), *Klebsiella pneumoniae*  $r_s = 0,81$  (95%ДІ 0,45-0,95), *Acinetobacter spp.*  $r_s = 0,98$  (95%ДІ 0,72-0,99).

При проведенні дисертаційного дослідження отримано важливі знання про чутливість етіологічно значущих збудників інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації до антибіотиків. Отримані результати свідчать про високий профіль резистентності мікробіоти ротової порожнини. Метицилін-резистентними були 34,4% ізолятів роду *Staphylococcus*. Тестування на скринінг до норфлоксацину та еритроміцину також продемонструвало низькі показники чутливості – 25,0% і 28,1% відповідно. Високим профілем стійкості також були наділені культури родів *Klebsiella* та *Acinetobacter*. Серед ізолятів *K. pneumoniae* та *Acinetobacter spp.* профіль розширеної лікарської стійкості мали 50% ( $n = 6$ ) та 100% ( $n = 6$ ) культур відповідно. Загалом чутливість ізолятів *K. pneumoniae* значно коливалася в залежності від групи протимікробних засобів. Сприйнятливими до ампіциліну та амоксициліну виявилися лише 20% ізолятів, проте чутливість до ампіцилін/сульбактаму, піперациліну, піперацилін/тазобактаму, тікарциліну та тікарциліну/клавуланової кислоти коливалася в межах 50,0 – 80,0%. Серед

цефалоспоринів найкращі результати отримані для цефідероколу та цефтолозан/ тазобактаму (100%), а також цефтазідиму, цефтазідім/ авібактаму та цефепіму – 70%, 90% і 70% відповідно. Чутливість до карбапенемів знаходилася в межах 40% – 100%. Чутливість до скринінгу з диском норфлоксацину становила 20%. Стійкі до норфлоксацину ізоляти були протестовані індивідуально – показники сприйнятливості коливалися в межах 40 – 60%. Чутливість *K. pneumoniae* до аміноглікозидів була високою.

Враховуючи високі адгезивні властивості та профіль чутливості до антибіотиків, на наступному етапі дисертаційного дослідження проводили дослідження ефективності антисептика природного походження NCT проти мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації. На планктонних культурах показано, що мілімолярна концентрація NCT забезпечує зменшення мікробного навантаження щонайменше на 2 lg КУО/мл кроки вже через 10 хв від початку дослідження. При чому на ранніх етапах (до 20 хв) грам-позитивні мікроорганізми виявилися більш чутливими ( $p < 0,05$ ). Мінімальне, або невизначене мікробне навантаження, планктонних культур відзначалося вже через 30 хв від початку дослідження ( $p < 0,05$ ).

Багатообіцяючі результати отримані і на біоплівках, вирощених протягом тривалого часу на титанових імплантатах, які, зазвичай, застосовуються в ортопедичній стоматології. Ефективний кліренс протягом 30 хв експозиції NCT відзначали для всіх досліджуваних культур незалежно від віку біоплівки. При чому пролонгація досліду до 3 год не додавала значущості ( $p > 0,05$ ). Метаболічний зсув після інкубації в 1% NCT протягом 30 хв, 1 год та 3 год реєстрували за допомогою аналізу ХТТ. Досліджувана концентрація NCT значно знижувала метаболізм у мікробних клітинах вже протягом перших 30 хв інкубації ( $p < 0,05$ ). Але пролонгація часу експозиції до 3-год також не дала статистично значущих результатів ( $p > 0,05$ ).

Досліджуваний 1% розчин NCT показував свою ефективність при експресії різних механізмів стійкості до антибіотиків. Метицилін-резистентні культури *Staphylococcus* мали аналогічну чутливість до метицилін-чутливих

культур ( $p > 0,05$ ); аналогічно продуценти карбапенемаз класу А та метало- $\beta$ -лактамаз піддавалися кліренсу за допомогою NCT, як і відповідні умовно-чутливі ізоляти ( $p > 0,05$ ).

Тож, спектр колонізаторів периімплантних тканин та їх вірулентні властивості є факторами, що відіграють важливу роль в розвитку гнійно-запальних процесів в ділянці стояння протезу. З врахуванням високого профілю резистентності до антибіотиків у мікроорганізмів, пошук альтернативних стратегій впливу на біоплівку є актуальним питанням сучасної науки. Нами показано, що мілімолярні концентрації NCT є ефективними *in vitro* для контролю мікробного навантаження протягом відносно нетривалого часу експозиції (від 30 хв) та незалежно від механізмів набутої резистентності у патогенів.

**Ключові слова:** мікробіоценоз, мікробіота, мікробна флора, дисбіоз, мікробіологічний профіль, мікробіологічний моніторинг, мікробіологічне дослідження, мікроорганізми, бактерії, патогени, інфекція, інфекційні ускладнення, дентальний імплантат, ускладнення дентальної імплантації, периімлантит, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Candida*, анаеробні мікроорганізми, біоплівка, інтенсивність біоплівкоутворення, оральний мікробіом, N-хлортаурин, антибіоплівкова активність, протимікробна дія, антимікробна активність, бактерицидна активність, фунгіцидна активність, вплив, ефективність лікування, антибіотикорезистентність, множинна лікарська стійкість бактерій, протиінфекційні агенти.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. Efimenko A., Ishchenko O., Stepanskyi O., Stepanskyi D. Microbiological features of *Staphylococcus* associated with complications of dental implantation. *Wiadomości Lekarskie Medical Advances*. 2023; 76 (5, p. I): 936-943.

<https://doi.10.36740/WLek202305107>. (Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті)

2. Єфіменко А. О., Степанський О. Д., Богомольна Л. О., Кошова І. П., Іщенко О. В. Мікробіологічні особливості мікробіоценозу периімплантатної ділянки при ранніх та пізніх ускладненнях дентальної імплантації. *Вісник проблем біології і медицини*. 2023; № 1 (168): 291–300.

<https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-1-168-291-300> (Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті)

3. Efimenko A. O., Stepanskyi O. D., Bogomolny L. O., Ishchenko O. V. Effect of N-chlorotaurine on biofilms of pathogens associated with complications of dental implantation. *Вісник проблем біології і медицини*. 2023; № 2 (169): 432-437.

<https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-2-169-432-437>. (Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті)

4. Єфіменко А. О., Іщенко О. В. Особливості мікробіологічних досліджень в стоматологічній практиці. *Перспективи та інновації науки (Серія «Медицина»)*. 2023; 14 (32): 969-986.

[https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-969-986](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-969-986) (Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті).

5. Єфіменко А. О., Степанський О. Д., Богомольна Л. В., Жерносекова І. В., Іщенко О. В. Етіологічна характеристика втрати зубного імплантату (огляд літератури). Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. 2023; 3 (23): 188–192. <https://doi.org/10.31718/2077-1096.23.3.188> (Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні статті)

*Наукові праці, які засвідчують апробацію дисертації*

1. Efimenko A., Stepanskiy O., Ishchenko O. Microbial etiology of dental implantation failure. Мультидисциплінарний підхід в діагностиці та лікуванні стоматологічних захворювань. Тернопіль, 2022; Постер 33. (Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез).

2. Efimenko A., Stepanskiy D. Changed microbiological features of microorganisms associated with dental implantation failure. The 32-nd European Congress on Clinical Microbiology and Infectious diseases. Lisbon (Portugal), 23.04.2022 – 26.04.2022. ESCMID eLibrary, 2022: 1489. (Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез).

3. Efimenko A., Ishchenko O. Practical significance of microbiological research in dental practice. International scientific journal «Grail of Science». 2023; 32: Proceedings of the VI Correspondence International Scientific and Practical Conference Globalization of scientific knowledge: international cooperation and integration of sciences». Vinnytsia (Ukraine) – Vienna (Austria), 13.10.2023: 392 – 393. <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.13.10.2023.075> (Особистий внесок – брала участь у плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез).

4. Efimenko A., Stepanskyi O. Microbiological aspects of dental implantation failure. Матеріали науково-практичної конференції «Бабенківські читання 26-27 жовтня 2023». 2023: 3. (Особистий внесок – брала участь у



плануванні дослідження, формуванні груп, зборі даних, статистичному аналізі та інтерпретації результатів, написанні тез).

## ANNOTATION

*Efimenko A. O.* Properties of oral microbiocenosis associated with infectious complications of dental implantation and microbiological substantiation of its modification. – Qualification scientific work with the manuscript copyright.

The thesis for a Doctor of Philosophy degree in the specialty 222 «Medicine» – Dnipro State Medical University, Dnipro, 2023.

The dissertation was performed in the department of microbiology, virology, immunology, epidemiology and medical-biological physics and informatics, Dnipro State Medical University. The dissertation is a fragment of the research work of the department of microbiology, virology, immunology and epidemiology and the department of biochemistry and medical chemistry of the Dnipro State Medical University, «Multifunctional polymer materials with strong antimicrobial properties for wound surfaces and air antiseptic processing and water disinfection» (state registration № 0120U101548), terms of performing 01.2019–11.2022.

The dissertation is devoted to the microbiological substantiation of the improvement of the etiotropic effectiveness on the microbial landscape of the dental implant site based on the study of the spectrum of its colonizers, their sensitivity to antibiotics and antiseptic of natural origin.

During research, the composition of the biofilm colonizing the surface of peri-implant tissues was studied, and the differences in the microbial spectrum of infectious-inflammatory complications of dental implantation and in the presence of a healthy implant were established. The biological features of microorganisms colonizing the peri-implantation area are described; from a microbiological point of view in vitro, the expediency of natural origin antiseptic N-chlorotaurine (NCT) to control microbial growth in infectious-inflammatory complications of dental implantation was substantiated.

The study was conducted with the participation of the experimental and control groups. A total of 127 sets of samples from 103 patients were examined. The study group included patients with implants that had to be removed during the period

of osseointegration (early loss, 44 patients with 55 implants) or after the healing period (late loss, 32 patients with 42 implants). The implant loss groups were compared with a control group without prosthesis loss at least four months after implant placement (27 patients with 30 implants).

It was established that the biofilm of damaged dental implants is heterogeneous. The main infectious agents associated with complications of dental implantation were *Staphylococcus spp.*, *Porphyromonas spp.* and *Fusobacterium spp.* The species composition of the microbiota of the peri-implant area with purulent-inflammatory potential was distinguished by a higher specific weight of the genera *Fusobacterium* and *Porphyromonas*, especially in late implant loss. Early loss of the dental prosthesis was associated with overgrowth of microorganisms *Haemophilus spp.*, *S. pyogenes*, *Actinomycetales*, and *S. aureus*. The biofilm of the peri-implant area of healthy implants was more diverse and included the genera *Aerococcus*, *Peptostreptococcus* and *Prevotella*.

The study also established a spectrum of factors associated with dental implantation complications. The role of oral microbiota in the development of purulent-inflammatory processes in the area where the dental implant is located was proved. In the implant loss group, smoking was noted in 62.2% of cases - against 26.5% in the control group ( $p < 0.01$ ). The diagnosis of periodontitis was also typical for the implant loss group. Patients with implant loss had periodontitis in 66.7% of cases, the control group - 26.5% ( $p < 0.01$ ). Moreover, such a tendency was equally preserved, both with early and with late loss of the implant ( $p > 0.05$ ). Regular rinsing of the oral cavity also reliably influenced the preservation of the implant - in the experimental group, regular rinsing of the oral cavity was practiced in 20.7% of cases, in the control group - 41.2% ( $p < 0.05$ ).

On the other hand, other factors, in particular the area of implantation and gender had no significant influence on the results of odontoimplantation ( $p > 0.05$ ).

When studying the biological properties of microorganisms associated with complications of dental implantation, the importance of monitoring special morphotypes of traditional pathogens, in particular small colonial variants (SCV) of

*Staphylococcus aureus*, was shown. The microbiota of the oral cavity during purulent-inflammatory processes of peri-implant tissue had strong biofilm-forming and adhesive properties, and there was a direct strong correlation between the adhesive potential of microorganisms and the density of the biofilm formed by them - *S. aureus*  $r_s = 0.85$  (95% CI 0.71-0.93); *Streptococcus spp.* 0.84 (95% CI 0.72-0.93), *K. pneumoniae*  $r_s = 0.81$  (95% CI 0.45-0.95), *Acinetobacter spp.*  $r_s = 0.98$  (95% CI 0.72-0.99).

During the dissertation research, important knowledge was obtained about the sensitivity of etiologically significant pathogens of infectious and inflammatory complications of odontoimplantation to antibiotics. The obtained results indicated a high profile of oral microbiota resistance. Among all, 34.4% of *Staphylococcus* isolates were methicillin resistant. Screening tests with norfloxacin and erythromycin also showed low sensitivity rates of 25% and 28%, respectively. Isolates of genera *Klebsiella* and *Acinetobacter* also had a high resistance profile. Among isolates of *K. pneumoniae* and *Acinetobacter spp.*, 50% and 100% cultures had an extended drug resistance profile, respectively. In general, the sensitivity of *K. pneumoniae* varied significantly depending on the group of antimicrobial agents. Only 20% of the isolates were susceptible to ampicillin and amoxicillin, but sensitivity to ampicillin/sulbactam, piperacillin, piperacillin/ tazobactam, ticarcillin and ticarcillin/clavulanic acid ranged from 50.0 to 80.0%. Among cephalosporins, the best results were obtained for cefiderocol and ceftolozan/tazobactam (100%), as well as ceftazidime, ceftazidime/avibactam and cefepime - 70%, 90% and 70%, respectively. Sensitivity to carbapenems was in the range of 40% - 100%. The sensitivity of screening with the norfloxacin disc was 20%. Norfloxacin-resistant isolates were tested individually - susceptibility rates ranged from 40 to 60%. The sensitivity of *K. pneumoniae* to aminoglycosides was high.

Considering high adhesive properties and sensitivity profile to antibiotics, at the next stage of the dissertation research, the effectiveness of natural antiseptic NCT against microorganisms associated with complications of dental implantation was investigated.

It was shown on plankton cultures that a micromolar concentration of NCT provides a reduction of the microbial load by at least 2 lg CFU/ml steps already 10 minutes after the start of the study. A minimal or undetermined microbial load of plankton cultures was noted already after 30 min.

Promising results were also obtained on biofilms grown for a long time on titanium implants, which are usually used in orthopedic dentistry. Effective clearance within 30 min. NCT exposures were noted for all studied cultures regardless of biofilm age. Extension of the experiment up to 3 h did not add significance ( $p>0.05$ ). Metabolic shift after incubation in 1% NCT for 30 minutes, 1 hour and 3 hours was recorded by XTT assay. The investigated concentration of NCT significantly reduced the metabolism in microbial cells already within the first 30 min. incubation but extending the exposure time up to 3 hours also did not add statistically significant results ( $p>0.05$ ).

The tested 1% NCT solution showed its effectiveness in the expression of various mechanisms of resistance to antibiotics. Methicillin-resistant *Staphylococcus* cultures had a similar sensitivity to methicillin-sensitive cultures ( $p>0.05$ ); similarly, class A carbapenemase and metallo- $\beta$ -lactamase producers were cleared by NCT, as did the corresponding conditionally susceptible isolates ( $U = 20$ ;  $p>0.05$ ).

Therefore, the range of colonizers of peri-implant tissues and their virulent properties are factors that play an important role in the development of purulent-inflammatory processes in the area where the prosthesis is positioned. Considering the high profile of resistance to antibiotics, the search for alternative strategies of impact on the biofilm is an urgent issue of modern science. We have shown that micromolar concentrations of NCT are effective in vitro for controlling microbial load during a relatively short exposure time (from 30 min.) and regardless of mechanisms of acquired resistance in pathogens.

**Key words:** microbiocenosis, microbiota, microbial flora, dysbiosis, microbiological profile, microbiological monitoring, microbiological study, microorganisms, bacteria, pathogens, infection, infectious complications, dental

implantation, complications of dental implantation, peri-implantitis, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Candida*, anaerobic microorganisms, biofilm, intensity of biofilm formation, oral microbiome, N-chlorotaurine, antibiofilm formation activity, antimicrobial action, antimicrobial activity, bactericidal activity, fungicidal activity, impact, treatment efficiency, antibiotic resistance, bacterial multiply drug resistance, anti-infective agents.

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1 ЕТІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВТРАТИ ЗУБНОГО ІМПЛАНТАТУ (огляд літератури) .....	27
1.1 Сучасний стан проблеми інфекційних ускладнень дентальної імплантації .....	27
1.2 Мікробна етіологія запалення в ділянці стояння дентального імплантату .....	32
1.3 Патогенні властивості оральної мікробіоти, пов'язанні з запаленням в ділянці імплантації .....	38
1.4 Сучасні підходи до менеджменту інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації.....	42
1.5 Перспектива топічного використання антисептика N-хлортаурину для корекції орального мікробіоценозу .....	45
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	50
2.1 Дизайн дослідження.....	50
2.2 Загальна характеристика пацієнтів задіяних в дослідженні.....	51
2.3 Методи досліджень .....	52
2.3.1 Виділення чистої культури та її ідентифікація .....	53
2.3.2 Визначення чутливості до протимікробних засобів.....	56
2.3.3 Визначення адгезивних властивостей отриманих культур.....	59
2.3.4 Визначення біоплівко-утворювальних властивостей отриманих культур.....	60
2.3.5 Визначення впливу NCT на планктонні форми мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації.....	62
2.3.6 Визначення впливу NCT на тривало сформовану біоплівку.....	63
2.3.7 Визначення впливу NCT метаболічну активність досліджуваних культур.....	64
2.4 Методи статистичного аналізу отриманих результатів .....	65

РОЗДІЛ 3_МІКРОБНИЙ ПРОФІЛЬ ПЕРИІМПЛАНТНОЇ ДІЛЯНКИ УЧАСНИКІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	67
3.1 Конститутивні фактори, пов'язані з розвитком інфекційно-запальних процесів в ділянці стояння імплантату .....	67
3.2. Мікробіологічна характеристика мікросередовища ротової порожнини в ділянці імплантації .....	69
3.3 Узагальнення результатів дослідження .....	74
РОЗДІЛ 4_БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ, ПОВ'ЯЗАНИХ З УСКЛАДНЕННЯМИ ДЕНТАЛЬНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ .....	75
4.1 Біологічні особливості ізолятів роду <i>Staphylococcus</i> .....	75
4.2 Біологічні особливості каталаза-негативних грам-позитивних коків....	80
4.3 Біологічні особливості невибагливих грам-негативних паличок .....	84
4.4 Біологічні особливості строгих анаеробів .....	88
4.5 Здатність до утворення біоплівки мікроорганізмами, асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації .....	91
4.5.1 Особливості біоплівкоутворення мікроорганізмами роду <i>Staphylococcus</i> , асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації .....	91
4.5.2 Особливості біоплівкоутворення мікроорганізмами роду <i>Streptococcus</i> , асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації .....	93
4.5.2 Особливості біоплівкоутворення мікроорганізмами роду <i>Klebsiella</i> , асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації .....	94
4.5.3 Особливості біоплівкоутворення мікроорганізмами роду <i>Acinetobacter</i> , асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації .....	95
4.6 Узагальнення результатів дослідження .....	96
РОЗДІЛ 5_ВПЛИВ N-ХЛОРТАУРИНУ НА ВІРУЛЕНТНІСТЬ ЗБУДНИКІВ, АСОЦІЙОВАНИХ З УСКЛАДНЕННЯМИ ДЕНТАЛЬНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ .....	98
5.1 Вплив NCT на планктонні форми мікроорганізмів, асоційованих з ускладненням дентальної імплантації.....	98
5.1.1 Вивчення ефективності NCT методом дифузії в агар .....	99



5.1.2 Вивчення динаміки впливу NCT на життєздатність планктонних форм мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації ....	100
5.2 Вплив NCT на тривало сформовану біоплівку на поверхні титанових імплантатів in vitro .....	102
5.2.1 Вплив NCT на біоплівкові форми мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації .....	103
5.2.2 Вплив NCT на метаболічну активність біоплівкових форм мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації ....	106
5.3 Узагальнення результатів дослідження .....	107
ВИСНОВКИ.....	109
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	112
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	113
ДОДАТКИ.....	132

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ

95%ДІ	–	95% довірчий інтервал
m	–	Стандартна похибка середньої величини
MRSA	–	Метицилін-резистентний <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	–	Метицилін-резистентний <i>Staphylococcus epidermidis</i>
NCT	–	N – хлортаурин
$\chi^2$	–	Критерій Хі-квадрат Пірсона
АФК	–	Активні форми кисню
БЛРС	–	В-лактамази розширеного спектру
ВООЗ	–	Всесвітня організація охорони здоров'я
IAM	–	Індекс адгезивності мікроорганізмів
КУЕ	–	Коефіцієнт участі еритроцитів
КУО	–	Колонієутворююча одиниця
M	–	Середня арифметична величина
Me	–	Медіана
МІК	–	Мінімальна інгібуюча концентрація
МКФ	–	Малі колоніальні форми, small colony variants
МПА	–	М'ясо-пептонний агар
МХА	–	Агар Мюллера-Хінтона
МХА-К	–	Агар Мюллера-Хінтона з додаванням 5% дефібринованої крові

НФГНМО	– Неферментуючі грам-негативні мікроорганізми
Од. ОЩ	– Одиниця оптичної щільності
СПА	– Середній показник адгезії
ТСБ	– Триптозно-соєвий бульйон

## ВСТУП

### **Обґрунтування вибору теми дослідження.**

Дентальна імплантація є популярною процедурою в сучасній стоматології адже дозволяє забезпечити відновлення фізіології жування, прикус та скоригувати косметичний дефект [1, 2, 3]. Тим не менш, ряд факторів можуть негативно впливати на функціонування та тривалість стояння імплантату [4]. Існують різні теорії щодо причин відторгнення імплантату [5, 6]. В ряді досліджень говориться про важливість характеристик самого протезу – зокрема його профіль та кут виходу реставрації – протези з надмірним контуром мають вищий ризик розвитку періімплантиту [7]. Проте останнім часом активно обговорюється роль мікробіоти в розвитку періімплантного запалення. Було показано, що, оскільки пародонт і періімплантатна кишеня/ борозни є подібними мікросередовищами, розташованими в одній екосистемі – ротовій порожнині, щонайменше пародонтальні патогени можуть бути асоційовані з ускладненнями дентальної імплантації [8].

Відомо шість груп мікроорганізмів, які потенційно можуть входити до дентальної біоплівки. Жовтий комплекс включає представників роду *Streptococcus*, зелений – рід *Capnocytophaga*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* серотип А, *Eikenella corrodens* та *Campylobacter spp.*, фіолетовий – *Veillonella parvula* та *Actinomyces odontolyticus*. Ці групи мікроорганізмів, зазвичай, першими колонізують поверхню зуба і є попередниками оранжевого та червоного комплексів, представлених здебільшого грам-негативними бактеріями [9]. Оранжевий комплекс включає *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Pacificastacus nigrescens* та *Streptococcus constellatus*; червоний – *Tannerella forsythus*, *Porphyromonas*

*gingivalis* та *Trponema denticola*. Останні дві групи мікроорганізмів розглядаються, як основні патогени захворювання тканин зуба. Відомо, що бактерії червоної групи в зразках зубного нальоту зустрічаються в асоціаціях, які часто прилягають до епітеліального покриття пародонтальної кишені в більш глибоких областях. Причиною такого розташування, в основному, є особливості їх міжвидової взаємодії, ко-агрегація та метаболічна взаємозалежність [9, 10].

Тож, мікробіота, що потенційно може бути асоційована з ускладненнями дентальної імплантації є різноманітною. Окрім перерахованих вище, опортуністи, також можуть бути причиною запалення тканини навколо зубного імплантату. Зрозуміло, такі мікроорганізми наділені високими вірулентним властивостями. Їх здатність до біоплівкових форм життя створює виклики для ефективного лікування та пов'язана з терапевтичними невдачами. Застосування сучасних антиадгезійних стратегій для поверхонь титанових імплантатів має вирішальне значення для захисту від прилипання патогенних мікробів. Системне призначення антибіотиків при проведенні дентальної імплантації може бути пов'язане з розвитком селекційного тиску на антимікробну резистентність. А тому, пошук альтернативних стратегій контролю мікробного росту може бути корисним для профілактики та лікування періімплантної інфекції [11]. В цьому контексті особливий інтерес представляє NCT – N-хлорпохідна амінокислоти таурину. NCT добре описані протизапальні властивості. Успішний синтез і можливості тривалого зберігання речовини у вигляді кристалічної солі роблять її перспективною для подальшого вивчення в якості антисептика ендogenous походження [12]. А тому вивчення його впливу на біоплівку титанових імплантатів є актуальним та необхідним питанням.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології й медико-біологічної фізики та інформатики Дніпровського державного медичного університету. Дисертація є фрагментом

науково-дослідної роботи кафедри мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології та кафедри біохімії та медичної хімії Дніпровського державного медичного університету «Багатофункціональні полімерні матеріали з потужними антимікробними властивостями для антисептичної обробки ранових поверхонь та знезараження повітря і води» (№ державної реєстрації 0120U101548), термін виконання 01.2019 – 11.2022 р. р.

**Мета дослідження:** мікробіологічне обґрунтування етіотропного впливу на мікробіоту, асоційовану з інфекційними ускладненнями дентальної імплантації.

**Завдання дослідження:**

1. Визначити конститутивні фактори, пов'язані з розвитком запалення в ділянці стоянні зубного імплантату.
2. Вивчити склад мікробіоти ділянки стояння зубного імплантату.
3. Вивчити біологічні властивості мікроорганізмів, пов'язаних з ускладненнями дентальної імплантації, – морфологічні, тинкторіальні, біохімічні, адгезивні та біоплівкоутворювальні.
4. Вивчити профіль чутливості до антибіотиків мікроорганізмів, пов'язаних з ускладненнями дентальної імплантації.
5. Вивчити можливості впливу НСТ на ростові показники планктонної та біоплівкової форм отриманих ізолятів.

**Об'єкт дослідження:** мікробіота, асоційована з інфекційними ускладненнями дентальної імплантації.

**Предмет дослідження:** мікробіологічні особливості мікроорганізмів, пов'язаних з ускладненнями дентальної імплантації, та їх зміна внаслідок дії протиінфекційних агентів.

**Методи дослідження:** бібліосемантичний та аналітичний – для систематизації та узагальнення літературних даних щодо мікробіологічних аспектів появи та терапевтичних підходів до менеджменту інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації; опитування щодо конститутивних особливостей учасників дослідження – стать, вік, статус

тютюнопаління, гігієнічний профіль; мікробіологічне дослідження зразків з ділянки стояння дентального імплантату з вивченням морфологічних та тинкторіальних, біохімічних, адгезивних, біоплівкоутворювальних властивостей отриманих ізолятів та їх профіль чутливості до антибіотиків та антисептиків – для вивчення біологічних властивостей клінічних ізолятів та оцінки перспективи використання антисептика NCT для менеджменту ускладнень дентальної імплантації; математико-статистичні – для обґрунтованої інтерпретації результатів та встановлення їх значущості.

Матеріал – мазки-відбитки з поверхні імплантату та періімплантної ділянки, зразки м'яких тканин періімплантної ділянки, зубний імплантат.

### **Наукова новизна дослідження та одержаних результатів.**

В дисертаційній роботі доповнено знання дані щодо етіологічної структури та біологічних властивостей збудників інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації. Встановлено, що роди *Porphyromonas* та *Fusobacterium* є провідними патогенами при пізніх реакціях відторгнення імплантату. Натомість індикаторами раннього відторгнення були *Haemophilus spp.*, *S. pyogenes*, *Actinomycetales*, *S. aureus*.

В дисертаційній роботі доповнено знання про адгезивні та біоплівкоутворювальні властивості мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації. Показано, що такі культури володіють високим адгезивним потенціалом та утворюють біоплівку високої та помірної щільності. Доведено існування прямого сильного кореляційного зв'язку між адгезивністю та біоплівко-утворювальними властивостями *S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter spp.*

При проведенні дисертаційного дослідження доповнено знання про спектр чутливості мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями одонтоімплантації, до антибіотиків. Показано, що вони володіють високим профілем лікарської стійкості – 34,4% ізолятів роду *Staphylococcus* мали профіль MRSA/MRSE; 50% та 100% культур *K. pneumoniae* та *Acinetobacter spp.* відповідно були продуцентами карбапенемаз та метало- $\beta$ -лактамаз.

В дисертаційній роботі доведено протимікробну ефективність мілімолярного розчину NCT проти планктонних та біоплівкових форм мікроорганізмів, що колонізують поверхні детальних імплантатів, та вперше показано, що на ранніх етапах експозиції в розчині антисептика грам-позитивні мікроорганізми є більш сприйнятливими. Також в дослідженні доповнено знання про спектр активності 1% розчину NCT в мілімолярній концентрації, зокрема проти мікроорганізмів з профілем розширеної лікарської стійкості.

Тож, на основі отриманих результатів, в ході дисертаційного дослідження мікробіологічно обґрунтовано *in vitro* доцільність застосування антисептика на основі NCT для менеджменту інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації.

#### **Практичне значення отриманих результатів.**

Нами підтверджено важливість мікробіологічного дослідження при ускладненнях дентальної імплантації. Результати, отримані в роботі, висвітлюють основні мікробіологічні особливості мікроорганізмів, асоційованих з інфекційно-запальними ускладненнями дентальної імплантації. Нами отримано дані про локальний профіль чутливості до протимікробних засобів, що враховується при призначенні протимікробної терапії лікарями клініцистами. Отриманні результати мікробіологічних досліджень протимікробних препаратів є науковим обґрунтуванням їх практичного застосування в профілактиці розвитку та лікуванні інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації. Результати, отримані при проведенні науково-дослідної роботи, впроваджені в навчальний процес кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України (Протокол №5 від 30.10.2023) та кафедри мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології та медико-біологічної фізики й інформатики Дніпровського державного медичного університету (Протокол №2 від 20.09.2023).



### **Особистий внесок здобувача.**

Формулювання ідеї, планування етапів роботи, визначення мети та задач дослідження, обговорення результатів, що були отримані, проводилося разом з науковим керівником, д. мед. н., професором Д. О. Степанським. Дисертантом особисто виконані патентно-інформаційний пошук і проаналізована література по даній проблемі. Здобувачем проведено відбір пацієнтів з інфекційно-запальними ускладненнями дентальної імплантації, їх мікробіологічне обстеження та інтерпретацію результатів, проведені систематизація і статистичний аналіз отриманих даних. Здобувачем самостійно написані всі розділи дисертації, сформульовані висновки і практичні рекомендації. Дисертаційна робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології й медико-біологічної фізики та інформатики Дніпровського державного медичного університету. Обладнання та набори для біохімічної ідентифікації отриманих культур було придбано за підтримки Дніпровського державного медичного університету.

**Дані про відсутність текстових запозичень та порушень академічної доброчесності (академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації).**

За результатами перевірки та аналізу матеріалів дисертації не було виявлено ознак академічного плагіату, фабрикації, фальсифікації, що підтверджено висновком комісії з виявлення та запобігання плагіату Дніпровського державного медичного університету встановила 92,36% оригінальності тексту.

### **Апробація результатів дисертації.**

Основні положення та результати дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на 32-му Конгресі Європейського товариства клінічної мікробіології та інфекційних захворювань (м. Лісабон (Португалія), 2022), науково-практичній конференції «Мультидисциплінарний підхід в діагностиці та лікуванні стоматологічних захворювань» (м. Тернопіль, 2022), науково-практичній конференції «Globalization of scientific knowledge: international cooperation and integration of sciences» (м. Вінниця (Україна) –

м. Вена (Австрія) (онлайн, 2023), науково-практичній конференції «Бабенківські читання» (м. Івано-Франківськ, 2023).

#### **Здобувач отримала наступні зарубіжні гранти:**

1. Тревел-грант на відвідування 32-го Конгресу Європейського товариства клінічної мікробіології та інфекційних захворювань, м. Лісабон (Португалія). Квітень, 2023 рік.

2. Грант на відвідування курсу післядипломної освіти Європейського товариства клінічної мікробіології та інфекційних хвороб «The challenge of persistent biofilm-related bone and joint infections», м. Цюрих (Швейцарія). Травень, 2022.

#### **Публікації.**

За результатами дисертації опубліковано 9 наукових праць, серед яких 5 статей, з них 1 стаття – у видання, що індексується у системі Scopus, 4 статті у фахових виданнях на території України, 4 тез доповідей у матеріалах конгресів та науково-практичних конференцій.

#### **Обсяг і структура дисертації.**

Дисертація викладена на 133 сторінках друкованого тексту, з яких 113 сторінок займає основний текст, та складається зі вступу, огляду літератури, розділу методів досліджень, трьох розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження, висновків, методичних рекомендацій і списку використаної літератури, який містить 138 джерел, з них 127 латиною та 11 кирилицею, а також з 1-го додатку. Робота ілюстрована 3 таблицями та 25 рисунками.

## РОЗДІЛ 1

### ЕТИОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВТРАТИ ЗУБНОГО ІМПЛАНТАТУ (огляд літератури)

Нормальна мікробіота відіграє ключову роль в захисті організму від хвороботворних патогенів. При порушенні мікробного еубіозу, надмірний мікроорганізмів з високими вірулентними властивостями може призвести до появи рефрактерних інфекцій, а в ортопедичній стоматології – до втрати імплантату. Тож, обґрунтований підхід до призначення профілактичного та елімінаційного протимікробного лікування вимагає надійних результатів мікробіологічного моніторингу.

#### **1.1 Сучасний стан проблеми інфекційних ускладнень дентальної імплантації**

За різними оцінками близько 70% пацієнтів в стоматології потребують ортодонтичної стоматологічної медичної допомоги. Серед них близько 20% особам проводиться дентальна імплантація [13]. Сьогодні процедура одонтоімплантації є добре-відпрацьованою й, зазвичай, успішною. Проте ризик ускладнень в ранній та пізній післяопераційний період залишається значним [8, 13].

Згідно з сучасними уявленнями, патологічні процеси в ділянці стояння дентального імплантату поділяють на періімплантний мукозит (ПМ), періімлантит (ПІ) та дефіцит м'яких та твердих тканин імплантаційної ділянки (ДІ), які послідовно змінюють один одного. Для ПМ характерною є кровотеча при зондуванні та візуальні ознаки запалення. ПІ визначається, як наліт-асоційований патологічний стан тканин навколо зубних імплантатів, що характеризується запаленням слизової оболонки та подальшою прогресуючою втратою опорної кістки [6, 9].

Аналіз поширеності невдач дентальної імплантації та патоморфологічних змін, що призводять до цього, є утрудненим через різнорідність опублікованих даних в підходах до діагностики періімплантиту, використанням різних порогових значень клінічних ознак, пов'язаних з розвитком патології, наприклад, кровоточивість при зондуванні, глибина пародонтального зондування, рівень втрати кісткової тканини [5].

Поширеність періімплантиту в ділянках опор незнімних ортопедичних конструкцій при мінімальному періоді спостереження в 5 років сягала середнього показника 9% згідно з даними систематичного огляду Pjetursson B. (2004) [14]. Згідно з результатами Atieh M.A. (2013) частота періімплантиту складала близько 20% на суб'єкт-орієнтованому рівні та 10% на об'єкт-орієнтованому рівні [9]. Систематичний огляд de Waal Y. (2013) дозволив встановити, що поширеність періімплантиту серед пацієнтів з повною адентією була вищою, ніж серед пацієнтів із частковою адентією без патології пародонтиту в анамнезі; середня поширеність періімплантиту сягала 0-3% через 5 років функціонування інтраосальних опор та 6-17% через 10 років їх експлуатації [15]. Розрахунковий показник розповсюдженості повної адентії серед населення України віком 69-69 років складає близько 10% і прогресивно збільшується з віком. За даними спостережень 15,0 % осіб віком більше 40 років потребують використання протезів, після 60 років – показник до 25 % [16].

За даними систематичного огляду Dreyer H. (2018) поширеність періімплантиту серед пацієнтів, які регулярно приходили на періодичні профілактичні стоматологічні огляди становила близько 9,0%; серед тих, кому не проводилось періодичне превентивне лікування – 19%; серед-некурців – 11,0%; серед пацієнтів з незнімними ортопедичними конструкціями – 10%; серед пацієнтів з патологією пародонтиту в анамнезі 14,3%; серед пацієнтів з середньою тривалістю функціонування імплантатів понад 5 років – 26,0%. При цьому серед пацієнтів з середньою тривалістю функціонування імплантатів щонайменше 10 років медіанна поширеність періімплантиту сягала 21% [17].

В усіх аналізованих публікаціях діапазон варіації поширеності періімплантиту на рівні досліджуваних суб'єктів завжди перевищував діапазон поширеності патології на рівні імплантатів у різні періоди спостереження: 3,4-43,9% проти 8,0-28,4% [18], 1,0-47,1% проти 0,4-36,6% [13], 10,7-47,2% проти 7,2-16,9% [19], 8,9-49,2% проти 2,1-30,8% [15].

За даними 7-го з'їзду Європейської федерації пародонтологів основні біологічні ускладнення одонтоімплантації – ПіМ та ПІ зустрічаються у 43 % та 22% пацієнтів відповідно. ПіМ та ПІ підвищують вірогідність дезінтеграції та повної втрати встановленого імплантату [13].

Етіологія втрати дентального імплантату є різномірною. Вік, стать, статус паління, наявність системних захворювань, місце одонтоімплантації (верхня щелепа), кількість і якість кісткової тканини, а також характер впливу на поверхню імплантату є деякими з досліджуваних статистично-значущих параметрів, пов'язаних з обмеженням тривалості функціонування дентального імплантату [20]. Втрата імплантату може бути визначена, як рання та пізня. Рання втрата імплантату пов'язана з клінічною нефункціональністю імплантату, що виникає до остаточного встановлення протеза. Зазвичай, причинами є різного роду біологічні фактори (імунологічні та генетичні). Пізня втрата імплантату виникає протягом кількох років після встановлення імплантату [6]. Перелік факторів, які розглядаються в патогенезі втрати дентального імплантату узагальнено в табл. 1.1.

## Причини ранньої та пізньої втрати зубних імплантатів [адаптовано з 7]

Рання втрата	Пізня втрата
Системні захворювання – цукровий діабет з поганим глікемічним контролем; СНІД; Остеопороз; Використання деяких лікарських засобів – кортикостероїди, бісфосфонати; Інфекції периімплантних тканин; Хірургічна травматизація	Високе навантаження; Периімплантит; Бруксизм; Скрегіт зубами вночі; Залишки цементу; Помилки в конструкції протезу; Травматична оклюзія

Серед локальних факторів, асоційованих з втратою дентального імплантату, найпоширенішим є інфекція, яка може розвинутися на будь-якому етапі встановлення зубного протезу [8, 10, 13]. Нормальне загоєння після втрати зуба протікає зі зменшенням розмірів альвеолярного відростка, що призводить до дефіциту твердих та м'яких. Більший дефіцит гребня кістки може виникнути через значну втрату пародонтальної опори внаслідок травми при екстракції, ендодонтичних інфекцій, переломів коренів, поганого положенням зубів, травми, пневматизації гайморових пазух тощо [9, 21].

В дослідженнях також показано асоціацію пародонтиту з послідуочим розвитком периімплантиту [5]. При чому зв'язок між фактом наявності пародонтиту та рівнем виживання імплантатів не прослідковується [22]. В систематичному огляді Turgi A. (2016) встановлено, що куріння, цукровий діабет 2-го типу та важкі серцево-судинні захворювання також можуть бути розглянуті, як фактори ризику розвитку периімплантиту [23].

За літературними даними, розвиток ПіМ та ПІ пов'язують з реакцією організму на введений імплантат, але вирішальним фактором ризику

інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації є незадовільна гігієна порожнини рота та колонізація патогенними і умовно-патогенними мікроорганізмами слизових оболонок у зоні контакту імплантату з оточуючими його тканинами [24]. Тому питання впливу на таксономічний склад біоплівки, що колонізує поверхню імплантату та периімплантних тканин, лікування та профілактики інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації на сьогоднішній день залишається актуальним питанням сучасної медичної науки [26].

Мікроорганізми в ротовій порожнині живуть у складі біоплівки. Науково обґрунтованим є факт приналежності ПіМ та ПІ до біоплівко-асоційованих захворювань. Біоплівкові форми мають вищий профіль резистентності до антибіотиків в порівнянні з планктонними [27]. За даними систематичного огляду групи науковців Antimicrobial Resistance Collaborators (2022) показано, що в 2019 році 4,95 млн смертей в усьому світі були тим чи іншим чином пов'язані з резистентними бактеріальними інфекціями; з них 929 тис. смертей були безпосередньо асоційовані з резистентними бактеріями *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* та *Pseudomonas aeruginosa* [28].

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) прогнозує, що протягом наступних двох десятиліть переважна більшість відомих патогенів сформує стійкість до антибіотиків. Тому питання подолання резистентності бактерій до антибіотиків є надзвичайно складним і потребує комплексного вирішення. В 2018 експерти ВООЗ опублікували перелік патогенів, проти яких розробка нових терапевтичних стратегій сьогодні є необхідною. Цей перелік включає основних представників інфекцій, в тому числі пов'язаних з наданням медичної допомоги, зокрема *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* зі стійкістю до карбапенемаз, стійкі до цефалоспоринів III покоління мікроорганізми *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, а також *Enterococcus faecium* з резистентністю до ванкоміцину, метицилін-резистентний *S. aureus* (MRSA) тощо [29].

## **1.2 Мікробна етіологія запалення в ділянці стояння дентального імплантату**

В переважній більшості сучасні дентальні імплантати виготовляють з титану; вони складаються з внутрішньокісткової частини з шорсткою поверхнею, яка забезпечує остеointegraцію, і трансмукозної частини з гладкою поверхнею, яка піддається впливу середовища порожнини рота [25]. Оскільки основною задачею одонтоімплантації є компенсація відсутності природних зубів та їх фізіологічних функцій, в літературі склалася тенденція сприймати періімплантатні інфекції як патологію, аналогічну гінгівіту або пародонтиту [21, 22, 30]. Проте фундаментальні гістологічні та імунофізіологічні відмінності від природних зубів роблять дентальні протези більш сприйнятливими до ендогенних інфектів порожнини рота [25]. По-перше, утримання зубів в альвеолярних лунках забезпечується зв'язковим апаратом, а остеointеговані імплантати безпосередньо кріпляться до кістки. Відсутність зв'язкового апарату зуба також пов'язане з обмеженням кровопостачання надперіостальними судинами, що призводить до обмеження кількості поживних речовин та імунних клітин, які можуть екстравазувати для боротьби з ранніми стадіями бактеріальної інфекції. По-друге, волокна супракрестальних сполучних тканин розташовані навколо імплантатів циркулярно, а не перпендикулярно, як в природних зубах. Така анатомо-функціональна організація зменшує фізичний бар'єр проти бактеріальної інвазії в підслизову оболонку та поміщає періімплантатні тканини в конформацію «відкритої рани» [31].

Після введення імплантату слинна швидко адсорбується на поверхні трансмукозної частини імплантату. Це призводить до адгезії ранніх колонізаторів з подальшою ко-адгезією пізніх [31]. Тож бактеріальна колонізація вже спостерігається протягом 30 хв після введення імплантату та розвивається в напрямку створення організованих спільнот в навколоімплантатній щіліні протягом наступних 2 тижнів [32]. В перші місяці після встановлення імплантату періімплантатні біоплівки є переважно



однорідними в своєму таксономічному складі [33]. На цьому етапі бактеріальні спільноти, які колонізують периімплантну нішу, можуть досягти симбіотичної рівноваги з господарем і бути сумісними з периімплантним здоров'ям. Проте фактори, які сприяють розвитку біоплівки, також сприяють ініціації запалення і зміну мікро оточення периімплантної борозни [34]. Прогресування дисбіотичних зрушень в таксономічному складі мікробіоти посилює локальний запальний процес та, зрештою, провокує порушення стан здоров'я периімплантних тканин та функціональності імплантату [35]. Було показано, що порушення гігієни порожнини рота терміном на 3 тижні пов'язане зі збільшення кількості *Tannerella spp.*, *Prevotella spp.*, *Fretibacterium spp.* та *Treponema spp.*, що додатково корелює з регіональним підвищенням прозапальних цитокінів [36].

По суті, периімплантит — це ендегенна змішана інфекція, яка іноді включає нетипові ротові бактерії. Це може означати «екстраоральний» внесок в розвиток інфекційно-запальних процесів, хоча все ще важко провести жорстку лінію щодо цього визначення [25, 32, 34].

Й хоча системні захворювання пацієнта та генетична сприйнятливість також можуть підвищити ймовірність розвитку периімплантатних інфекцій [36], периімплантатна мікробіота є етіологічним фактором, на який можна більш реально і передбачувано впливати за допомогою терапевтичного втручання, і тому вимагає максимальної зосередженості і розуміння.

Було показано, що щонайменше пародонтальні патогени можуть бути асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації [21, 22, 32]. Вітчизняні автори, зокрема Фаустова М (2018) та Кравченко А (2022) показали, що нормальна мікробіота та персистуючі збудники також можуть бути пов'язаними з появою запалення в ділянці стояння імплантату [13, 36].

Загалом мікроорганізми, що входять до дентальної біоплівки, поділяють на шість груп (табл. 1.2).

## Мікробні консорціуми дентальної біоплівки

Комплекс	Мікробні таксони
Жовтий	<i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , <i>Streptococcus intermedius</i>
Зелений	<i>Capnocytophaga spp.</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> серотип А, <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Campylobacter spp.</i>
Фіолетовий	<i>Veillonella parvula</i> , <i>Actinomyces odontolyticus</i>
Оранжевий	<i>Campylobacter gracilis</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Campylobacter showae</i> , <i>Eubacterium nodatum</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Fusobacterium periodonticum</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Pacificastacus nigrescens</i> , <i>Streptococcus constellatus</i>
Червоний	<i>Tannerella forsythia</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Treponema denticola</i>

До жовтого комплексу належать представники роду *Streptococcus*, зеленого – рід *Capnocytophaga*, *A. actinomycetemcomitans* серотип А, *E. corrodens* та *Campylobacter spp.*, фіолетовий – *V. parvula* та *A. odontolyticus*. Жовтий, зелений та фіолетовий комплекси мікроорганізмів, зазвичай, першими колонізують поверхню зуба і є попередниками оранжевого та червоного комплексів, представлених здебільшого грам-негативними бактеріями [21].

До оранжевого комплексу належать *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *E. nodatum*, *F. nucleatum*, *F. periodonticum*, *Peptostreptococcus micros*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* та *S. constellatus*. До червоного комплексу включені *T. forsythus*, *P. gingivalis* та *T. denticola*. В якості основних патогенів в розвитку інфекційно-запальних процесів пародонту розглядаються саме представники оранжевого та

червоного комплексів. Бактерії червоної групи в зразках зубного нальоту зустрічаються в асоціаціях, які часто прилягають до епітеліального покриття пародонтальної кишені в більш глибоких областях. Причиною такого розташування, в основному, є особливості їх міжвидової взаємодії, коагрегація та метаболічна взаємозалежність [21, 37].

Мікробіом ротової порожнини є багатим на різні види, і їх еубіоз зумовлює нормальне функціонування даної екологічної ніші. Втрата зуба, цукровий діабет, куріння тощо пов'язані з порушенням такого балансу з надмірним різноманіттям патогенів. Імплантація дентального протезу є травматичною процедурою і має свій вплив на мікробіом порожнини рота – призводить до надмірного росту відносної чисельності строгих анаеробів, включаючи роди *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Capnocytophaga*, *Tannerella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas* та *Atopobium* [21, 38].

Імпланти та зуби мають гістопатологічну та екологічну схожість, тому було запропоновано, що мікробні спільноти цих структур мають бути подібними. Немає доказів того, що реакція господаря на мікробіоту на імплантатах і зубах відрізняється. Однак в нещодавніх дослідженнях показано, що мікробні спільноти періімплантатних тканин помітно відрізняються від біоплівки пародонту, мають меншу різноманітність і простіший таксономічний склад. Але домінантні бактеріальні таксони нальоту імплантату та зубів є подібними [39]. Тому можна припустити, що прогресування здорового імплантату до ПІ є подібним до розвитку пародонту.

З використанням культуральних методів з ясенних кишень при ПІ можна отримати культури таких мікроорганізмів, як *Neisseria spp.*, *S. constellatus*, *Slackia exigua*, *Streptococcus intermedius*, *F. nucleatum* та *G. morbillorum* [40]. При використанні метагеномного секвенування зубного нальоту отримано інформацію про ПІ-асоційований комплекс мікроорганізмів. До його складу входять 7 найбільш дискримінаційних представників – *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *T. forsythia*, *Filifactor alocis*, *Fretibacterium fastidiosum*, *Desulfobulbus spp.* та *Treponema lecithinolyticum* []. При ПІ та мікробіота

ділянки стояння залученого імплантату є специфічною і відрізняється від спектру колонізаторів контр-латеральних здорових ділянок. Тож, склад біоплівки здорових імплантатів є більш подібним до здорових протезів, в тому числі інших суб'єктів, ніж уражених з однієї й тієї ж ротової порожнини. В дослідженні Ghensi P (2020) показано можливість та специфічність мікробного фактору для моніторингу ПІ, а *F. nucleatum* визначено об'єктивним біомаркером мукозиту [41].

В дослідженні Sun F (2023) також описано суттєві відмінності біоплівки здорових та запальних імплантатів. В групі здорових дентальних протезів  $\alpha$ -різноманіття було значно нижчим, ніж при ПІ, які відрізнялися високою відносною кількістю *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *E. nodatum*, *Parvimonas micra* та таких пародонтальних патогенів, як *F. alocis*, *F. fastidiosum*, *Desulfobulbus sp.* та *P. endodontalis*. Окрім того, відносна кількість *T. denticola*, *T. forsythia*, *Fretibacterium sp.*, *Desulfobulbus sp.*, *F. alocis*, *F. fastidiosum*, *P. gingivalis* та *P. endodontalis* позитивно корелювала з глибиною ясенного каналу. Проте кореляція відносної кількості *Rothia aeria* була негативною [42], що корелює зі свідченнями, отриманими в інших дослідженнях [43, 44, 45]. В аналогічному дослідженні показано, що сформовані *in vitro* біоплівки на поверхні титанових імплантатів містять багаті на пролін білки,  $\alpha$ -амілазу та високомолекулярні муцини, але не мають низькомолекулярних муцинів та цистатинів, які зазвичай виявляються на зубній емалі [33].

Цілком ймовірно, що зміни мікробіоценозу ділянки імплантату є динамічними. В ряді досліджень показано віддалені наслідки дентальної імплантації. Дисбіотичні зміни проявляються в прогресивному збільшенні *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* та *P. intermedia* через 3-6 міс. після встановлення імплантату [46]. В дослідженні Hashimoto Y (2022) вивчали різницю складу біоплівки ділянки дентального імплантату при загостренні та ремісії інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації. Дослідники описали зв'язок між процесами нагноєння в місцях імплантації та

зміну частки і поширеності певних видів в зразку біоплівки. Проведений складний аналіз показав, що група пацієнтів з активним процесом мала більшу поширеність видів *Porphyomonas*, *Fusobacterium*, *Treponema* і *Tannerella*, тоді як пробіотичні мікроорганізми *Lactobacillales spp.* і *Bifidobacterium spp.* були переважно характерними для групи ремісії. Мікроорганізм *P. gingivalis* був ключовим патогеном, пов'язаним з запаленням в ділянці імплантату, адже продемонстрував значно більшу відносну кількість в групі активного запалення. Дослідники зробили висновок, що періімплантне запалення пов'язане зі змінами в структурі бактеріальної мікробіоти з кількісними та якісними відхиленнями від стану еубіозу [47].

Korsch M (2021) повідомляли про відмінності мікробного навантаження біоплівки періімплантних тканин при ранній та пізній втратах зубного протезу. Склад біоплівки суттєво відрізнявся серед учасників дослідження. Обидві групи пацієнтів мали велику кількість *F. nucleatum* і *P. gingivalis*, але учасники з пізньою втратою імплантатів продемонстрували більшу бактеріальну різноманітність за рахунок великої кількості родів *Treponema*, *Fretibacterium*, *Pseudoramibacter* і *Desulfobulbus*. Мікробні спільноти імплантатів втрачених в період остеоінтеграції були дуже гетерогенними без явних специфічних маркерних мікробних таксонів. Дослідники зробили висновок, що надмірна колонізація *P. gingivalis* і *F. nucleatum* є характерною рисою втрати імплантату в цілому, а збіднення мікробного різноманіття може бути пов'язане з ранньою втратою зубного протезу [10].

Й хоча запальні процеси в тканинах пародонту та при ПіМ/ПІ, зазвичай, пов'язані зі строгими анаеробами, що населяють ротову порожнину, було показано, що опортуністична мікробіота також може відігравати роль в появі інфекційно-запальних процесів в ділянці стояння дентального імплантату [13, 36]. В дослідженні Фаустової М (2018) встановлено, що в етіологічній структурі інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації домінували грампозитивні мікроорганізми (90,6%), серед яких *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Kocuria spp.* та *Candida spp.* Грам-

негативні збудники визначали значно рідше, переважно представників *Pseudomonas spp.* (4,2%), *Acinetobacter spp.* (3,9 %) та *Escherichia spp.* (1,3 %). Виявлено, що розвиток ПІМ та ПІ супроводжується збільшенням мікробного навантаження слизових оболонок периімплантної ділянки, як за рахунок грам-позитивних (3,1(0,9) Іг КУО/мл, 3,8(1,4) Іг КУО/мл) так і грам-негативних збудників (0,2(0,1) Іг КУО/мл, 0,7 (0,2) Іг КУО/мл) [13]. В нещодавньому дослідженні було показано показало вищу частоту виділення *S. aureus* з поверхні імплантатів з ПІ в порівнянні зі здоровими [48]. В ретроспективному дослідженні випадків периімплантиту було показано наявність невибагливих грам-негативних паличок у 19,0% пацієнтів з периімплантитом. Невибагливі грам-негативні паличко-подібні бактерії були виявлені як у випадках периімплантиту, так і в зразках зі здорових імплантатів [32]. Роль опортуністів, вірогідно, є значною та потребує подальшого вивчення.

### **1.3 Патогенні властивості оральної мікробіоти, пов'язані з запаленням в ділянці імплантації**

В зубному нальоті *F. nucleatum* є сполучним організмом, який об'єднує первинних колонізаторів, наприклад, рід *Streptococcus*, з переважно анаеробними вторинними колонізаторами, *P. gingivalis* та *A. actinomycetemcomitans*. Мікроорганізм *F. nucleatum* здатний зв'язуватися та транспортувати *Streptococcus cristatus*, неінвазивний вид бактерій, в клітини господаря, працюючи як шатл [49]. Мікроорганізм експресує адгезини та здатний впливати на продукцію дефензинів, хемокінів та інтерлейкінів. В порівнянні з *P. gingivalis*, *F. nucleatum* має більшу інвазивну здатність, тому така ко-інфекція може сприяти адгезії та інвазії *P. gingivalis* та *A. actinomycetemcomitans* до епітеліальних клітин ясен людини та пригнічувати відповідь вродженого імунітету господаря [49, 50].

В ряді досліджень показано, що колонізація біоплівки *T. forsythia* в ділянці стояння дентального імплантату є характерною для людей з надмірною масою тіла [21, 51]. *T. forsythia* продукує трипсиноподібні протеази та протеази PrtH, сіалідази SiaH та NanH, білок BspA,  $\alpha$ -D-глюкозидазу, N-

ацетил- $\beta$ -глюкозамінідазу, гемаглютиніни та має лейцинові повтори на поверхні клітин. *T. forsythia* утворює бідні біоплівки *in vitro*, але існування полімікробного середовища, зокрема присутність *F. nucleatum*, справляє селекційний вплив на продукцію екзополісахариду [21].

Роль *C. rectus* при ПП є менш вивченою, ніж згаданих вище видів, але також мікроорганізм також може бути пов'язаний з резорбцією кістки щелепи та може уникати ефекторів імунної системи господаря [52]. Також є відомою здатність даного патогена до ініціації гнійного запалення з розвитком абсцесу ротової порожнини [53].

Значення *P. gingivalis* в розвитку запалення періімплантних тканини широко обговорюється. В полімікробних умовах, якими є ротова порожнина, мікроорганізм продукує ряд факторів вірулентності, що сприяють резорбції альвеолярної кістки та деструкції інших тканин пародонту. Адгезія *P. gingivalis* до клітини-господаря призводить до інвазії мікроорганізму в складі фагосоми; після клітинної аутофагії починається реплікація бактерії, але відключається апоптоз. *P. gingivalis* експресує ворсинки, продукує гемолізину, гемаглютиніни тощо. *P. gingivalis* уникає імунного кліренсу завдяки існуванню капсули та факторів деградації прозапальних цитокінів. Згадані фактори вірулентності також впливають на ко-агрегації з іншими патогенами та їх здатність до утворення біоплівки [54].

Опортуністичні мікроорганізми родів *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, як показано, також можуть бути асоційованими з розвитком інфекційно-запальних процесів в ділянці стоянні імплантату. Зазвичай, *S. aureus* розглядається, як коменсал шкіри та слизових оболонок, проте також є визнаним патогеном в ортопедії, пов'язаним з розвитком інфекцій імплантату та подальшим остеомієлітом [55]. *S. aureus* має широкий спектр факторів вірулентності, зокрема більше 20 та адгезинів та цитотоксини [56]. Ключовим фактором патогенності є лейкоцидин, пов'язаний з некротичними інфекціями. Підґрунтям для хронізації інфекції *S. aureus* є порушення його інтерналізації макрофагами, а зі сторони мікроорганізму – здатність до

переходу на ферментативний тип існування [57]. Малі колоніальні форми (МКФ) мають змінену метаболічну активність, здатні уникати ефекторів імунної системи, механічного кліренсу та згубної дії протимікробних засобів [58]. Фактором індукції селекції ауксотрофного фенотипу є гіпоксія, лікування антибіотиками (аміноглікозиди, сульфаніламід, фторхінолони) та ко-інфекція *P. aeruginosa* [58, 59]. Варто зазначити, що більшість МКФ є нестабільними та здатні до зворотного перетворення в швидкозростаючий і небезпечний дикий тип [58, 59, 60]. Отримання та ідентифікація культури *S. aureus*, зазвичай не викликає труднощів, проте селекція ауксотрофного фенотипу потребує додаткових лабораторних заходів. Ауксотрофна модифікація, на ряду зі здатністю *S. aureus* до утворення біоплівки та набуття стійкості до метициліну та ванкоміцину, розглядаються, як основний фактор невдачі антибактеріальної терапії [60].

*K. pneumoniae* є грам-негативним опортуністом, який, зазвичай, пов'язують з різноманітними інфекційними захворюваннями, в тому числі пов'язаними з наданням медичної допомоги. Інфекції, спричинені карбапенем-резистентною *K. pneumoniae*, становлять серйозну загрозу для громадського здоров'я та пов'язані з високим рівнем смертності, особливо серед пацієнтів із ослабленим імунітетом та пацієнтів у критичному стані. Фактори адгезії (фімбрії), капсула, ліпополісахарид і здатність до продукції сидерофорів є основними факторами вірулентності, які сприяють патогенності *K. pneumoniae*. Колістин і тайгециклін є одними з останніх можливих засобів лікування таких інфекцій. Продукція карбапенемаз, особливо карбапенемаз *K. pneumoniae* і метало- $\beta$ -лактамаз, є основним молекулярним механізмом виникнення резистентних клонів. Плазоміцин, еравациклін, цефідерокол, темоцилін, цефтолозан-тазобактам, іміпенем-циластатин-релебактам, меропенем-ваборбактам, цефтазидим-авібактам і азтреонам-авібактам є препаратами резерву та потужними альтернативами для лікування інфекцій резистентних *K. pneumoniae* [61, 62].



*A. baumannii* є грам-негативним нозокоміальним збудником з природною лікарською стійкістю до широкого ряду антибіотиків. Стійкі до карбапенемів штами *A. baumannii* були віднесені ВООЗ до категорії критичних патогенів Пріоритету 1. *A. baumannii*, зазвичай, асоційований з інфекціями, пов'язаними з наданням медичної допомоги. Мікроорганізм наділений широким рядом факторів вірулентності, таких як білки зовнішньої мембрани, білкові системи секреції, ліпополісахарид, фосфоліпази, протеази та хелатні системи заліза (Fe) [64]. Білки зовнішньої мембрани, такі як OmpA, допомагають у прикріпленні та інтерналізації на епітеліальних клітинах господаря. OmpA також є індуктором секреції факторів апоптозу всередині клітини-хазяїна, що призводить до загибелі клітини. Капсульні екзополісахариди в *A. baumannii* захищають патоген від навколишнього середовища та опосередкованого хазяїном стресу, а їх склад визначає ступінь вірулентності. Подібним чином збудник має спеціалізовану систему поглинання іонів металу для протидії опосередкованій хазяїном хелатації іонів металу. Також мікроорганізм наділений кількома класами ефлюкських насосів, які також беруть участь у моториці та прикріпленні, окрім їх справжньої роботи, пов'язаної з ефлюксом протимікробних препаратів [64].

Тож, мікробіота, асоційована з ускладненнями дентальної імплантації, експресує фактори вірулентності, направлені на адаптацію інфекційного агенту в екологічній ніші, та механізми стійкості до антибіотиків, що, безумовно, пов'язані з втратою клінічної ефективності протимікробного лікування. Додаткові виклики становлять особливі форми організації мікросвіту – біоплівки.

Біоплівки є організованими мікробними консорціумами, оточені позаклітинним полімерним матриксом. Така форма існування мікробної популяції робить її недосяжною до механічного та імунного кліренсу, а також дії протимікробних засобів. Фактично, перехід від планктонного до біоплівкового способу росту в даний час визнається одним з найбільш важливих чинників хронічних інфекцій, тому відіграє важливу роль в

патогенезі ряду хронічних захворювань [65]. Крім того, патогенні властивості біоплівки пов'язані зі складнощами діагностики та лікування [66]. Архітектура біоплівки складна і в значній мірі залежить від доступності поживних речовин і кисню. Формування біоплівки включає три етапи: прикріплення, дозрівання та розсіювання [67, 68]. Розвиток біоплівки починається з прилипання планктонних бактерій до поверхні за допомогою пілей та джгутиків у грам-негативних бактерій або поверхневих білків у грам-позитивних. Й хоча, зазвичай, біоплівкову модель описують за рахунок прикріплення до твердої поверхні (біотичної чи абіотичної), було показано, що біоплівка утворюється навіть безпосередньо на слизу і не завжди контактує з підлеглим епітелієм [68, 69].

Після адгезії відбувається розмноження бактерій з формуванням мікроколоній та продукція полімерного матриксу. Останній відіграє важливу роль у розвитку біоплівки не тільки, як захисний бар'єр проти захисту господаря, антибіотиків, висихання або активних форм кисню (АФК), але й також, забезпечує когезію структури та діє як джерело поживних речовин [70]. Тобто, для мікробного світу матрикс є фізіологічний бар'єром, який складається з конгломерату екзополісахаридів, позаклітинної ДНК (eДНК), поверхнево-активних речовин, ліпідів, продуктів мікробного лізису та сполук організму-хазяїна [68, 69, 70].

#### **1.4 Сучасні підходи до менеджменту інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації**

На сьогодні в Україні не існує єдиного уніфікованого протоколу лікування ПІМ та ПІ. Однак, літературні дані вказують на схожість алгоритму лікування інфекційно-запальних ускладнень дентальної імплантації вітчизняними та закордонними лікарями [13].

З клінічної точки зору, дуже важливо якомога швидше виявляти ПІМ і починати його лікування до появи ураження кісткової тканини. Зазвичай для його усунення проводять механічну обробку в поєднанні з промиванням дефекту м'яких тканин розчином антисептиків, найчастіше хлоргексидином,

та місцеве призначення антибіотиків з групи тетрациклінів або без них [71]. Незалежно від методу лікування, основною умовою успіху є адекватна самостійна гігієна ротової порожнини, для чого пацієнт повинен правильно використовувати зубну щітку, інтерпроксимальні йоржики і зубну нитку. Хлоргексидин-вмісні розчини і розчини ефірних олій сприяють усуненню кровоточивості й зменшенню глибини зондування, а також знижують індекс зубного нальоту в пацієнтів із відносно неглибокими кишнями в ділянці імплантатів [72].

Менеджмент ПІ може вимагати системного призначення антибіотиків протягом 2-3 діб до операції та введення біоактивного матеріалу на основі гідроксиапатиту, змоченого розчином тетрацикліну [13]. Задля лікування ПІ пропонують провести відкриття слизового клаптя та знезараженні імплантату розчином хлоргексидину з наступним системним застосуванням амоксициліну та меторонідазолу протягом 7 днів [73].

В цілому методи лікування періімплантиту запозичені з пародонтології. Оскільки це захворювання має мікробний генез, етіотропна терапія полягає в усуненні патогенних мікроорганізмів. Таким чином, при лікуванні ПІ або ПІМ перш за все необхідно видалити бактеріальний наліт з поверхні імплантату [6, 74]. Своєчасне виявлення факторів ризику дентального періімплантиту і послаблення їх дії є першочерговим завданням на усіх етапах лікування, що безсумнівно сприятиме підвищенню якості проведених лікувально-профілактичних заходів [73].

Основні етапи лікування періімплантиту і пародонтиту практично однакові: 1) усунення інфекційного агенту; 2) коригуюче нехірургічне і хірургічне лікування; 3) регенеративні втручання, при необхідності; 4) підтримувальна терапія. Загальні клінічні рекомендації лікування періімплантиту [73]: 1) пошук та усунення інфекційних агентів: санація поверхні імплантату, видалення твердих і м'яких відкладень; 2) за необхідності корекція протеза для поліпшення самостійної гігієни ротової порожнини.

З вищевикладеного випливає, що застосування антибіотиків як місцево, так і системно є складовою успішного лікування інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації, при чому арсенал антибіотиків і антисептиків, які використовують, нажаль, досить обмежений. Серед антисептиків найчастіше використовують розчин хлоргексидину біглюконату (0,1 –0,2 %) [75, 76]. Загалом до антисептиків належать галогеновмісні сполуки (йодинол, полівідон-йод); окиснювачі (перекис водню, натрію гіпохлорит); кислоти й основи (кислота саліцилова, розчин аміаку та); сполуки важких металів (срібла нітрат, протаргол, оксид цинку); група фенолу (резорцин); альдегіди і спирти (формальдегід, спирт етиловий); барвники (метиленовий синій); катіонні (хлоргексидин, роккал, декаметоксин, мірамістин, декасан); дьогті, смоли, мінеральні масла (іхтіол, цитраль); природного походження (шавлія, календула, ромашка, хлорофіліпт) [13].

Серед перерахованих протимікробних засобів сучасні антисептичні препарати складають основу профілактики та лікування інфекційних захворювань [6]. Антисептики належать до однієї з найпоширеніших та ефективніших груп протимікробних лікарських засобів, які володіють широким спектром дії, впливаючи на бактерії, гриби, найпростіші та віруси в малих концентраціях. Вони сприяють денатурації білка в патогенних мікроорганізмах, порушують проникність цитоплазматичної мембрани, тим самим пригнічують активність життєво необхідних ферментів мікроорганізмів. Антисептичні препарати мають високу протимікробну дію, не викликаючи при цьому сенсibiliзації організму, та характеризуються низьким рівнем розвитку резистентності у бактерій [77].

Окислювачі активні щодо більшості грам-позитивних та грам-негативних бактерій, здатні пригнічувати ріст і розмноження грибів. Так, препарати декаметоксину застосовують в медицині, в тому числі і в стоматології [78, 79].

## 1.5 Перспектива топічного використання антисептика N-хлортаурину для корекції орального мікробіоценозу

Як показано вище, колонізація дентальних імплантатів мікроорганізмами типовими для зубного нальоту за відсутності адекватних механічних та імунних механізмів очистки призводить до розвитку інфекційно-запальних процесів в ділянці одонтоімплантації. Застосування сучасних антиадгезійних стратегій для поверхонь титанових імплантатів має вирішальне значення для захисту від прилипання мікробів. Сьогодні є докази на користь системного призначення антибіотиків при імплантації зубів задля зниження ризику втрати імплантату. Проте така стратегія має свої ризики і може бути пов'язана антибіотиків з появою селекційного тиску на резистентність, але також не має значного профілактичного ефекту проти післяопераційної інфекції [80]. Тож, використання альтернативних стратегій контролю мікробного росту може бути корисним для профілактики та лікування періімплантної інфекції [74, 75, 78].

Особливий інтерес представляє N-хлортаурин (NCT) [12]. NCT є N-хлорпохідною амінокислоти таурину. Речовина належить до групи окислювачів та має природне походження – виробляється активованими гранулоцитами та моноцитами людини. NCT має доведені протизапальні властивості і приймає участь в припиненні процесу запалення [81]. Хімічна формула сполуки наведена на рис. 1.1.

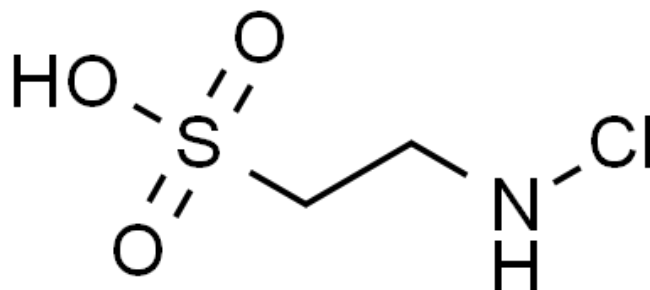


Рис. 1.1 N-хлортаурин (хімічна формула)

Успішний синтез і можливості тривалого зберігання у вигляді кристалічної натрієвої солі (Cl-HN-CH(2)-CH(2)-SO(3)Na,NCT) сприяли розвитку зацікавленості до нього, як до антисептика ендogenous походження з реальною перспективною використання *in vivo*. NCT має мікробіцидну активність проти широкого спектру мікроорганізмів. Крім прямої знищувальної активності, після сублетальної інкубації, сполука також має постантибіотичний ефект і призводить до втрати вірулентності у різних патогенів, включаючи дріжджові гриби [82, 83, 84].

В клінічних дослідженнях було доведено, що NCT добре переноситься тканинами людини при інстиляції в очі, зовнішній слуховий прохід, носові та параназальні пазухи, порожнину рота, сечовий міхур і виразки шкіри [85, 86]. Lasner M (2022) продемонстрували широку віруліцидну активність NCT при pH 7,0 проти вірусів-збудників гострих інфекцій дихальних шляхів, зокрема SARS-CoV-2, ортоміксовірусів та респіраторно-синцитіального вірусу. Було зроблено припущення, що NCT приймає участь в зниженні регуляції хемокінів та прозапальних цитокінів, в тому числі інтерлейкінів (ІЛ). В цьому контексті найбільший інтерес представляє ІЛ-6 через перспективу контролю цитокінового шторму при різних інфекційних захворюваннях, в тому числі при SARS-CoV-2 [87].

Загалом дослідження ефективності NCT є різномірними та переважно включають експерименти *in vitro*. Проте в дослідженні Lorenz K (2007) вивчали дію NCT на дентальний наліт та життєздатність його мікроорганізмів під впливом місцевого застосування NCT в якості ополіскувача ротової порожнини. Було встановлено, що 2% і 3% розчин NCT здатний значно знизити життєдіяльність бактерій зубного нальоту. Проте в дослідженні спостерігали неважкі проте часті побічні реакції, пов'язані зі зміною кольору язика та неприємний хлорний смак в роті [10]. Отримані результати спонукали Arnitz R (2018) до дослідження NCT в меншій концентрації, зокрема 1%. Було показано, що такий розчин переносився учасниками дослідження значно краще [88].

Й хоча клінічні ефекти NCT є багатообіцяючими, ряд підходів до призначення антисептика все ще потребує мікробіологічного обґрунтування. Будь-яка хронічна патологія інфекційного генезу найчастіше асоційована зі здатністю мікроорганізмів жити в складі біоплівки. При хронічній патології біоплівки пов'язані з розвитком стійкості до антибіотиків, а тому поганими клінічними результатами призначеного протимікробного лікування. В ряді досліджень також було продемонстровано, що при тривалій експозиції біоплівкові культури здатні розвивати стійкість й до антисептиків, зокрема гіпохлориту, хлоргексидину та йоду [12, 89]. Окрім того, концентрація розчину також може мати значення. Було показано, що сублетальний вплив на планктонні та біоплівкові форми бактерій призводить до селекції мутантів резистентних до хлор-вмісних речовин, але також зміною проникності клітинних мембран та чутливості до антибіотиків. Наростання цитотоксичності *Acanthamoeba* внаслідок дії сублетальних концентрацій гіпохлориту кальцію було продемонстровано Bahrami та ін. (2023) [90]. Для більш традиційних патогенів людини аналогічні результати також були описані. Показано, що сублетальна експозиція хлору сприяє здатності *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* утворювати біоплівки [91, 92]. Короткочасна дія різних концентрацій хлору призводила до експресії генів резистентності у клінічних ізолятів *A. baumannii* [93].

Хлорування питної води хлором відіграє важливу роль для профілактики та контролю інфекційних захворювань. Тим не менш, мало відомо про те, чому заходи направлені на покращенні санітарного благополуччя, пов'язані з експресією у бактерій генів стійкості до антибіотиків після хлорування. Було встановлено, що процес хлорування сприяє горизонтальному перенесенню плазмід шляхом природної трансформації, що призводить до обміну генами резистентності на рівні не тільки видів, але й родів [94, 94].

NCT має високу переносимість, що дозволяє використовувати його в терапевтичній концентрації 55 ммоль/л, що в 1000 разів перевищує концентрацію природну – 20–50 мкмоль/л. В такому діапазоні ризик селекції

резистентних мутантних клонів, вірогідно, залишається низьким, а резистентність не розвивається навіть внаслідок повторної експозиції [96].

Показано, що низькі концентрації NCT також мають хорошу бактерицидну дію. Nagl M (2000) показали, що експозиція в 200 - 500 мкМ розчині NCT вбивали протягом 2 год при рН 6,6 та 37 °С має високу мікробіцидну дію проти *E. coli* [97]. Кузьмініх С (2021) показали потенційовану активність 1% NCT в кислому середовищі проти збудників, пов'язаних зі вторинним перитонітом [98]. Дослідники також відзначили постантибіотичну дію сполуки [97, 98].

Подальші дослідження продемонстрували потенційовану активність NCT за значно коротшого впливу. Anich С (2021) показали бактерицидну активність NCT проти грам-позитивних і грам-негативних клінічних ізолятів з множинною лікарською стійкістю. 1% NCT (55 ммоль) обмежував життєздатність MRSA, стійких до лінезоліду *Staphylococcus epidermidis*, резистентних до ванкоміцину та/або лінезоліду *Enterococcus faecium*, а також *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* та *K. pneumoniae* з множинною лікарською стійкістю принаймні на 2 lg кроки КУО/мл вже після 15 хв. експозиції та повністю або майже до межі виявлення через 30 хв при рН 7,1 і 37 °С [96].

Déborá Coraça-Huber С. (2014) в дослідженнях з мілімолярними концентраціями виявили час-залежну та концентраціє-залежну активність NCT проти утворених біоплівоч в дослідіах з 0,1% - 1% (5,5–55 мМ) розчинами. Бактерицидна активність проти біоплівочових форм *S. aureus* та *S. epidermidis* виявилася приблизно в 3-6 разів повільнішою, ніж проти планктонних бактерій. Примітно, що життєздатність усіх протестованих культур бактерій в біоплівці зменшилася принаймні на 1 ступінь вже після 15 хв. інкубації в 1% NCT [12].

Знання про активність NCT проти довгострокових біоплівоч зростають, і нині цікавлять нижчі концентрації. У недавньому дослідженні Grimus V (2021) продемонстрували активність NCT проти довготривалих біоплівоч бактерій і дріжджів. Моновидові біоплівки *S. aureus*, *P. aeruginosa* та *Klebsiella*



*variicola* вирощували до показників мікробного навантаження приблизно  $1 \times 10^6$  КУО/мл, а *C. albicans* – до  $1 \times 10^5$  КУО/мл. В дослідженні кількість життєздатних бактерій зменшилася на 3-6 lg КУО/мл внаслідок експозиції в 1% розчині NCT протягом 60 хв (від 0,9 до 4,7 lg через 30 хв), при цьому грам-негативні бактерії були більш чутливими, ніж *S. aureus*. Значне зменшення *C. albicans* на 2-3 lg КУО/мл відбувалося після 4 год інкубації [81].

Тож, метою мікробіологічного моніторингу при інфекційно-запальних ускладненнях дентальної імплантації є виявлення інфекційних агентів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації задля створення підвищення ефективності менеджменту периімплантних запальних процесів з метою збереження якнайтривалішого стояння дентального імплантату.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Дизайн дослідження

Дисертаційна робота виконана на кафедрі мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології й медико-біологічної фізики та інформатики Дніпровського державного медичного університету. Обстеження пацієнтів проводилося в період з листопада 2019 року по червень 2022 року. Попередньо дослідження було схвалено комісією з питань біомедичної етики Дніпровського державного медичного університету (протокол №13, 08.11.2023). Дослідження оформлене згідно чинної нормативно-правової документації, зокрема Наказу МОЗ України №723 від 15.07.2016; Наказу МОЗ України №2415 від 3.11.2021; наказу МОЗ України №1614 від 03.08.2021, наказу МОЗ України №1766 від 18.08.2021. Реєстрація мікробіологічних досліджень – ф252/о відповідно до Наказу МОЗ України №1 від 04.01.2001 (зі змінами Наказ МОЗ України №693 (v0693282-05) від 08.12.2005). Учасники дослідження дали згоду на участь у дослідженні, на збір та обробку персональних даних та були проінформовані про мету та задачі дослідження. Для кожного пацієнта було оформлено протокол дослідження з зазначення результатів мікробіологічного дослідження. Незручностей чи ризиків для учасників дослідження не було. Очікувана користь для учасника дослідження передбачала безкоштовне мікробіологічне дослідження біологічного матеріалу, що дозволяло клініцистам приймати обґрунтовані рішення щодо корекції протимікробного лікування.

Тип дослідження – випадок-контроль. Дизайн дослідження схематично зображений на рис. 2.1.

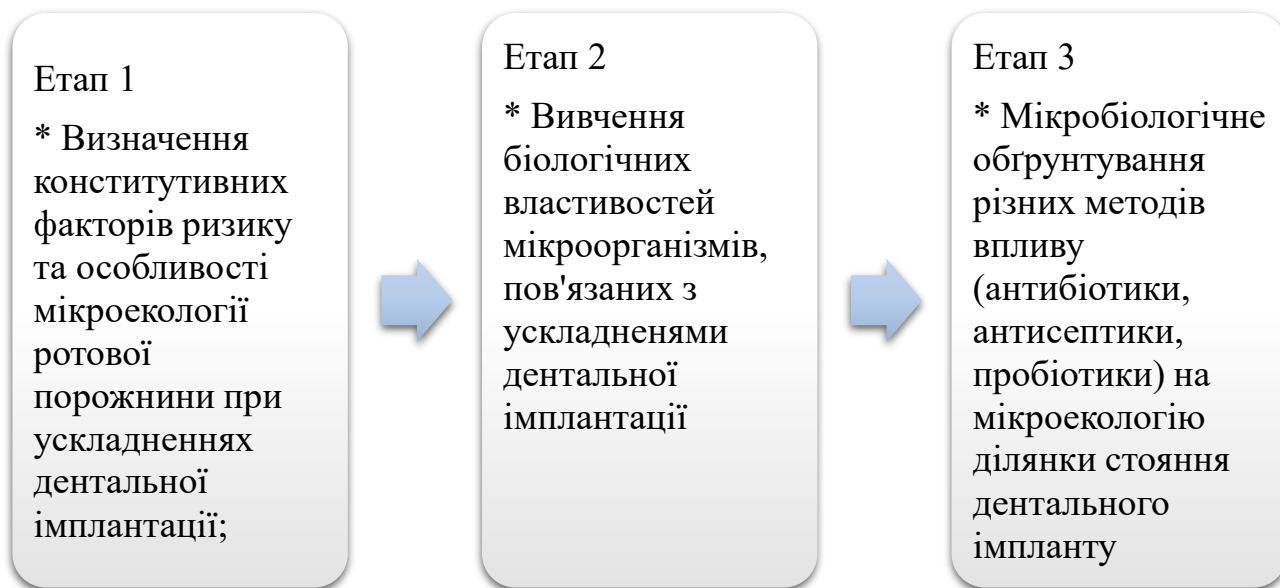


Рис. 2.1 Дизайн дисертаційного дослідження

## 2.2 Загальна характеристика пацієнтів задіяних в дослідженні

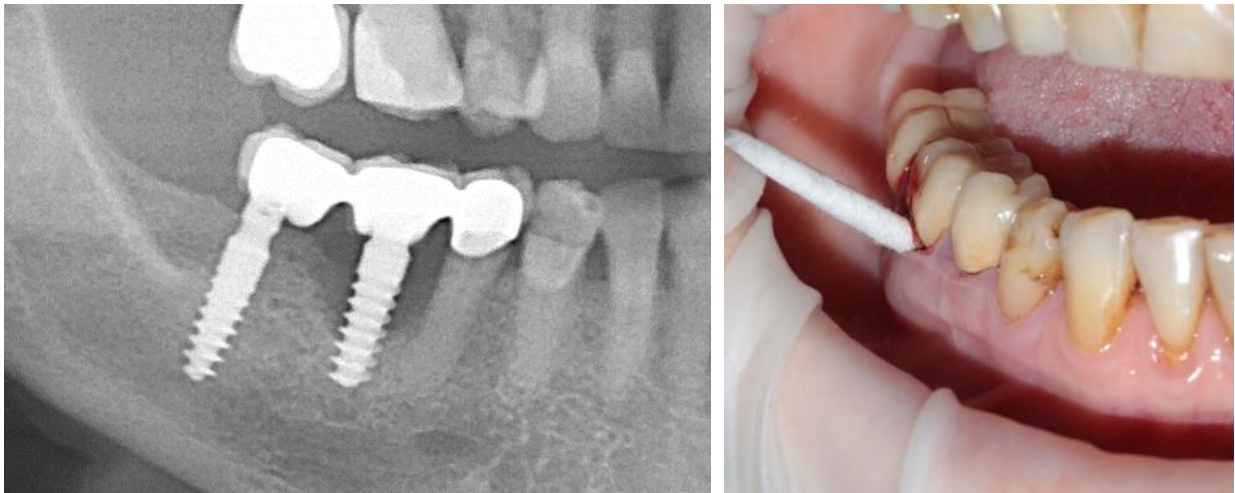
Дослідження проведене за участі дослідної та контрольної групи. Загалом досліджено 127 набори зразків від 103 пацієнтів. До дослідної групи належали пацієнти з імплантатами, які необхідно було видалити в період остеоінтеграції (рання втрата, 44 пацієнтів з 55 імплантатом) або після періоду загоєння (пізня втрата, 32 пацієнтів з 42 імплантатами). Групи втрат імплантатів порівнювали з контрольною групою – пацієнти без втрати кісткової тканини щонайменше через чотири місяці після встановлення імплантату (27 пацієнтів з 30 імплантатами). Середній вік дослідної групи становив 49 (41;59) років, контрольної – 52 (43;60) років,  $p=0,17$ .

До критеріїв включення в дослідну групу дисертаційного відносили – наявність ускладнень дентальної імплантації за типом періімплантиту з показами до видалення імплантату; дорослий вік старше 18 років.

До критеріїв виключення в дослідження відносили вік молодше 18 років, механічне ушкодження імплантатів в постімплантаційний період; запальні захворювання ротової порожнини, що етіологічно не пов'язані з дентальною імплантацією; хронічні захворювання – онкологічна патологія, цукровий діабет.

### **2.3 Методи досліджень**

До початку забору зразків пацієнтам було рекомендовано прополоскати порожнину рота для видалення решток їжі. Процедура проводилася в стоматологічному кріслі з використанням виключно стерильного обладнання та контейнерів. Місце забору зразків нальоту ізолювали від слини з використанням ватних валиків або кофердаму [99, 100, 101]. В якості біологічного матеріалу для дослідження використали мазки-відбитки з поверхні імплантату та періімплантної ділянки, зразки м'яких тканин періімплантної ділянки, зубний імплантат (рис. 2.2). У кожного пацієнта було взято три зразки стерильними тонкими ватними тампонами з періімплантної борозни навколо інфікованих або здорових імплантатів. Зазвичай, проби брали з мезіальної та дистальної щічної сторони цільових зубів. Надслизовий наліт видаляли ватним тампоном перед взяттям підслизового зразка. Далі поверхню протеза висушували на повітрі. Лише після виконання цих заходів було взято зразок підслизової оболонки. Ці заходи запобігли змішуванню супра- та підслизової бляшки під час збору зразків [100].



А

Б

Рис. 2.2 А – явища періімплантиту з резорбцією кісткової тканини; Б – взяття зразку для мікробіологічного дослідження за допомогою стерильного тонкого ватного тампону з періімплантної борозни навколо інфікованих імплантатів від пацієнтки з пізнім періімплантитом з резорбцією кісткової тканини.

Будь-які наявні ознаки запалення (нагноєння кишені) були задокументовані. У пацієнтів із декількома імплантатами зразки збирали для кожного імплантату окремо, але пізніше дані об'єднували. Якщо був діагностований важкий періімплантит проводили експлантацію. Дослідження експлантованого імплантату проводили, як описано раніше [6, 100, 101].

Отриманий біологічний матеріал *ex tempore* брали в роботу.

### 2.3.1 Виділення чистої культури та її ідентифікація

При роботі зі шматочками м'яких тканин, кісткової тканини або безпосередньо імплантатом, спочатку проводили обробку ультразвуком, як було показано раніше – частота 40 kHz, тривалість 7 хв, температура 22°C [102].

Отриманий матеріал засівали на поживні середовища. Для селективного виділення роду *Staphylococcus* використовували манітол-сольовий агар, для роду *Streptococcus* – відповідний селективний агар. Для виділення бактерій

сімейства Enterobacteriaceae та інших невибагливих грам-негативних мікроорганізмів – середовище Ендо. Для виділення грибів патологічний матеріал засівали на агар Сабуро з гентаміцином. Колумбійський агар з 5% овечої крові використовували для неселективної культивуації, вирощування вибагливих мікроорганізмів та оцінки гемолітичної активності [103, 104, 105].

Засіяні чашки Петрі витримували в термостаті протягом 72 год при температурі 37°C. Чашки Петрі з кров'яним агаром та манітол-сольовим агаром залишали за кімнатної температури до 5 діб для виділення малих колоніальних форм [103, 104]. Чашки Петрі з агаром Сабуро витримували до 7 діб (3 доби в термостаті та 4 за кімнатної температури) [103].

Ауксотрофність до геміну, тимідину та менадіону малих колоніальних форм *S. aureus* перевіряли шляхом пересіву нічної культури на агар Мюллера-Хінтона (МХА) з додаванням 125 мкг/мл тимідину, або 25 мкг/мл менадіону, або 10 мкг/мл геміну. Ауксотрофія вважалася присутньою, якщо ізолят зростав у вигляді колоній нормального розміру на МХА з добавками та не ріс на агарі без них. Кожен етап проводився в двох повторах в два окремі дні [106, 107].

Для селективного виділення строгих анаеробів та капнофілів використовували GenBox з реагентами для створення відповідних атмосферних умов [103, 105].

Ідентифікація мікроорганізмів проводилася з урахуванням морфологічних, тинкторіальних, культуральних та біохімічних властивостей згідно Визначником бактерій Берджі. Для ідентифікації використали набори комерційні набори, всі досліди з ідентифікації проводили в 3-кратному повторенні.

Грам-позитивні коки диференціювали за здатністю продукувати каталазу (10% розчин перекису водню). Для ідентифікації *Staphylococcus spp.* використали такі показники біохімічної активності: уреаза, аргінін, орнітин,  $\beta$ -галактозидаза,  $\beta$ -глюкуронідаза, ескулін, нітрати, фосфатаза, галактоза, сахароза, трегалоза, манітол, ксилоза, мальтоза, маноза, лактоза. Швидку

ідентифікацію *S. aureus* проводили на основі наявності характерного пігменту, плазма-коагулазної активності та на хромогенному агарі.

Для ідентифікації *Streptococcus spp.* та інших споріднених коків використовували такі показники біохімічної активності: гіпурат, фосфатаза, лейцин амінопептидаза,  $\beta$ -глюкуронідаза,  $\alpha$ -галактозидаза, ескулін, аргінін, уреаза, манітол, сорбітол, трегалоза, лактоза, рафіноза, інулін, мелібіоза, рибоза. Гемолітичну активність визначали на кров'яному агарі. Проводили пробу на чутливість до оптохіну та дезоксихолату. Досліди доповнені тестом на ацетоїн та гідроліз пірролідоніл- $\beta$ -нафтіламідю.

Ідентифікацію *Haemophilus spp.* проводили з урахуванням чутливості до факторів росту – X, V або X+V [103].

Грам-негативні мікроорганізми диференціювали за наявністю цитохромоксидази та здатністю ферментувати/ окислювати глюкозу в анаеробних умовах. Для ідентифікації сімейства Enterobacteriaceae використовували біохімічні показники: уреаза, аргінін, орнітин, лізин, сірководень, цитрат Сіммонса, малонат,  $\beta$ -галактозидаза, саліцин, сорбітол, мелібіоза, целобіоза, лактоза, трегалоза, манітол,  $\beta$ -глюкуронідаза, дульцит, адонітол, арабітол, сахароза, інозітол, рафіноза, ескулін,  $\beta$ -ксилозидаза. Для ідентифікації не-ферментаторів та деяких ферментаторів глюкози використовували наступні показники біохімічної активності: аргінін, індол, уреаза, глюкоза, лізин, фруктоза, сахароза, інозитол,  $\beta$ -галактозидаза, фосфатаза, бета-глюкуронідаза, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідаза, манітол, ксилоза, целобіоза, галактоза, нітрати, нітрити, ескулін, гамма-глутамілтрансфераза, лактоза, мальтоза, трегалоза, цитрат Сіммонса.

Ідентифікацію анаеробів проводили з використання наступних тестів: індол, глюкоза, мальтоза, фруктоза, галактоза, лактоза, мелецитоза, уреаза, нітрати, сахароза, саліцин, трегалоза, манітол, рамноза, N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідаза,  $\beta$ -глюкуронідаза, ескулін, маноза, рафіноза, целобіоза, ксилоза, арабіноза, сорбітол.

Ідентифікацію грибів роду *Candida* проводили шляхом пересіву на хромогенне середовище та, за необхідності, з використанням тестів на уреазу, сахарозу, мальтозу, лактозу, галактозу, трегалозу, целобіозу, пролін. Ідентифікацію пліснявих грибів проводили з урахуванням культуральних особливостей та морфології спорангію.

Діагностичні комерційні тест-набори дозволяли присвоїти кожному ізоляту 8-ми або 9-ти значний номер для подальшої ідентифікації за допомогою книги кодів, яка, в тому числі, давала змогу встановити відсоток точності ідентифікації, а також Т-індекс типовості ізоляту. Книги кодів до вказаних наборів доступні онлайн <https://www.erbalachema.com>.

### **2.3.2 Визначення чутливості до протимікробних засобів.**

Утворення біоплівки є провідним фактором, відповідальним за невдачу терапевтичних практик при багатьох інфекційно-запальних станах. Описано різні методи тестування біоплівок на чутливість до антибіотиків, але, на сьогодні, жоден з методів не є валідованим та рекомендованим для рутинного використання в клінічній практиці. В нещодавньому мета-аналізі дійшли висновку щодо відсутності переконливих доказів щодо переваг тестування біоплівки, але не планктонної культури на чутливість до антибіотиків [108]. Тому в нашій роботі ми спиралися на рекомендації надані EUCAST [109, 110, 111]. Вивчення профілю резистентності до антибіотиків проводили усім ізолятам, отриманих з ділянки стояння імплантату, згідно з рекомендаціями EUCAST.

Чутливість до більшості антибіотиків визначали диск-дифузійним методом [109, 110, 111]. Тестування на чутливість до антибіотиків проводили на агарі МХА або МХА з 5% дефібринованою кінською кров'ю + 20 мг/л  $\beta$ -NAD (МХА-К). Використані наступні диски з антибіотиками:

- для тестування ізолятів *Staphylococcus spp.*: бензилпеніцилін 1 ОД (P1), ампіцилін 2 мкг (AMP), цефокситин 30 мкг (CX), норфллоксацин 10 мкг (NX), ципрофлоксацин 5 мкг (CIP), левофлоксацин 5 мкг (LE),



моксифлоксацин 5 мкг (МО), амікацин 30 мкг (АК), гентаміцин 10 мкг (GEN), тобраміцин 10 мкг (ТОВ), еритроміцин 15 мкг (E15), кліндаміцин 2 мкг (CD2), тетрациклін 30 мкг (TET), тайгециклін 15 мкг (TGC), міноциклін 30 мкг (MIN), лінезолід 10 мкг (LZ), ріфампіцин 5 мкг (RIF), фузидієва кислота 10 мкг (FC), триметоприм/ сульфаметоксазол 25 мкг (COT);

- для тестування ізолятів *Streptococcus spp.*: бензилпеніцилін 1 ОД, ампіцилін 2 мкг, оксацилін 2 мкг (ОХ), цефепім 30 мкг (СРМ), цефотаксім 5 мкг (СТХ), цефтріаксон 30 мкг (СТР), цефуроксім (СХМ), норфлоксацин 10 мкг, ципрофлоксацин 5 мкг, левофлоксацин 5 мкг, тейкопланін 30 мкг (ТЕІ), ванкоміцин 5 мкг (VA), еритроміцин 15 мкг, кліндаміцин 2 мкг, тетрациклін 30 мкг, тайгециклін 15 мкг, міноциклін 30 мкг, лінезолід 10 мкг, лефамулін 5 мкг, ріфампіцин 5 мкг, триметоприм/ сульфаметоксазол 25 мкг;

- для тестування ізолятів неферментуючих грам-негативних мікроорганізмів (НФГНМО): піперацилін 30 мкг (PI), піперацилін/ тазобактам 30/6 мкг (PIT), тікарцилін/ клавуланова кислота 75/10 мкг (TCC), цефепім 30 мкг, цефтазідім 10 мкг (CAZ), цефідерокол 30 мкг (FDC), цефтолозан/ тазобактам 30/10 мкг (C/T), доріпінем 10 мкг (DOR), іміпенем 10 мкг, меропенем 10 мкг (MER), азтреонам 30 мкг (AT), ципрофлоксацин 5 мкг, левофлоксацин 5 мкг, амікацин 30 мкг, гентаміцин 10 мкг, тобраміцин 10 мкг, триметоприм/ сульфаметоксазол 25 мкг;

- для тестування представників Enterobacterales: ампіцилін 10 мкг (AMP), ампіцилін/ сульбактам 10/10 мкг (A/S), амоксицилін/ клавуланова кислота 20/10 мкг (AMC), піперацилін 30 мкг, піперацилін/ тазобактам 30/6 мкг, тікарцилін 75 мкг, тікарцилін/ клавуланова кислота 75/10 мкг, цефепім 30 мкг, цефтазідім 10 мкг, цефтріаксон 30 мкг, цефотаксім 5 мкг, цефуроксім 30 мкг, цефідерокол 30 мкг, цефтолозан/ тазобактам 30/10 мкг, іміпенем 10 мкг, меропенем 10 мкг, азтреонам 30 мкг, ципрофлоксацин 5 мкг, моксифлоксацин 5 мкг, левофлоксацин 5 мкг, офлоксацин 5 мкг, амікацин 30 мкг, тобраміцин 10 мкг, гентаміцин 10 мкг.

- для тестування ізолятів *H. influenzae*: бензилпеніцилін 1 ОД, ампіцилін 2 мкг (AMP), амоксицилін/ клавуланова кислота 2/1 мкг, піперацилін/ тазобактам 30/6 мкг, цефепім 30 мкг, цефіксим 5 мкг (CPM), цефотаксим 5 мкг, цефтолозан/ тазобактам 30/10 мкг, цефтріаксон 30 мкг, цефуроксім 30 мкг, ертапенем 10 мкг (ERT), іміпенем 10 мкг, меропенем 10 мкг, ципрофлоксацин 5 мкг, левофлоксацин 5 мкг, моксіфлоксацин 5 мкг, налідиксова кислота 30 мкг (NA), офлоксацин 5 мкг, тетрациклін 30 мкг, міноциклін 30 мкг, хлорамфенікол 30 мкг, триметоприм/ сульфаметоксазол 25 мкг;

- для тестування строгих анаеробів: бензилпеніцилін 1 ОД, піперацилін/ тазобактам 30/6 мкг, меропенем 10 мкг, кліндаміцин 2 мкг, метронідазол 5 мкг (MT5).

Методом мікро-серійних розведень визначали чутливість до ванкоміцину у грам-позитивних коків, до колістину у грам-негативних паличок; до амфотерицину В, воріконазолу та ітраконазолу – у грибів.

За результатами дослідження клінічні ізоляти поділяли на чутливі, чутливі при збільшеній експозиції та стійкі до дії даного антибактеріального засобу [109, 111].

Для контролю якості визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків використовували референтні штами *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 25922, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Candida krusei* ATCC 6258 з музею живих культур кафедр мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології та медико-біологічної фізики й інформатики ДДМУ. Тестування контрольних штамів проводили відповідно до описаних вище методів паралельно з дослідженням клінічних ізолятів. Результати визначення чутливості контрольних штамів мікроорганізмів співставляли з відповідними показниками їх паспортної характеристики. Якщо вони відповідали паспортним характеристикам цих штамів, то умови постановки експерименту вважали стандартними, а результати визначення чутливості клінічних ізолятів, отримані в цих умовах, визнавали достовірними.

Ізолятами з розширеною лікарською стійкістю вважали ті, що мали набути (тобто нетипову) відсутність чутливості принаймні до одного антибіотика з трьох або більше хімічних класів (наприклад,  $\beta$ -лактам, аміноглікозид, макролід) [112].

Визначення фенотипу резистентності ізолятів з розширеною лікарською стійкістю проводили згідно з рекомендаціями EUCAST. Алгоритм скринінгу проводився, як показано на рис. 2.1 [адаптовано з 113].

Зона затримки росту меропенему < 25 мм			
Синергія тільки з ФБК <sup>1</sup>	Синергія з ФБК та клоксациліном	Синергія тільки з ЕДТА <sup>2</sup>	Синергії немає
Карбапенемази класу А	AmpC (набуття через плазмідичи хромосомально) + втрата поринів	МБЛ	БЛРС <sup>3</sup> + втрата поринів та ОХА-48

<sup>1</sup> фенілборонова кислота; <sup>2</sup> етилендіамінтетраоцтова кислота; <sup>3</sup> бета-лактамази розширеного спектру

Рис. 2.3 Алгоритм виявлення виду продукованих карбапенемаз.

В дослідженнях з виявлення типу продукованих карбапенемаз використано наступні комбіновані диски: меропенем+фенілборонова кислота, меропенем + клоксацилін, меропенем + ЕДТА. Результат вважали позитивним при збільшенні діаметру зони затримки росту щонайменше на 4 мм в порівнянні з моноагентом.

### 2.3.3 Визначення адгезивних властивостей отриманих культур

Для вивчення адгезивних властивостей були обрані культури мікроорганізмів, виділені при ускладненнях дентальної імплантації.

Адгезія мікроорганізмів є важливою стадією утворення біоплівки і характеризується прикріпленням вільно плаваючих планктонних клітин до біологічної чи абіотичної поверхні [114, 115]. Для здатності отриманих ізолятів до адгезії застосували методику Бриліса В. І. в модифікації – замість

еритроцитів людини I (0) Rh- використали комерційно доступні консервовані еритроцити барана [116]. Мазки еритроцитів з адгезованими на них мікроорганізмами фарбували за Романовським-Гімзою.

Визначали такі показники:

- СПА – середній показник адгезії, тобто середня кількість мікроорганізмів, що прикріпилися до поверхні одного еритроцита при підрахунку не менше 25 еритроцитів, враховуючи не більше п'яти з них в одному полі зору;
- КУЕ – коефіцієнт участі еритроцитів, тобто відсоток еритроцитів, що мають на своїй поверхні адгезовані мікроорганізми;
- ІАМ – індекс адгезивності мікроорганізму, середня кількість мікробних клітин на еритроциті, враховуючи тільки еритроцити, що беруть участь в адгезивному процесі. Формула для підрахунку ІАМ:

$$ІАМ = \frac{СПА}{КУЕ} * 100 \quad (2.1)$$

Отримані дані заносили в таблицю результатів. Культури вважали неадгезивними при  $ІАМ \leq 1,75$ , низькоадгезивними – від 1,76 до 2,5, середньоадгезивними – від 2,51 до 4,0, високоадгезивними – при ІАМ від 4,00 [114, 115].

#### **2.3.4 Визначення біоплівко-утворювальних властивостей отриманих культур**

Вивчення здатності клінічних ізолятів з ділянки стояння імплантату формувати біоплівку вивчали в полімерних планшетах з наступним забарвленням 1%-розчином кристалічного фіолетового [117, 118, 119, 120]. Досліди проводили в аеробних умовах.

Нічну культуру в триптозно-соєвому бульйоні (ТСБ) розвели 1:100 у свіжому середовищі. Аліквоти 100 мкл отриманої суспензії внесли в U-подібні лунки 96-лункового планшета. На 1 ізолят – 5 лунок. Засіяний планшет витримали протягом 24 год в термостаті при 37°C. Після інкубації з лунок

відібрали культуру, планшет тричі промили стерильною дистильованою водою. Далі в кожен лунку внесли аліквоти 125 мкл 0,1% розчину кристалічного фіолетового та залишили 15 хв за кімнатної температури. Після інкубації відібрали фарбник, планшет тричі промили стерильною дистильованою водою та висушили. Для оцінки біоплівкоутворення в кожен лунку планшету додали аліквоти 125 мкл 30% оцтової кислоти та витримали протягом 15 хв за кімнатної температури. Аліквоти 125 мкл солюбізованого фарбника перенесли в новий планшет, що містить лунки з плоским дном. Оптичну щільність утвореної біоплівки визначали в мікропланшетному рідері при довжині хвилі 550 нм. Негативний контроль – 30% оцтова кислота [117, 118, 119].

Для подальшої оцінки біоплівкоутворення використовували формулу:

$$\frac{M(\text{ОЩд})}{M(\text{ОЩк})} = \frac{M(\text{ОдОЩд})}{M(\text{ОдОЩк}) + 3 * SD(\text{ОдОЩк})}, \quad (2.2)$$

де ОЩд – оптична щільність досліджу,

ОЩк – оптична щільність контролю,

ОдОЩд – одиниць оптичної щільності в дослідних лунках,

ОдОЩк – одиниць оптичної щільності в контрольних лунках,

М – середнє значення,

SD – стандартне відхилення

Здатність ізоляту до продукції біоплівки визначали за наступним принципом (табл. 2.1):

Параметри оцінки ефективності біоплівкоутворення з використанням кристалічного фіолетового [117, 118]

Оптична щільність біоплівки	Продукція біоплівки	
$O_{\text{Щк}} \leq \sim \leq O_{\text{Щк}}$	Відсутня	-
$1 * O_{\text{Щк}} < \sim \leq 2 * O_{\text{Щк}}$	Слабка	+
$2 * O_{\text{Щк}} < \sim \leq 4 * O_{\text{Щк}}$	Помірна	++
$> 4 * O_{\text{Щк}}$	Щільна	+++

$O_{\text{Щк}}$  – оптична щільність контролю

### 2.3.5 Визначення впливу NCT на планктонні форми мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації

Дослідження ефективності NCT проти мікроорганізмів, асоційованих з ускладненням дентальної імплантації проводили у 2 серіях дослідів – методом дифузії в агар та після інкубації в приготовану розчині. Останній метод дозволив оцінити динаміку життєздатності досліджуваних культур.

Для дослідження підготували розчин 1% розчин NCT з рН 7,1; а також стандартизовані суспензії досліджуваних культур з оптичною густиною 0,5 за МакФарланд. Досліджувані культури газом засівали на МХА. В найкоротший проміжок часу в товщі агару робили «колодязі» діаметром до 5 мм, в які вносили 100 мкл аліквоти розчину NCT. Після нічної інкубації проводили замір зон затримки росту. Оскільки, референсні значення відсутні, то за критерій «чутливий» до NCT був взятий рубіж 15 мм [84]. Для кожної культури досліди проведені в 3 повтореннях. Ефективність NCT досліджуваної концентрації проти культур з розширеною лікарською стійкістю порівнювали з чутливістю умовно чутливих ізолятів.

В аналогічному дослідженні, але шляхом витримки в приготованому розчині NCT з кінцевою концентрацією 1% (55мМ), рН 7,1, продовжували

вивчати можливості впливу на мікроорганізми, асоційовані з ускладненнями дентальної імплантації. З добових культур мікроорганізмів готували суспензію в 1% розчині NCT. Оптична щільність дослідної суспензії 0,5 Од за МакФарланд. Отриману суспензію витримували до 60 хв в термостаті при температурі 37<sup>0</sup>С. Висіви з пробірок (100 мкл) проводили кожні 10-15 хв та по завершенні експерименту [121]. В якості контролю використали суспензію музейних культур (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) в ТСБ та в комерційному галоген-вмісному антисептику з доведеною ефективністю. На кожний дослід робили по 3 повторення. Отримані дані заносили в таблицю результатів.

### **2.3.6 Визначення впливу NCT на тривало сформовану біоплівку**

Це дослідження було проведено для вивчення *in vitro* активності NCT проти довготривалих біоплівок на титановому матеріалі, який використовується для імплантатів в стоматології.

Титанові диски (площа поверхні 109 мм<sup>2</sup>) замочували в хлор-вмісному стерилізаторі відповідно до рекомендацій виробника, обережно промивали стерильним фізіологічним розчином і потім автоклаували. Стерильні диски в асептичних умовах поміщали в 6-лунковий планшет, що містив 2 мл ТСБ, в який вносили 0,1 мл відповідного мікробного ізоляту в кількості 2×10<sup>5</sup> КУО/мл. Пробірки витримували при 37<sup>0</sup>С протягом 8 тижнів із щоденним струшуванням. ТСБ замінювали кожні 72 год. Дослідження антимікробних властивостей досліджуваних ізолятів проводили 1 раз на тиждень.

Після кожного інтервалу екстраговані диски, вкриті біоплівкою, промивали стерильним фізіологічним розчином, далі занурювали в лунки з 1% розчином NCT та витримували при 37 °С протягом 30 хв, 1 год або 3 год. По завершенні відповідного часу експозиції розчин NCT інактивували 1% гістидином/метіоніном. Далі імплантати переносили в стерильний ТСБ і обробляли ультразвуком протягом 5 хв на ультразвуковій водяній бані, щоб

відокремити живі бактерії від диска. 10-мкл аліквоти наносили на МХА або МХА-К в нерозведеному вигляді та після 10-кратного і 100-кратного розведення в фізіологічному розчині. Паралельно проводили негативні контролю у фосфатному буферному розчині (ФБР). Чашки витримали при 37°C протягом 24 год; потім підраховували кількість КУО/мл. Встановлена межа виявлення становила 100 КУО/мл.

### **2.3.7 Визначення впливу NCT метаболічну активність досліджуваних культур**

Щоб дослідити вплив 1% розчину NCT на мікробний метаболізм в біоплівках, було проведено тест ХТТ. ХТТ є різновидом солей тетразолію, розчини яких прозорі та нетоксичні для клітин. Коли додаються метаболічні активатори, життєздатні клітини перетворюють ХТТ у формазан, який має добре реєстроване забарвлення [122].

Дослідження вимірювало відновлення 2,3 – біс – (2 – метокси – 4 – нітро – 5 – сульфофеніл) – 2Н – тетразолій – 5 – карбоксаміду до помаранчевого формазанового продукту. Біоплівки вирощували при 37°C в полістирольних 96-лункових планшетах, а потім промивали ФБР. В подальшому біоплівки обробляли 1% NCT шляхом експозиції протягом 30 хв, 1 год або 3 год за температури 37°C. По завершенні необхідного часу розчин відбирали, лунки тричі промивали стерильним ФБР. Після відбору буферу в лунки вносили ХТТ на 2 год; планшети витримували протягом 2 год в темряві за температури 37°C. Рідину з лунок відбирали та вносили в нові стерильні 96-лункові планшети. Оптичну щільність поглинання вимірювали при довжині хвилі 550 нм. Усі значення розраховували в порівнянні з негативним контролем (ФБР) [123].



## 2.4 Методи статистичного аналізу отриманих результатів

Обробка отриманих результатів дослідження з використанням біостатистичних методів проводилася за допомогою програмних продуктів STATISTICA v.6.1 (Statsoft Inc., США) (ліцензійний № AGAR909E415822FA), Excel 2010 (Ліцензійний № 02260-018-0000106-48794) та включала описові та аналітичні статистичні методи [124, 125].

Опис первинного обсягу даних здійснювався за допомогою методів дескриптивної статистики. Перевірка гіпотези про нормальність розподілу проводилася за критеріями Шапіро-Уїлка. В залежності 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 (%) із 95% ДІ, розрахованим за методом Вальда.

Статистична значимість відмінностей кількісних показників в групах визначалася з використанням непараметричних критеріїв Манна-Уїтні ( $U$ ) для незалежних значень та Вілкоксона ( $W$ ) для залежних. Множинне порівняння незалежних вибірок – за непараметричним дисперсійним аналізом Краскела-Уолеса ( $H$ ), залежних вибірок – за тестом ANOVA Фрідмана; відносних величин – за критерієм Хі-квадрат ( $\chi^2$ ) та двостороннім точним критерієм Фішера ( $F$ ).

Для визначення зв'язку між безперервним кількісним показником та 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  $r$  та зворотній – при негативному значенні  $r_s$ . Зв'язок вважався сильним при значенні коефіцієнту кореляції  $\geq 0,7$ , середнім – 0,3-0,69, слабким – 0-0,29.

Критичне значення рівня статистичної значущості ( $p$ ) приймалося  $\leq 5\%$   
( $p \leq 0,05$ ).

### МІКРОБНИЙ ПРОФІЛЬ ПЕРИІМПЛАНТНОЇ ДІЛЯНКИ УЧАСНИКІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

За останні десятиліття знання про бактеріальні інфекції докорінно змінилися [126, 127]. Бачення патогенезу хронічних інфекційно-запальних процесів сьогодні пов'язують з утворення організованих мікробних консорціумів, мало сприйнятливих до імунного кліренсу, механічної елімінації та протимікробної терапії [11]. Біотоп ротової порожнини представлений унікальною і складно сформованою біоплівкою багатою на корисні мікроорганізми [128]. Проте, в ряді випадків, патологічні зсуви в якісному та кількісному складі мікробіоти, характерної для даної екологічної ніші, можуть бути пов'язані з появою інфекційно-запальних процесів [3].

Тож, метою роботи на даному етапі дослідження було провести аналіз складу мікробної популяції періімплантної кишені та визначити фактори, пов'язані зі втратою імплантату.

#### **3.1 Конститутивні фактори, пов'язані з розвитком інфекційно-запальних процесів в ділянці стояння імплантату**

Задля оцінки факторів, пов'язаних з розвитком ускладнень дентальної імплантації, епізоди втрати імплантату підлягали стратифікації за статтю, областю імплантації, використанням антибіотиків протягом останніх трьох місяців, та гігієнічними практиками (регулярне полоскання рота).

Розподіл пацієнтів за локалізацією встановлених імплантатів був наступним: протезування передніх верхніх зубів – 4,7% (n = 66); передніх нижніх – 8,7% (n = 11); премолярів верхніх – 17,3% (n = 22); премолярів нижніх – 15,7% (n = 20); молярів верхніх – 32,3% (n = 41); молярів нижніх – 21,3% (n

= 27). З анамнезу життя встановлено, що за останні 3 місяці антибіотики отримували 17,2% (n = 16) учасників когорти втрати імплантату проти 23,5% (n = 8) учасників дослідної групи. Розподіл втрати імплантату за статтю становив: 33,3% (n = 31) – чоловіки та 66,7% (n = 62) – жінки. В групі зі збереженим імплантатом розподіл за статтю становив 44,1% (n = 15) – чоловіки та 55,9% (n = 19) – жінки. Тож, область імплантації ( $\chi^2 = 1,31$ ;  $df = 5$ ;  $p > 0,05$ ), використання антибіотиків протягом останніх трьох місяців ( $\chi^2 = 1,13$ ;  $p > 0,05$ ) та стать ( $\chi^2 = 1,76$ ;  $p > 0,05$ ) не показали суттєвого впливу на наслідки дентального протезування.

Серед факторів, пов'язаних з ускладненнями дентальної імплантації, в нашому дослідженні ми виділили недотримання гігієни порожнини рота, куріння, пародонтит та зсуви в мікробному складі біоплівки.

В групі втрати імплантату куріння відмічали в 60,2% випадків (n = 56) – проти 26,5% в контрольній групі (n = 9) ( $\chi^2 = 10,03$ ;  $p < 0,01$ ). При чому така тенденція однаково зберігалася, як при ранній, так і при пізній втраті імплантату ( $\chi^2 = 1,87$ ;  $p > 0,05$ ). Іншим фактором, характерним для групи втрати імплантату було діагностування пародонтиту. Пацієнти з втратою імплантату мали пародонтит у 66,7% випадків (n = 62), контрольна група – 26,5% (n = 10) ( $\chi^2 = 12,60$ ;  $p < 0,01$ ). Аналогічно до оцінки впливу куріння, не було різниці між впливом пародонтиту на час відторгнення протезу ( $\chi^2 = 0,44$ ;  $p > 0,05$ ).

Недотримання гігієни порожнини рота може бути пов'язане з надмірним ростом біоплівки та потенційно-патогенних мікроорганізмів. В нашому дослідженні недотриманні гігієни порожнини рота також було пов'язано з відторгненням імплантату. В дослідній групі регулярне полоскання порожнини рота практикували в 19,1% випадків (n = 18), в контрольній – 41,2% (n = 14) ( $\chi^2 = 7,50$ ;  $p < 0,01$ ). При порівнянні наслідків для ранньої та пізньої втрати імплантату статистично значущих результатів не отримано ( $\chi^2 = 0,04$ ;  $p > 0,05$ ).

### 3.2. Мікробіологічна характеристика мікросередовища ротової порожнини в ділянці імплантації

Всі зразки, отримані від учасників дослідження, були позитивні на мікробіоту. Загалом отримано 229 унікальних ізолятів. Монокультуру мали в 40,9% випадків (n=52). Більшість ідентифікованих культур належали до трьох філ – *Firmicutes*, *Bacteroidetes* та *Proteobacteria*. З використанням темнопольної мікроскопії в 7,1% зразків (n=9) виявлено представників філи *Spirochaetota*, ідентифікація не проводилася та в розрахунки за ізолятами не включені.

Переважає більшість ізолятів належала до філи *Firmicutes* – 60,7% (n=139). Представниками даного таксону були факультативні та строгі анаероби – *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Aerococcus* та *Peptostreptococcus spp.* і *Veilonella spp.*

Культуру *Staphylococcus spp.* отримали з 31,5% клінічних зразків. Загальна частка роду складала 17,5% (n=40). Видовий склад *Staphylococcus spp.*, виділених з периімплантної ділянки та імплантатів включав *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus saprophyticus*, *S. lugdunensis*, *S. simulans*. Серед усіх представників роду *Staphylococcus* коагулаза-позитивні ізоляти становили 75,0%, а саме *S. aureus*. Усі коагулаза-негативні види мали приблизно однакову частку – складала близько 3-4%.

Культури роду *Streptococcus* виділили 36,2% клінічних зразків. Загальна частка роду становила 20,2% (n = 46). Серед представників роду *Streptococcus* були ідентифіковані види *Streptococcus pyogenes* (n = 12) та представники групи *viridans* (n = 34), зокрема *Streptococcus mitis* (n = 16), *Streptococcus oralis* (n = 10), *Streptococcus sanguinis* (n = 8). Тож, частка групи *viridans* складала 73,9%.

Ізоляти, визначені, як приналежні до роду *Aerococcus*, в нашому дослідженні налічували 8 культур. Подальше проведення біохімічних тестів дозволило провести ідентифікацію до видового рівня. Встановлено, що

отримані ізоляти мали профіль біохімічних властивостей типовий для *A. viridans*. Тож, *A. viridans* було отримано з 6,3% проб. Загальна частка роду становила 3,5%.

Ізоляти родів *Peptostreptococcus* (n = 15) та *Veilonella* (n = 11) разом налічували 26 культур. Представники роду *Streptococcus* виділили з 11,8% проб. Загальна частка роду *Peptostreptococcus* становила 6,6%. Ізоляти роду *Veilonella* були ідентифіковані, як *V. parvula* (n = 9) та *Veilonella denticarosa* (n = 2). Культури роду *Veilonella* були отримані з 8,7% проб. Загальна частка роду *Veilonella* становила 4,9%.

Представники філи *Proteobacteria* займали друге місце були та були отримані з 27,6% проб (n=32). Ідентифіковано роди *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* та *Haemophilus*.

Ізоляти роду *Neisseria* налічували 7 культур, ідентифікованих як *Neisseria subflava*. Патогенних представників роду *Neisseria* в дослідженні не було. Отримані культури *N. subflava* були отримані з 5,5% клінічних зразків. Загальна частка *N. subflava* становила 3,1%.

Ізоляти роду *Acinetobacter* налічували 6 культур, ідентифікованих, як *A. baumannii* (n = 5) та *Acinetobacter lwoffii* (n = 1). Культури роду *Acinetobacter* були виділені з 4,7% проб. Загальна частка роду *Acinetobacter* становила 2,6%.

Всі ізоляти роду *Klebsiella* були ідентифіковані, як *K. pneumoniae* (n = 12). Інших представників порядку *Enterobacteriales* в дослідженні не було. Культури роду *Klebsiella* були виділені з 9,4% проб. Загальна частка роду становила 12,6%.

Культури, що належали до філи *Fusobacteria*, налічували 17 ізолятів та були виділені з 13,4%. Загальна частка становила 7,4%. В нашому дослідженні всі отримані ізоляти були ідентифіковані, як *F. necrophorum*.

Представники філи *Bacteroidetes* налічували 16 культур та включали роди *Porphyromonas* (n = 10) та *Prevotella* (n = 6). Представники роду *Porphyromonas* були отримані з 7,9% клінічних зразків, а їх загальна частка становила 4,4%. Представники роду *Porphyromonas* були ідентифіковані, як

*P. gingivalis* (n = 4) та *P. endodontalis* (n = 6). Представники роду *Prevotella* були отримані з 4,7% проб, відібраних для дослідження. Загальна частка роду *Prevotella* становила 2,6%. Отримані ізоляти включали єдиного представника роду, а саме *Prevotella intermedia*.

В нашому дослідженні виділені культури грибів налічували 24 ізоляти. Всі отримані ізоляти належали до роду *Candida*, та включали єдиного представника – *Candida albicans*. Культури грибів були отримані з 18,9% клінічних зразків та в загальній пропорції налічували 10,5% ізолятів.

Таксономічний склад мікроорганізмів, що населяють тканин з одонтоімплантацією узагальнено та відображено на рис. 3.1.

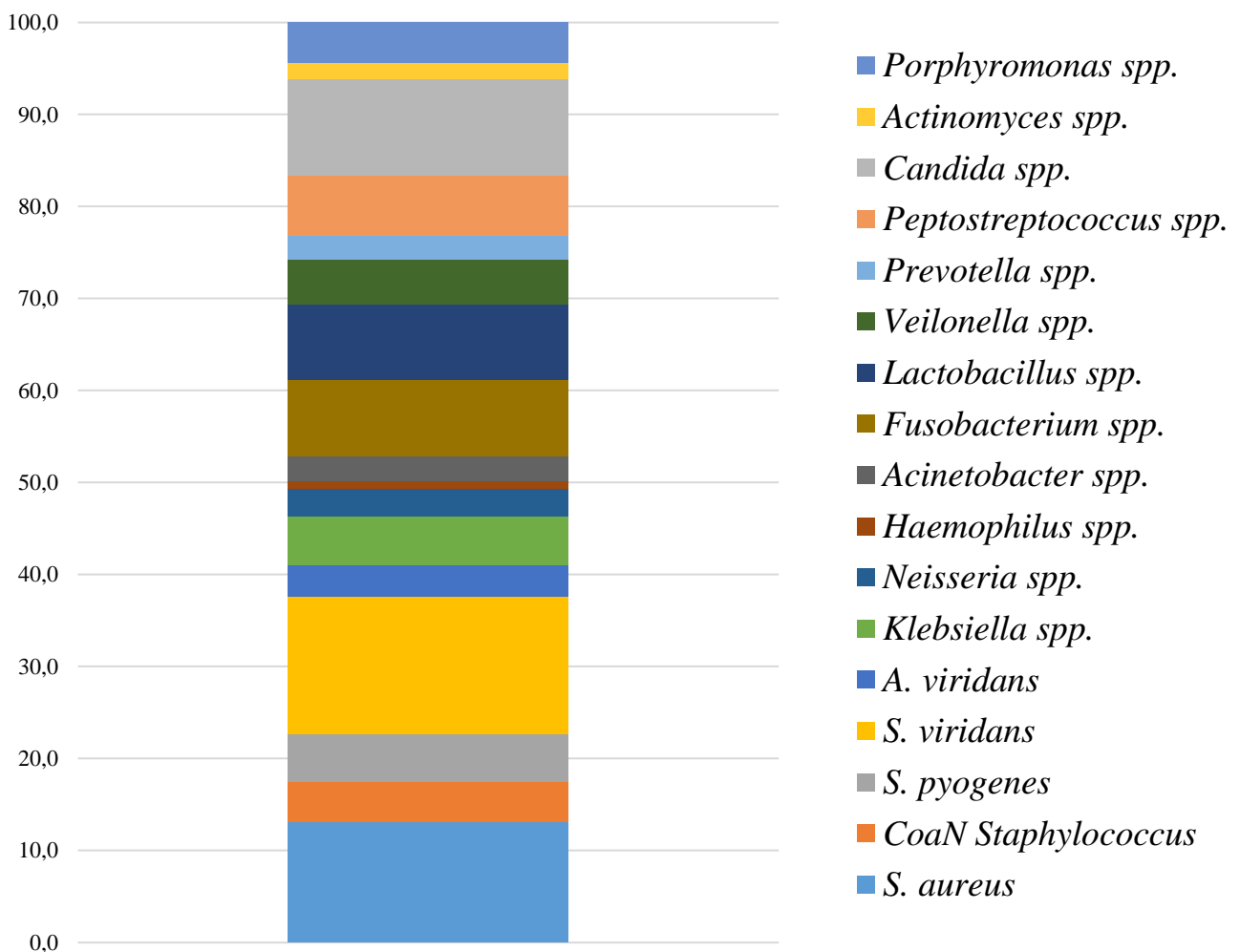


Рис. 3.1 Таксономічний склад ділянки стояння імплантату (частка, %; n = 229)

Найчастіше комбінації включали присутність роду *Streptococcus* або *Lactobacillus* в асоціації зі *Staphylococcus spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Fusobacterium spp.* та родами *Neisseria* і *Haemophilus*.

Тож, мікробіом периімлантної ділянки у пацієнтів з дентальною імплантацією був різноманітним і включав, як коменсальні, так і опортуністичні мікроорганізми.

При оцінці впливу мікробного складу біоплівки на розвиток ускладнень дентальної імплантації встановлено, що колонізація такими мікроорганізмами, як *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. viridans*, *K. pneumoniae*, *Haemophilus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, порядок *Actinomycetales* та гриби роду *Candida*, була пов'язана з інфекційно-запальними процесами з відторгненням протезу ( $\chi^2 = 87,85$ ;  $df = 16$ ;  $p < 0,01$ ). При чому були відмінності в мікробному складі біоплівки при ранньому та пізньому відторгненні.

Аналізуючи внесок кожного таксону в розвиток запального процесу тканин імплантату, встановлено, що мікробними маркерами раннього відторгнення були *Haemophilus spp.* (100%), *S. pyogenes* (75,0%), порядок *Actinomycetales* (66,7%), *S. aureus* (64,3%) та *S. viridans* (58,1%), а пізнього – *K. pneumoniae* (100%), *Acinetobacter spp.* (100%), *Fusobacterium spp.* (72,2%) та *Porphyromonas spp.* (100%). Рівень статистичної значущості для ранньої та пізньої груп відповідно:  $\chi^2 = 9,65$ ;  $df = 4$ ;  $p < 0,05$  і  $\chi^2 = 8,02$ ;  $df = 3$ ;  $p < 0,05$ .

Для групи втрати імплантату характерним було недостатнє різноманіття таксонів, отриманих в зразках зі здорових протезів – *A. viridans* – 87,5% ( $\chi^2 = 19,54$ ;  $p < 0,01$ ), *Lactobacillus spp.* – 58,8% ( $\chi^2 = 9,25$ ;  $p < 0,01$ ) та *Prevotella spp.* – 80,0% ( $\chi^2 = 7,47$ ;  $p < 0,01$ ).

Схематично результати, отримані на даному етапі дослідження, підсумовані та відображені на рис. 3.2.



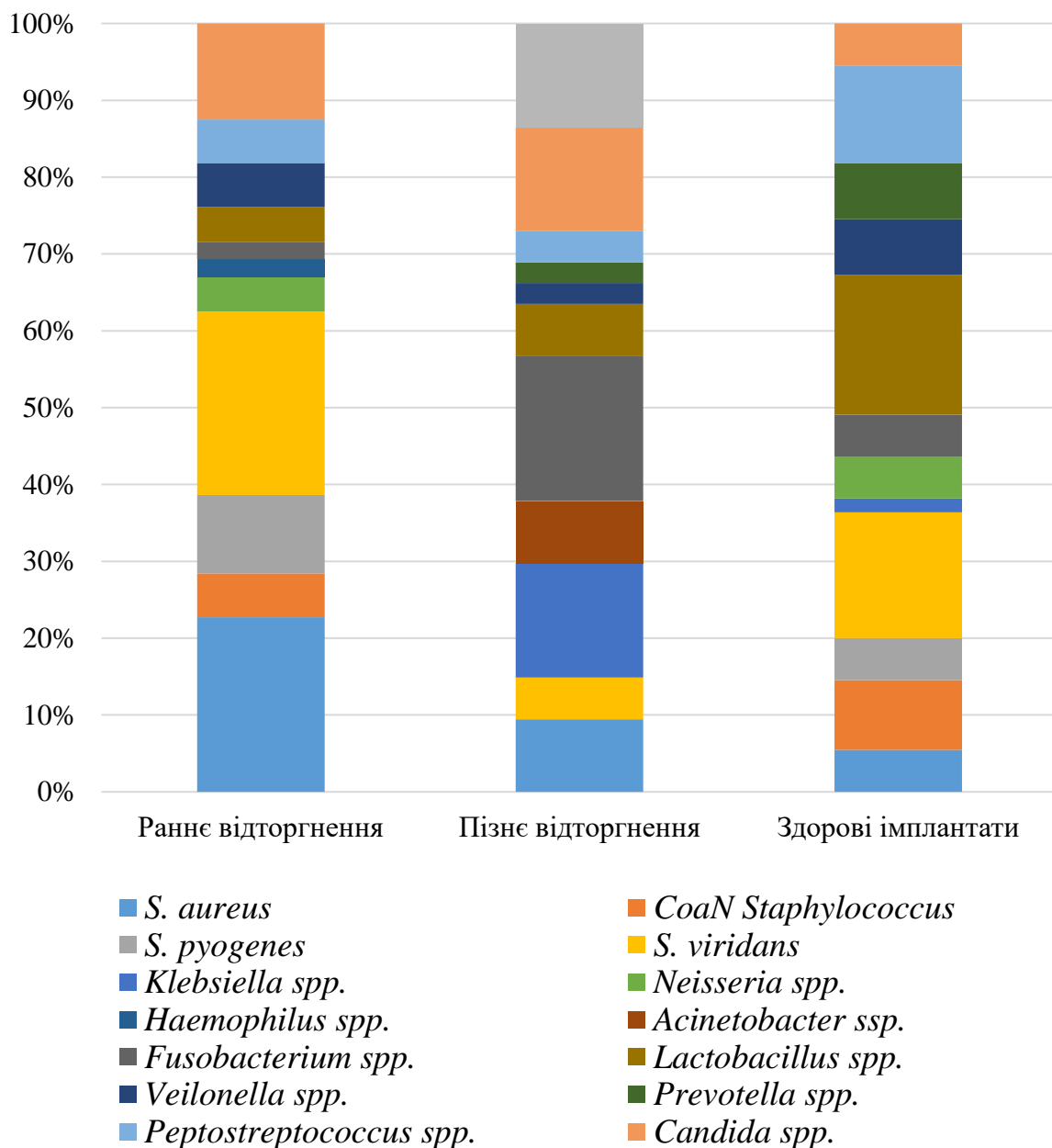


Рис. 3.2 Мікробний профіль ускладнень дентальної імплантації (частка, %; n = 229). Вплив мікробного фактору на наслідки імплантації –  $\chi^2 = 87,85$ ; df = 16; p < 0,01.

При оцінці впливу потенційних модифікуючих факторів на видове різноманіття біоплівки зуба встановлено, що пародонтит ( $\chi^2 = 8,22$ ; df = 3; p < 0,05), куріння ( $\chi^2 = 11,21$ ; df = 3; p < 0,05) мали суттєвий вплив на  $\beta$ -

різноманіття біоплівки. Проте аналогічних змін не встановлено для регулярного полоскання рота ( $\chi^2 = 2,69$ ;  $df = 3$ ;  $p > 0,05$ ).

### 3.3 Узагальнення результатів дослідження

Біоплівка пошкоджених зубних імплантатів є неоднорідною. Основними інфектами були *Staphylococcus spp.*, *Porphyromonas spp.* та *Fusobacterium spp.* Видовий склад мікробіоти періімплантної ділянки з гнійно-запальним потенціалом відрізнявся більшою питомою вагою родів *Fusobacterium* і *Porphyromonas*, особливо при пізній втраті імплантату. Рання втрата дентального протезу була пов'язана з виділенням *S. viridans* та *S. pyogenes*. Біоплівка періімплантної ділянки здорових імплантатів мала більшу різноманітність та включала роди *Aerococcus*, *Peptostreptococcus* та *Prevotella*.

Дані, отримані в нашому дослідженні співставимі з опублікованими раніше. Результати молекулярних досліджень в даній області також описують значну роль мікроорганізмів *F. nucleatum* і *P. gingivalis* в патогенезі гнійно-запальних ускладнень дентальної імплантації. Аналогічно до наших результатів, пізню втрату імплантатів, зазвичай, пов'язують з надмірним навантаженням грам-негативними патогенами, зокрема *Treponema*, *Fretibacterium*, *Pseudoramibacter* і *Desulfobulbus* [10].

Факторами ризику ускладнень дентальної імплантації є безпосередньо травматизм процедури, наявність фонової патології, вживання певного ряду лікарських засобів. Тим не менш, в сучасних уявленнях про патогенез процесів відторгнення імплантатів, особливе місце відводиться конститутивним факторам, зокрема – особливість кісток, пародонтит, куріння, бруксизм – механічні перевантаження можуть впливати на остеоінтеграцію та тривалість стояння зубних імплантатів [6, 7, 7]. В нашому дослідженні також показано зв'язок між курінням та пародонтитом з реакцією відторгнення імплантату незалежно від тривалості стояння імплантату. Окрім того, ми також показали вплив конститутивних факторів (куріння, пародонтит) на  $\beta$ -різноманіття дослідної біологічної ніші.

## РОЗДІЛ 4

### БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ, ПОВ'ЯЗАНИХ З УСКЛАДНЕННЯМИ ДЕНТАЛЬНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ

Індивідуальні властивості мікроорганізмів є тим фактором, який визначає перспективу ефективності лікування при запальних процесах ротової порожнини [128]. Поява змінених фенотипів, здавалося б, добре відомих збудників пов'язана, з одного боку, зі складнощами індикації та ідентифікації в лабораторних умовах, а з іншого, – пов'язана з уникненням дії протимікробних агентів, ефекторів імунної системи та механічного кліренсу, і, врешті-решт, призводить до терапевтичних невдач.

#### 4.1 Біологічні особливості ізолятів роду *Staphylococcus*

Серед усіх зразків, позитивних на *S. aureus*, були такі, що містили виключно ізоляти з диким фенотипом ( $n = 22$ ) та проби з ростом МКФ ( $n = 8$ ). Ізоляти *S. aureus* дикого фенотипу мали типові культуральні, морфологічні та біохімічні характеристики. Завдяки ліпохромному пігменту на жовточно-сольовому агарі з яєчною емульсією культури *S. aureus* утворювали мутні, круглі, рівні колонії кремового, жовтого або оранжевого кольору. На поживному середовищі, яке містить кров, мікроорганізм зумовлював появу зони  $\alpha$ - та  $\beta$ -гемолізу.

Культури з фенотипом МКФ мали ауксотрофію тільки до менадіону ( $n = 4$ ) та до тимідину і менадіону ( $n = 4$ ). Колонії з морфологією МКФ наведені на рис. 4.1. Відновлення культури *S. aureus* з фенотипом МКФ викликало складнощі, адже через свої біологічні властивості їх ріст міг бути пригнічений дикими ізолятами або іншою коменсальною мікробіотою. Ауксотрофні

культури в 100% випадків виділяли зі зразків від пацієнтів з пізнім відторгненням імплантату –  $F = 12,30$ ;  $p < 0,05$ .



Рис. 4.1 Культура *S. aureus* дикого фенотипу (жовті колонії оточені зоною  $\beta$ -гемолізу) та МКФ (дрібні колонії) та *S. epidermidis*; 72 год; кров'яний агар.

МКФ *S. aureus* можна було відновити зі зразка з використанням збагаченого поживного середовища (кров'яний агар, шоколадний агар). Такі результати вказують на селекційний вплив ряду факторів на появу дефектного фенотипу. Зазвичай, поява МКФ *S. aureus* асоційована з експозицією до хінолонів та сидерофорів НФГНМО, що зумовлює появу ауксотрофії до менадіону та геміну [58, 60].

МКФ з'являлися на чашках Петрі через 48-72 год від початку інкубації в аеробних або мікроаерофільних умовах та мали вигляд дрібних (діаметр  $< 1$  мм), непігментованих, негемолітичних колоній, іноді по типу «смаженої яєчні» (рис. 4.3 та рис. 4.4). За морфологією колоній МКФ *S. aureus* іноді можна було сплутати з негемолітичними стрептококами.

Реверсія МКФ *S. aureus* в дикий фенотип відбувалася після пересіву та культивування в анаеробних умовах та/або при кімнатній температурі (час-залежна стабільність).

При мікроскопічному дослідженні МКФ *S. aureus* мали типове для грам-позитивних мікроорганізмів забарвлення. Біохімічна активність: каталазний тест позитивний, оксидазний тест негативний, відтермінування до 48-72 год позитивного тесту на коагулазу, тести на ферментацію глюкози та фруктози – позитивні, маніту – негативний.

Визначення чутливості ізолятів *S. aureus* до протимікробних засобів проведено в 100% випадків. Усі ізоляти фенотипово досліджено на стійкість до метициліну. Тест з диском цефоксітину 30 мкг використали для прогнозування експресії генів *mecA* або *mecC* [109, 111]. Тож з 32 ізолятів роду *Staphylococcus* резистентними до цефоксітину, тобто метицилін-резистентними (MRSA/MRSE) за фенотипом, були 11 культур, середній діаметр зони затримки росту – 15,2 (1,2) мм. Резистентність до метициліну виникає внаслідок продукції зміненого пеніцилін-зв'язувального білка, відомого як РВР2а зі зниженою спорідненістю до більшості β-лактамних антибіотиків [129]. Такі ізоляти показували резистентність й до еритроміцину (8/11), кліндаміцину (5/11), норфлуксацину (7/11), триметоприм-сульфаметоксазолу (5/11), гентаміцину (2/11).

Результати визначення хіміотерапевтичної чутливості ізолятів роду *Staphylococcus* узагальнені на рис. 4.2 та 4.3. Найкращі результати зареєстровано для аміноглікозидів III покоління, фторхінолонів III покоління, лінезоліду, ріфампіцину та тетрациклінів.

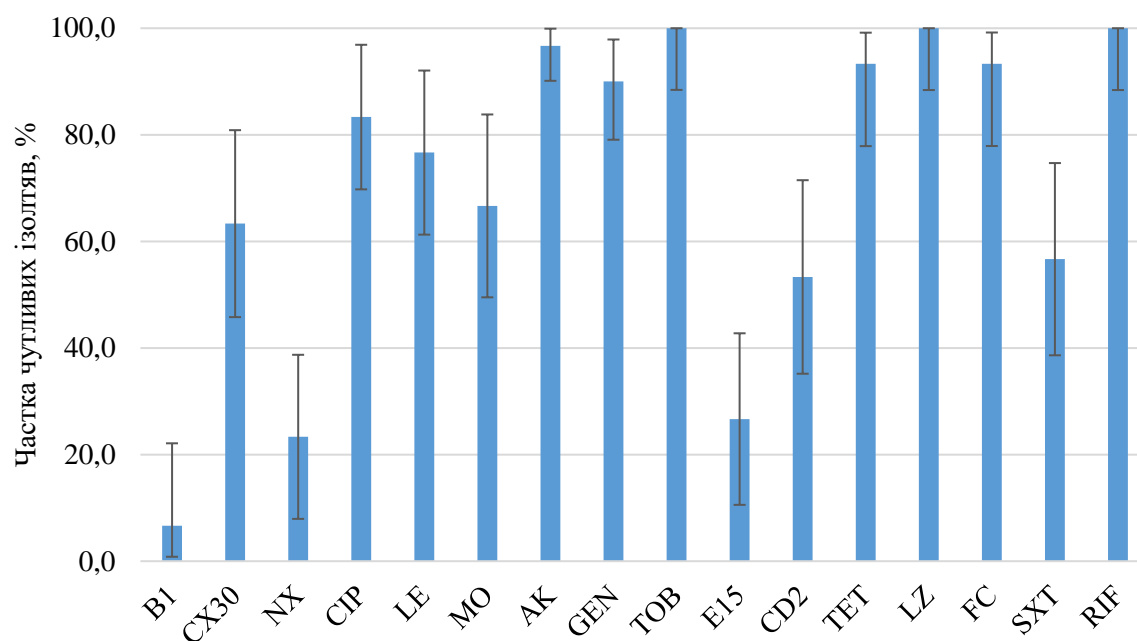


Рис. 4.2 Частка чутливих ізолятів роду *Staphylococcus* при визначенні хіміотерапевтичної чутливості диск-дифузійним методом (n = 32; p (SE), %)

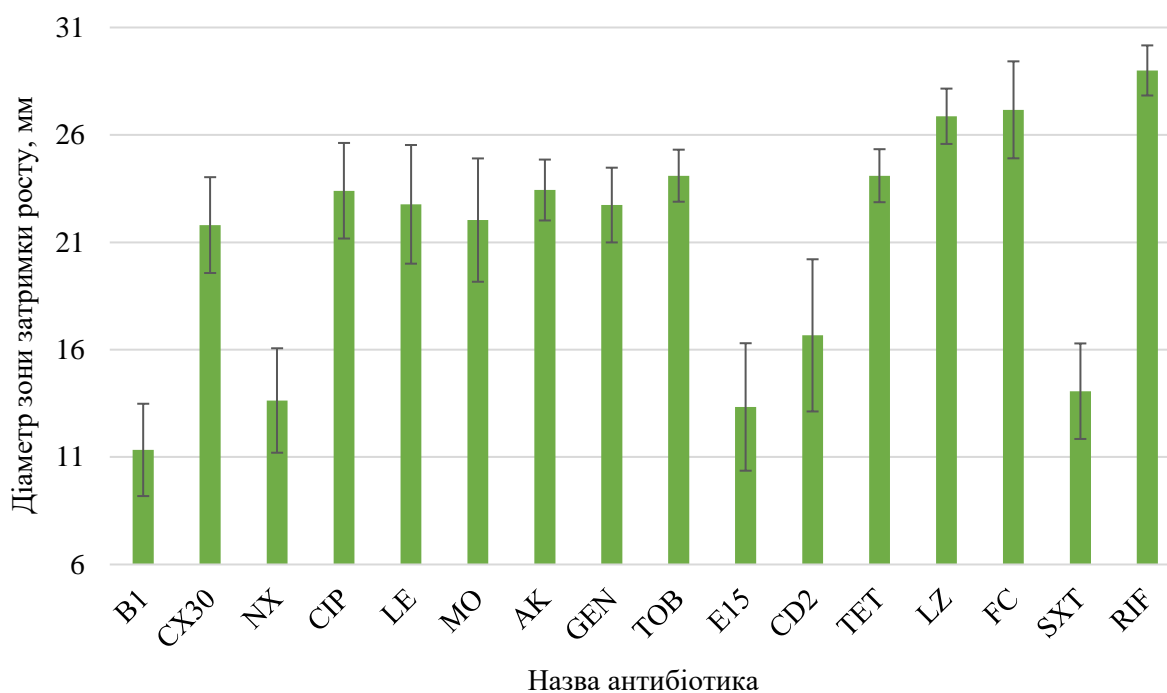


Рис. 4.3 Значення діаметру зони затримки росту ізолятів роду *Staphylococcus* при дослідженні чутливості до антибіотиків диск-дифузійним методом (n = 32; Me (95%ДІ))

Тож, в нашому дослідженні чутливими до усіх  $\beta$ -лактамів (в тому числі незахищених пеніцилінів) були лише 6,3 (4,3)% ізолятів *S. aureus*. Водночас, варто пам'ятати, що і в такому разі очікувана ефективність пероральних препаратів *in vivo* залишається сумнівною. Ті ізоляти роду *Staphylococcus*, що показали резистентність до бензилпеніциліну, що, як відомо, є наслідком здатності до продукції пеніцилінази, були також стійкими до феноскиметилпеніциліну, ампіциліну, амоксициліну, піперациліну та тікарциліну.

Чутливість до цефоксітину показали 65,6 (8,4)% ізолятів. Такі культури були сприйнятливими до пеніцилінів в комбінації з інгібіторами бета-лактамази (ампіцилін-сульбактам, амоксицилін-клавуланова кислота, піперацилін-тазобактам, тікарцилін-клавуланова кислота), ізоксазоліл-пеніцилінів (оксацилін, клоксацилін, диклоксацилін та флуклоксацилін) та нафциліну, більшості цефалоспоринів (цефаклор, цефадроксил, цефалексін, цефазолін, цефепім, цефотаксім, цефоксітін, цефподоксім, цефтріаксон, цефподоксім) та карбапенемів (ертапенем, іміпенем, меропенем, меропенем-ваборбактам).

Чутливість до скринінгу з еритроміцином становила 28,1 (7,9)%, такі ізоляти були сприйнятливими безпосередньо до еритроміцину, азитроміцину, кларитроміцину та рокситроміцину. Резистентні ізоляти виявилися в 53,1 (8,8)% випадків чутливими до кліндаміцину, появу D-феномену реєстрували у 15 ізолятів.

Чутливість *Staphylococcus* до скринінгу з норфлоксацином становила 25,0 (7,7)%; резистентні ізоляти протестовані на сприйнятливість до ципрофлоксацину – 84,4 (6,4)%, левофлоксацину – 75,0 (7,7)% та моксіфлоксацину – 81,3 (6,9)%.

Чутливість до скринінгу з тетрацикліном становила 93,8 (4,3) %, такі ізоляти були сприйнятливими безпосередньо до тетрацикліну, а також до доксицикліну та міноцикліну. Медіана зона затримки росту становила 22 (95%ДІ 20,8-23,2) мм. Ізоляти резистентні до тетрацикліну виявилися

чутливими до міноцикліну. Відомо, що штами резистентні до тайгецикліну зустрічаються вкрай зрідка, і в нашому дослідженні таких ізолятів не було.

Вивчення чутливості до ванкоміцину проводили з визначенням МІК – серед протестованих ізолятів резистентних не було, тобто  $МІК \leq 2$  мг/л.

Розуміємо, що стандартні методи визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків *in vitro* були розроблені і схвалені для тестування швидкозростаючих бактерій, а статистична обробка даних потребує достатньої вибірки, то, оскільки МКФ мають змінені властивості, а вибірка складає лише 8 ізолятів, отримані результати слід інтерпретувати з обережністю [111, 113].

При порівнянні хіміотерапевтичної чутливості *Staphylococcus* з диким фенотипом та ауксотрофною модифікацією отримано подібні результати, проте спостерігалася тенденція до наростання резистентності до аміноглікозидів. Методом мікросерійних розведень встановлено, що МІК гентаміцину для ауксотрофних культур становила в середньому 1,5 мкг/мл, а для звичайних – 0,5 мкг/мл. Різниця медіан МІК гентаміцину диких ізолятів та МКФ становила 1 мкг/мл (95%ДІ 0,64-1,36) ( $t = 5,7$ ;  $p < 0,001$ ). При порівнянні значень МІК та частоти виділення чутливих ізолятів відносно решти антибіотиків статистично значущих результатів не отримано ( $p > 0,05$ ), що, можливо, зумовлено малим об'ємом вибірки з ауксотрофним фенотипом.

#### **4.2 Біологічні особливості каталаза-негативних грам-позитивних коків**

Також значну частку в нашому дослідженні складала каталаза-негативні грам-позитивні коки, зокрема *Streptococcus spp.* та *Aerococcus spp.*

Видову диференціацію каталаза-негативних грам-позитивних коків проводили за мікроскопічною картиною, зовнішнім виглядом колоній та типом гемолізу, біохімічною активністю відносно ряду цукрів. Для ізолятів роду *Streptococcus* характерним був ріст на кров'яному агарі з продукцією  $\gamma$ - та  $\beta$ -гемолізу для групи *viridans* та *S. pyogenes* відповідно. Приналежність до



*S. pyogenes* також підтверджували з використанням диску з бацитрацином, відмічали зон затримку росту.

Медико-екологічне значення представників роду *Aerococcus* залишається відкритим питанням. З одного боку накопичена база знань свідчить про, безумовно, сприятливий потенціал *A. viridans* [115, 131, 132], проте з іншого в останні роки з'являються свідчення про випадки інфекцій сечовивідних шляхів, сепсису, ендокардиту та ураження шкіри, викликані даним мікроорганізмом [133-137].

На кров'яному агарі при рості *Aerococcus spp.* відмічали ріст дрібних безбарвних колоній з  $\alpha$ -гемолітичною активністю. Проте чутливість даного середовища становила лише 4/8 ізолятів через ріст інших патогенів та коменсалів. На селективному агарі з бензидином, отримали хороші ростові показники, колонії, ідентифіковані в подальшому, як *A. viridans* мали інтенсивне забарвлення.

Точність біохімічної ідентифікації *A. viridans* становила 74-99%. Були враховані наступні показники: каталаза – негативна, проба на гідроліз пірролідоніл- $\beta$ -нафтіламідю – позитивна, ріст в присутності 6,5 % NaCl та чутливість до ванкоміцину.

Результати вивчення хіміотерапевтичної чутливості ізолятів роду *Streptococcus* наведені на рис. 4.4 та рис. 4.5.

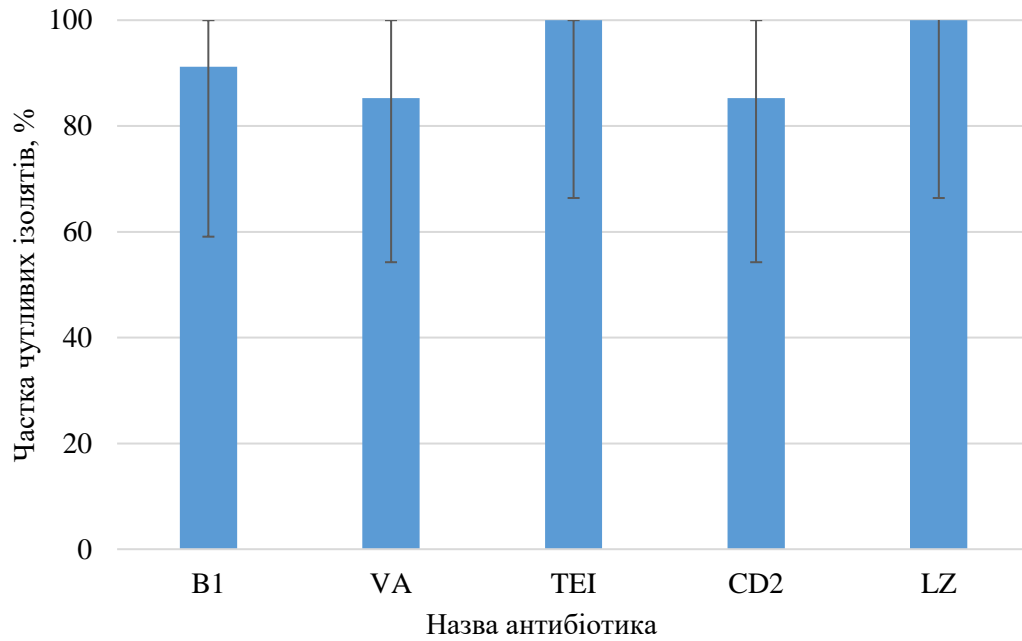


Рис. 4.4 Результати вивчення чутливості до основних антибіотиків ізолятів роду *Streptococcus* при визначенні хіміотерапевтичної чутливості диск-дифузійним методом (n = 33; p (SE), %)

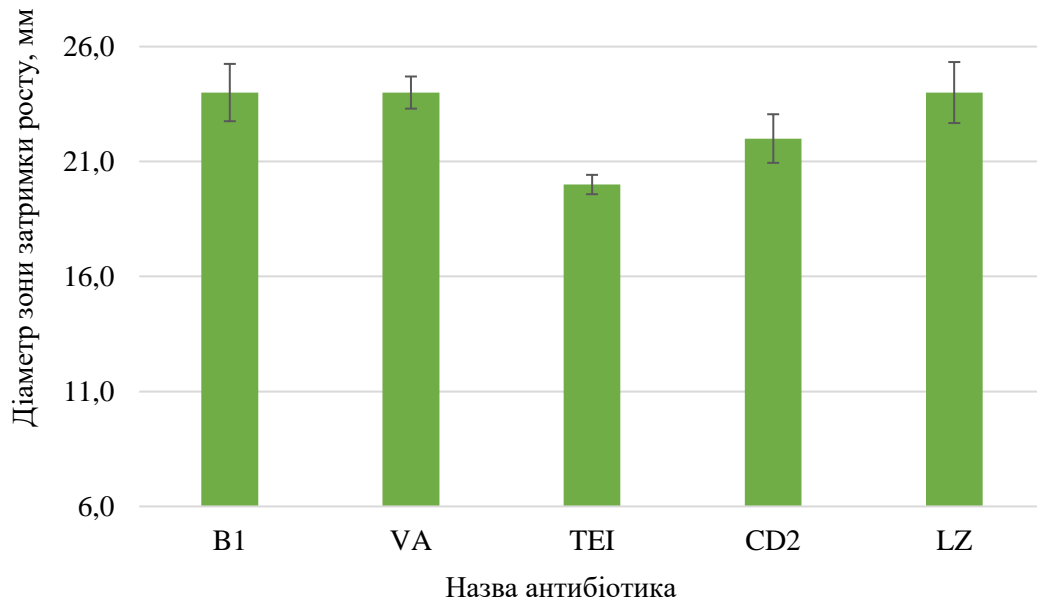


Рис. 4.5 Значення діаметру зони затримки росту ізолятів роду *Streptococcus* при дослідженні чутливості до антибіотиків диск-дифузійним методом (n = 33; Me (95%ДІ))

Для *Streptococcus* діаметр зони затримки росту навколо бензилпеніциліну 1 ОД складав 24,0 (1,25) мм, що було свідченням чутливості отриманих ізолятів до пеніцилінів, цефалоспоринів, карбапенемів та монобактамів. Загальна чутливість до бензилпеніциліну становила 91,2 (4,9)%. Стійкі ізоляти були протестовані на чутливість до цефепіму, цефотаксіму, цефтріаксону та цефуроксіму і показали позитивний результат.

Усі отримані культури були сприйнятливими до тейкопланіну та ванкоміцину, зона затримки росту складала 20 (95% ДІ 19,2 – 20,8) мм і 24 (23,2 – 24,8) мм відповідно.

Появу D-феномену, як феномену індукцйбельної резистентності до кліндаміцину в присутності макролідів, зареєстрували у 5 ізолятів – чутливість становила 88,2 (4,9) %.

Зона затримки росту навколо диску з норфлуксацином 10 мкг для *S. pyogenes* складала 26 (95% ДІ 25,3 – 26,7) мм, чутливими були 100% ізолятів. Позитивний скринінг вказував також на сприйнятливість до левофлуксацину та моксіфлуксацину. Ізоляти, сприйнятливі до скринінгу з еритроміцином – 100%, також були повідомлені, як чутливі до азитроміцину, кларитроміцину, роксітроміцину. Ізоляти, сприйнятливі до скринінгу з тетрацикліном – 100%, також були повідомлені, як чутливі до доксіцикліну та міноцикліну. Окрім того, культури *S. pyogenes* в дослідженні мали абсолютну сприйнятливість до рифампіцину, діаметр зони затримки росту складав 26,0 (95%ДІ 23,3 – 28,7) мм.

В нашому дослідженні при визначенні хіміотерапевтичної чутливості культури *A. viridans* спиралися на кінцеві точки для *Aerococcus sanguinicola* та *Aerococcus urinae* [148]. Усі ізоляти були чутливими до меропенему, скринінгу з норфлуксацином, ванкоміцину та рифампіцину. Чутливими до бензилпеніциліну та амоксициліну були 75 (10,2)% ізолятів, до ампіциліну – 88 (9,6)% ізолятів.

### 4.3 Біологічні особливості невибагливих грам-негативних паличок

Серед грам-негативних ізолятів, отриманих від пацієнтів з ускладненнями дентальної імплантації, не було культур Enterobacterales та НФГНМО з атиповими властивостями. Для *K. pneumoniae* характерною була поява типових слизистих лактозо-негативних колоній на агарі Ендо після 24 год інкубації. Появу гіпермукоїдного фенотипу не реєстрували.

На рис. 4.6 і 4.7 представлені типові культури *K. pneumoniae* та *A. baumannii*, отримані в дослідженні та асоційовані з ускладненнями дентальної імплантації.



Рис. 4.6 *K. pneumoniae*, колумбійський агар з 5% кров'ю, 24 год



Рис. 4.7 *A. baumannii*, колумбійський агар з 5% кров'ю, 24 год

Представники Enterobacterales мали хіміотерапевтичну чутливість, яка значно коливалася в залежності від групи протимікробних засобів. Сприйнятливими до ампіциліну та амоксициліну виявилися лише 20 (13,3)% ізолятів, проте чутливість до ампіцилін/ сульбактаму, піперациліну, піперацилін/ тазобактаму, тікарциліну та тікарциліну/ клавуланової кислоти коливалася в межах 50,0 – 80,0%. Чутливість до цефалоспоринів була варіабельною – найкращі результати отримані для цефідероколу та цефтолозан/ тазобактаму (100%), а також цефтазідиму, цефтазідім/ авібактаму та цефепіму – 70 (15,3) %, 90 (10,0) % і 70 (15,3)% відповідно. Діаметр зони затримки росту «нових» цефалоспоринів становив 23 (95%ДІ 22,8 – 23,0) мм для цефідероколу і 25 (95%ДІ 24,5 – 25,5) мм для цефтолозан-тазобактаму.

Чутливість до карбапенемів (доріпінем, іміпенем, іміпенем-релебактам, меропенем, меропенем-ваборбактам) коливалася в межах 40% – 100%, з мінімальними показниками для ертапенему і максимальними для іміпенему-релебактаму. Діаметр зон затримки росту для меропенему та іміпенему становив 25 (95%ДІ 21,9 – 28,1) мм і 25 (95% ДІ 22,8 – 27,2) мм відповідно (t – критерій,  $p > 0,05$ ).

Чутливість до фторхінолонів визначали з використанням скринінгу з диском норфлоксацину. Тож, за результатами скринінгу, чутливість до фторхінолонів (ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксіфлоксацин, офлоксацин) становила 20 (13,3)%. Діаметр зони затримки росту норфлоксацину становив 12 (95%ДІ 6,3 – 17,7) мм. Стійкі до норфлоксацину ізоляти були протестовані індивідуально – показники сприйнятливості коливалися в межах 40 – 60%.

Чутливість *Klebsiella spp.* до аміноглікозидів була високою. Сприйнятливими до гентаміцину були 90,0 (10,0)% культур, до амікацину та тобраміцину – 100%. Результати вивчення хіміотерапевтичної чутливості ізолятів роду *Klebsiella* узагальнено та зображено на рис. 4.8 та 4.9

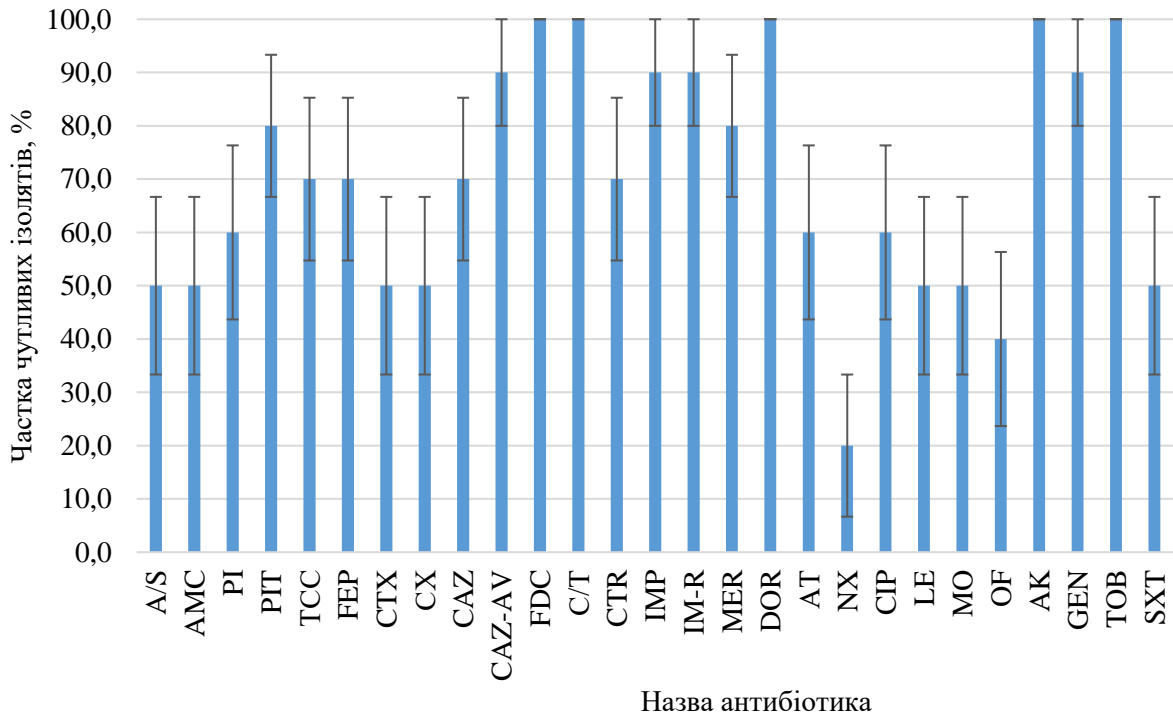


Рис. 4.8 Результати вивчення чутливості до основних антибіотиків ізолятів роду *Klebsiella* при визначенні хіміотерапевтичної чутливості диск-дифузійним методом (n = 12; p (SE), %)

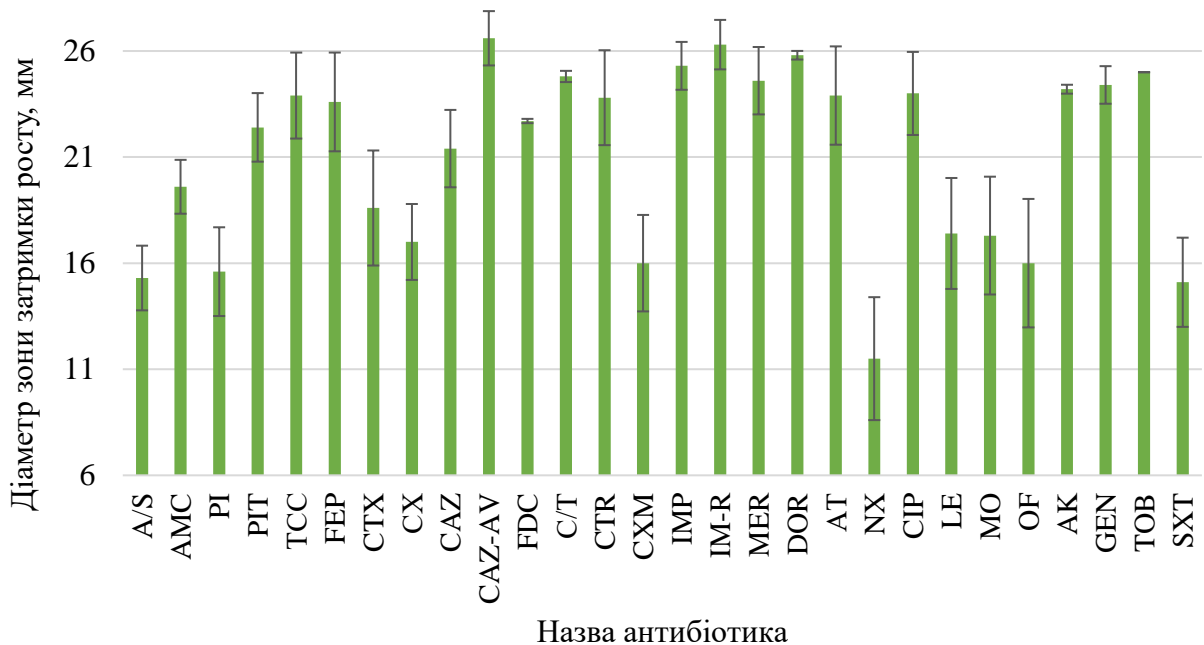


Рис. 4.9 Значення діаметру зони затримки росту ізолятів роду *Klebsiella* при дослідженні чутливості до антибіотиків диск-дифузійним методом (n = 12; Me (95%ДІ))

Серед протестованих ізолятів роду *Klebsiella*, 6 культур мали профіль розширеної лікарської стійкості (рис. 4.10). Продукцію карбапенемаз у *Klebsiella* визначали з використанням диску з меропенемом та на хромогенному середовищі.

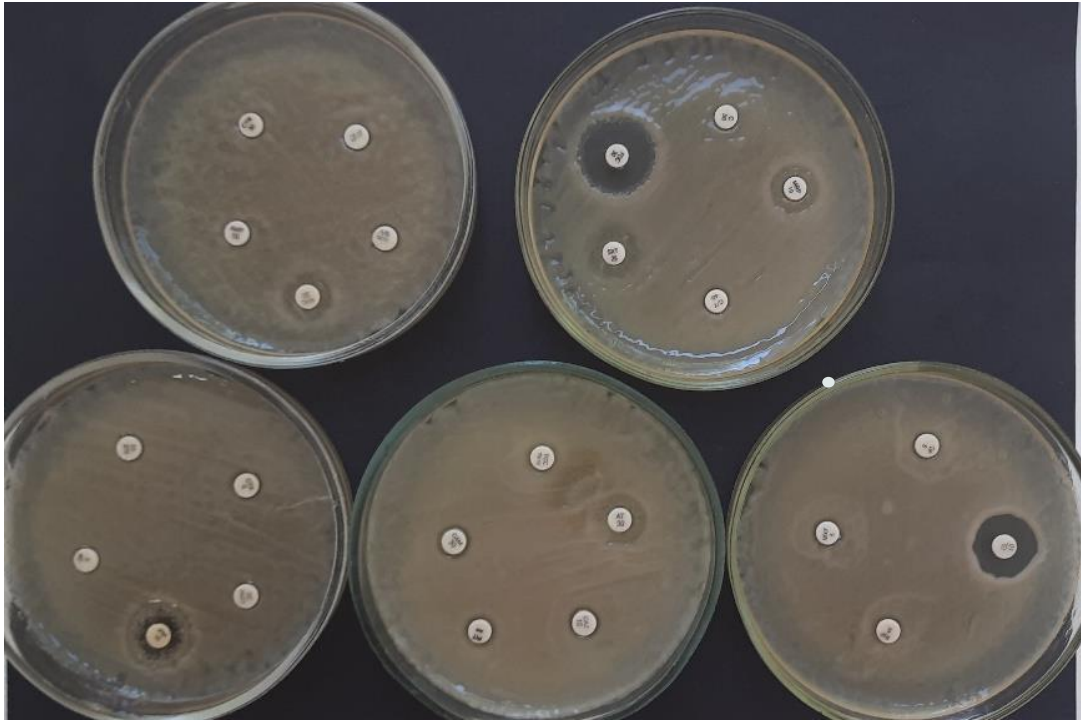


Рис. 4.10 *K. pneumoniae* з профілем розширеної лікарської стійкості

З використанням дисків з АФБК, ДПК та ЕДТА встановлено, що отримані резистентні культури були продуцентами карбапенемаз класу А ( $n = 3$ ) та метало- $\beta$ -лактамаз ( $n = 3$ ).

Всі культури роду *Acinetobacter* були чутливими до іміпенему – релебактаму та тобраміцину. Чутливість до гентаміцину та амікацину була на середньому рівні – близько 66,7 (21,1)%. Продуцентами карбапенемаз (за даними тестування на чутливість до меропенему та іміпенему) були щонайменше 67,7% досліджуваних культур. За результатами тестування на фенотип резистентності встановлено, що 5/6 ізолятів роду *Acinetobacter* були продуцентами метало- $\beta$ -лактамаз.

#### 4.4 Біологічні особливості строгих анаеробів

Як показано нами вище, строгі анаероби відіграють значну роль в розвитку ускладнень дентальної імплантації. В нашому дослідженні їх сумарна частка становила 26,6% (n = 61). Серед культур строгих анаеробів, отриманих в дослідженні, ідентифікували роди *Fusobacterium*, *Veilonella*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*.

Мікроорганізми роду *Prevotella* мікроскопічно мали вигляд грам-негативних аспорогенних паличок. На кров'яному агарі відмічали продукцію пігментованих колоній (від світло-коричневого до чорного). Типові колонії зображені на рис. 4.11.

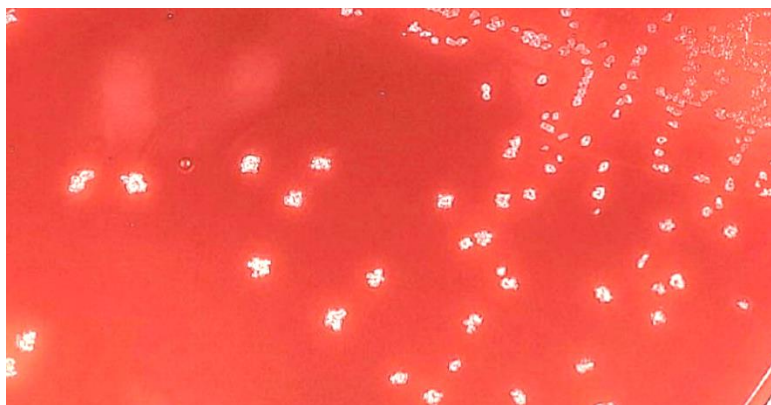


Рис. 4.11 Колонії *Prevotella spp.* на кров'яному агарі з додаванням канаміцину та ванкоміцину, 72 год

Мікроорганізми роду *Fusobacterium* мікроскопічно мали вигляд довгих грам-негативних веретеноподіної форми мікроорганізмів з загостреними кінцями, інколи відмічали появу гранул всередині клітин. Спор і капсул не утворювали. На кров'яному агарі колонії дрібні, округлі, випуклі з жовтуватим центром та оточені зоною  $\alpha$  – гемолізу.

Мікроорганізми роду *Veilonella* мікроскопічно мали вигляд дрібних сферичної форми грам-негативних мікроорганізмів, зібраних у пари, дрібні кластери або ланцюжки. Мікроорганізми роду *Veilonella* на кров'яному агарі через 48-72 год після інокуляції утворювали негемолітичні гладкі, білувато-сірі колонії діаметром 1-3 мм непрозорі. Ідентифікація роду враховувала



резистентність до ванкоміцину 5 мкг, чутливість до жовчі 1 мкг, канаміцину 500 мкг, колістину 10 мкг. Ідентифікація *V. denticarosi* проведена з врахуванням відсутності здатності до продукції газу.

Мікроорганізми роду *Peptostreptococcus* мікроскопічно мали морфологію типову для стрептококів – сферичної форми клітини, розташовані в парах або короткими ланцюжками. На кров'яному агарі відмічали появу дрібних, округлих, випуклих незабарвлених колоній без видимої зони гемолізу. Відмічали появу специфічного солодкуватого запаху.

Мікроорганізми роду *Porphyromonas* мікроскопічно мали вигляд коротких грам-негативних паличок або кокобацил. Колонії дрібні, мали сіру до чорної пігментацію. Для ідентифікації також використовували чутливість до ванкоміцину та резистентність до колістину.

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. Сприйнятливність до метронідазолу була абсолютною. Чутливість до β-лактамів становила 78,6 (11,8)% для піперациліну-тазобактаму та 92,9 (5,0) % для меропенему. Чутливими до кліндаміцину були 85,7 (6,7) % отриманих культур. Результати вивчення хіміотерапевтичної чутливості строгих анаеробів наведено на рис. 4.12 та 4.13.

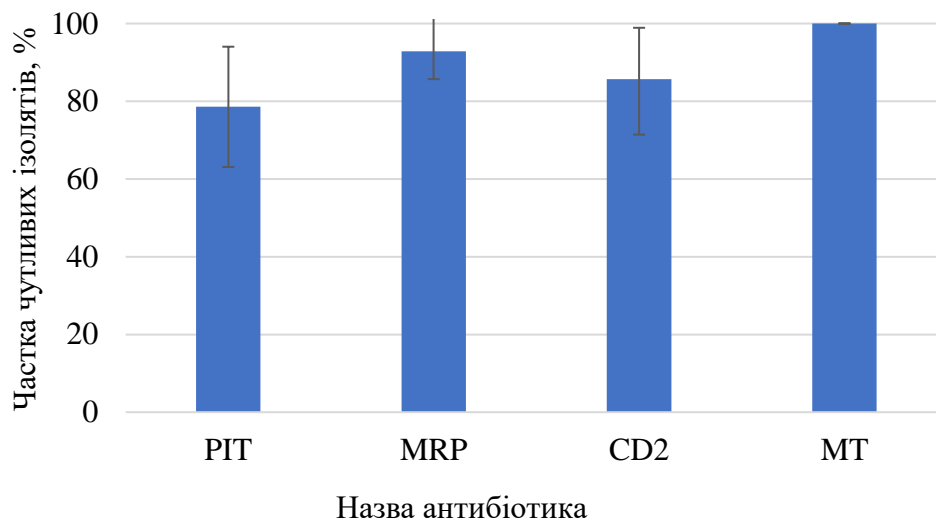


Рис. 4.12 Результати вивчення чутливості до основних антибіотиків ізолятів строгих анаеробів при визначенні хімотерапевтичної чутливості диск-дифузійним методом (n = 40; p (SE), %).

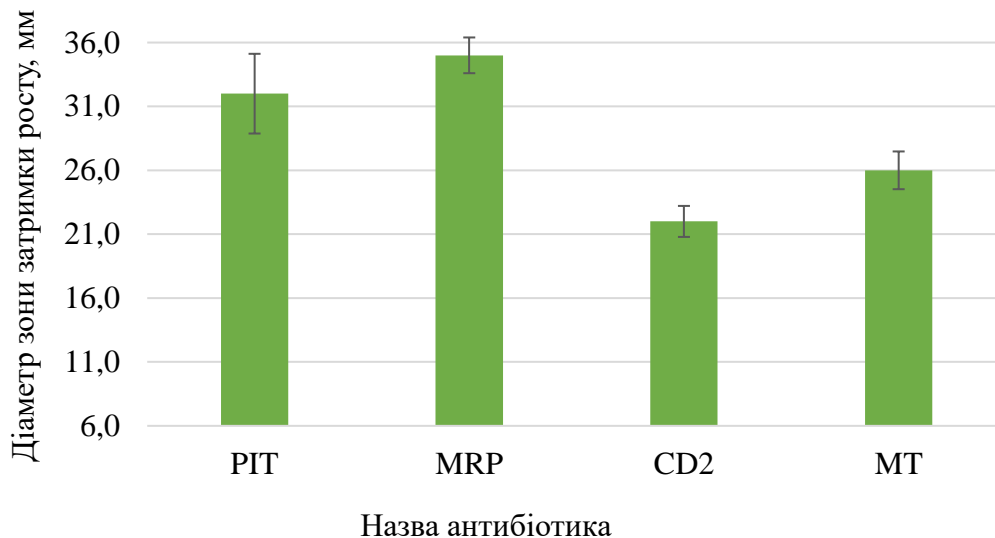


Рис. 4.13 Значення діаметру зони затримки росту ізолятів строгих анаеробів при дослідженні чутливості до антибіотиків диск-дифузійним методом (n = 40; Me (95%ДІ))

Згідно з EUCAST, визначення чутливості до бензилпеніциліну рекомендовано проводити для *Bacteroides spp.* та *Veilonella spp.* В нашому дослідженні, чутливими до бензилпеніциліну були 52,6 (23,1) % ізолятів.

#### **4.5 Здатність до утворення біоплівки мікроорганізмами, асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації**

Оскільки в нашому дослідженні були отримані ізоляти з розширеною лікарською стійкістю, ми вирішили дослідити їх здатність до утворення біоплівки *in vitro*.

Для проведення цього етапу дослідження біологічних властивостей мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації, було відібрано роди *Staphylococcus*, *Klebsiella* та *Acinetobacter*. Вибір ґрунтувався на високій вірогідності набуття даних збудників саме в якості інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги, та високим профілем стійкості до антибіотиків у ряду представників родів, включених в наведений перелік.

##### **4.5.1 Особливості біоплівкоутворення мікроорганізмами роду *Staphylococcus*, асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації**

Дослідження ефективності біоплівкоутворення культур роду *Staphylococcus* (n = 32), отриманих від пацієнтів з ускладненнями дентальної імплантації, показало, що всі клінічні ізоляти були здатні утворювати біоплівки. ІАМ роду *Staphylococcus* становив 5,5 (3,6; 6,5)%. Між адгезивним потенціалом стафілококів та їх біоплівко-утворювальною активністю існувала пряма кореляційна залежність, розрахунковий показник кореляції Спірмена  $r_s = 0,85$  (95%ДІ 0,71-0,93). Зв'язок між ІАМ та оптичною щільністю утворених біоплівок був прямим, високим.

Інтенсивність біоплівкоутворення становила 0,029 (0,026; 0,033) Од. опт. щільності. При цьому 62,5% ізолятів мали помірну щільність утворення біоплівки, 25,0% – слабку, 12,5% – високу. Порівняльний аналіз ефективності утворення біоплівок метицилін-резистентними ізолятами показав відсутність статистично значущих відмінностей від метицилін-чутливих культур (U=112;  $p > 0,05$ ). Проте виявлено більшу схильність фенотипу МКФ росту саме в біоплівковій формі – U=161,5;  $p=0,005$ .

Аналіз швидкості біоплівкоутворення показав, що на першій добі культивування у дослідних лінках процес відбувається уповільнено – за перші 6 та 12 год кількість життєздатних клітин становила 4,5 (0,4) та 5,0 (0,4) lg КУО/мл відповідно (W-критерій,  $p = 0,04$ ). Але на кінець першої доби культивування накопичена кількість КУО збільшилася становила 7,9 (0,2) lg КУО/мл (рис. 4.14).

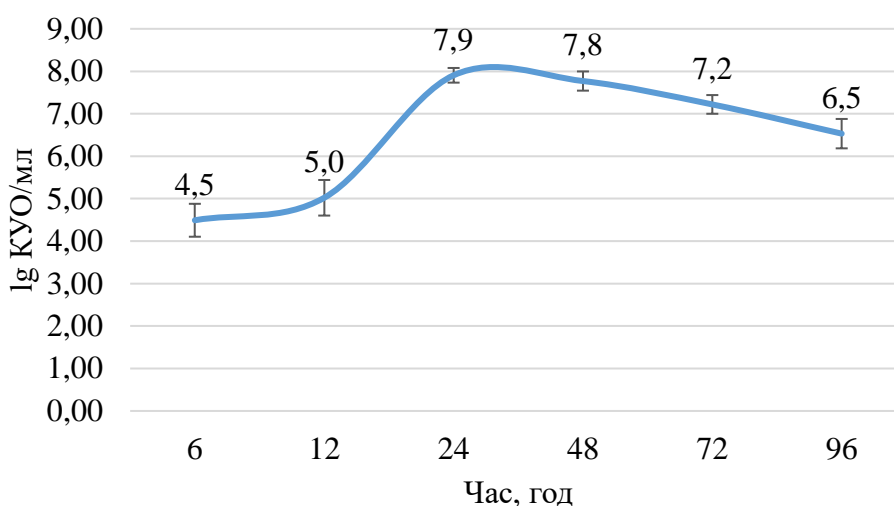


Рис. 4.14 Динаміка утворення біоплівки ізольованими штаммами роду *Staphylococcus* (Me(95%ДІ), lg КУО/мл).

Починаючи з 2-ї доби культивування кількість мікробних клітин на поверхні полістиролового планшету мала тенденцію до зниження – 7,6 (0,2) lg КУО/мл, але різниця ще не була статистично значущою, (W-критерій,  $p = 0,06$ ). Мікробне навантаження в утвореній біоплівці залишалось відносно стабільним починаючи з 2-ї доби культивування (W-критерій,  $p > 0,05$ ). Такий факт можна пояснити тим, що на даному етапі, скоріш за все, подальша організація мікробного консорціуму має якісний характер, а подальший кількісний ріст є обмеженим через виснаження нутрітивних компонентів середовища та накопиченням токсичних продуктів бактеріального метаболізму. Суттєве обмеження мікробного навантаження в порівнянні з кінцем 1-ї доби дослідження, відмічали через 72 год зменшення відбулося на 20%, (W-критерій,  $p = 0,003$ ).

#### 4.5.2 Особливості біоплівкоутворення мікроорганізмами роду *Streptococcus*, асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації

Дослідження ефективності біоплівкоутворення культур роду *Streptococcus*, отриманих від пацієнтів з ускладненнями дентальної імплантації, також показало, що всі клінічні ізоляти були здатні утворювати біоплівки. ІАМ роду *Streptococcus* становив 4,3 (3,0; 5,5)%. Між адгезивним потенціалом стрептококів та їх біоплівко-утворювальною активністю також існувала пряма кореляційна залежність, розрахунковий показник кореляції Спірмена  $r_s = 0,84$  (95%ДІ 0,72-0,93). Зв'язок між ІАМ та оптичною щільністю утворених біоплівок був прямим, високим.

Інтенсивність біоплівкоутворення становила 0,022 (0,020; 0,030) Од. опт. щільності. При цьому 62,5% ізолятів мали помірну щільність утворення біоплівки, 25,0% – слабку, 12,5% – високу.

Вивчення динаміки біоплівкоутворення також показав, що на 1-й добі процес уповільнений – за 6 год накопичено 3,9 (0,4) lg КУО/мл. На кінець 1-ї доби кількість КУО досягла 6,8 (0,6) lg КУО/мл. Диспергування спостерігали після 48 год досліджу – W-критерій,  $p < 0,05$  (рис. 4.15).

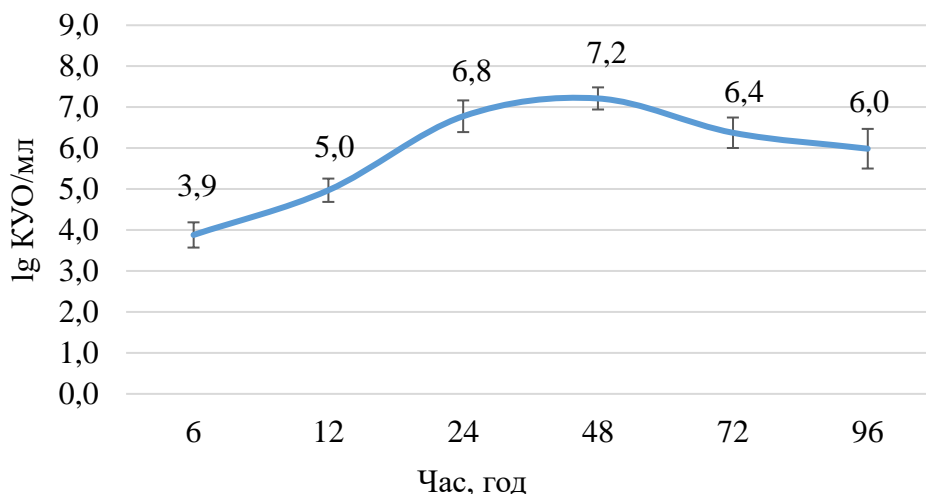


Рис. 4.15 Динаміка утворення біоплівки ізолятами роду *Streptococcus* (Me(95%ДІ), lg КУО/мл).

#### 4.5.2 Особливості біоплівкоутворення мікроорганізмами роду *Klebsiella*, асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації

Дослідження ефективності біоплівкоутворення культур роду *Klebsiella* ( $n = 12$ ), отриманих від пацієнтів з ускладненнями дентальної імплантації, також показало, що всі клінічні ізоляти були здатні утворювати біоплівки.

IAM роду *Klebsiella* становив 6,0 (4,3; 7,2)%. Між адгезивним потенціалом *K. pneumoniae* та біоплівко-утворювальною активністю існувала пряма кореляційна залежність, розрахунковий показник кореляції Спірмена  $r_s = 0,81$  (95% ДІ 0,45-0,95).

При цьому 41,2% ізолятів мали помірну щільність утворення біоплівки, 25,0% – слабку, 33,3% – високу. Інтенсивність біоплівкоутворення становила 0,039 (0,030; 0,058) Од. опт. щільності. Було встановлено, що резистентні ізоляти *K. pneumoniae* мали вищі показники щільності утвореної біоплівки –  $t=7,3$ ;  $p<0,001$ .

Аналіз швидкості біоплівкоутворення показав, що вже на першій добі культивування процес накопичення мікробної маси відбувався стрімко, в перші 6 та 12 год – кількість життєздатних клітин становила 4,6 (0,3) та 6,0 (0,6) Іг КУО/мл відповідно (W-критерій,  $p = 0,10$ ), за цей час було накопичено 66,1% загальної біомаси. До кінця першої доби культивування накопичена кількість КУО продовжувала збільшуватися – через 24 год мікробне навантаження складало 9,0 (0,4) Іг КУО/мл (рис. 4.16).

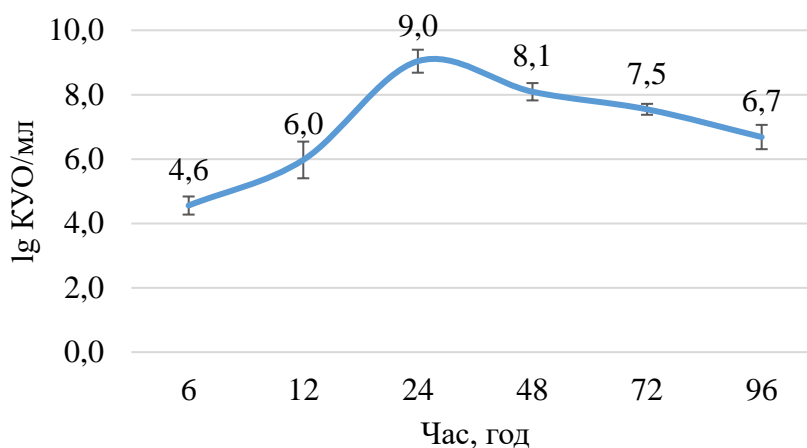


Рис. 4.16 Динаміка утворення біоплівки *K. pneumoniae* (Me(95% ДІ) Ig КУО/мл).

Після 24 год динаміка кількості життєздатних бактеріальних клітин мала тенденцію до зменшення, проте суттєве обмеження кількості КУО відмічали на кінець 96-доби дослідження, коли втрата мікробного навантаження становила 26,1% (W-критерій,  $p = 0,02$ ).

#### 4.5.3 Особливості біоплівкоутворення мікроорганізмами роду *Acinetobacter*, асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації

Дослідження ефективності біоплівкоутворення культур роду *Acinetobacter* ( $n = 6$ ), отриманих від пацієнтів з ускладненнями дентальної імплантації, показало, що всі клінічні ізоляти були здатні утворювати біоплівки.

IAM роду *Acinetobacter* становив 8,2 (7,9;8,1) %. Між адгезивним потенціалом *Acinetobacter* та біоплівко-утворювальною активністю існувала пряма кореляційна залежність, розрахунковий показник кореляції Спірмена  $r_s = 0,98$  (95% ДІ 0,72-0,99). При цьому всі ізоляти *Acinetobacter* високі показники щільності утвореною біоплівки. Інтенсивність біоплівкоутворення становила 0,059 (0,055; 0,065) Од. опт. щільності.

Аналіз швидкості біоплівкоутворення показав, що вже на першій добі культивування процес накопичення мікробної маси також відбувався стрімко, в перші 6 та 12 год – кількість життєздатних клітин становила 4,4 (0,1) та 6,4 (0,7) lg КУО/мл відповідно, за цей час було накопичено 70,3% загальної біомаси. До кінця першої доби культивування накопичена кількість КУО продовжувала збільшуватися – через 24 год мікробне навантаження складало 9,1 (0,4) lg КУО/мл (рис. 4.17).

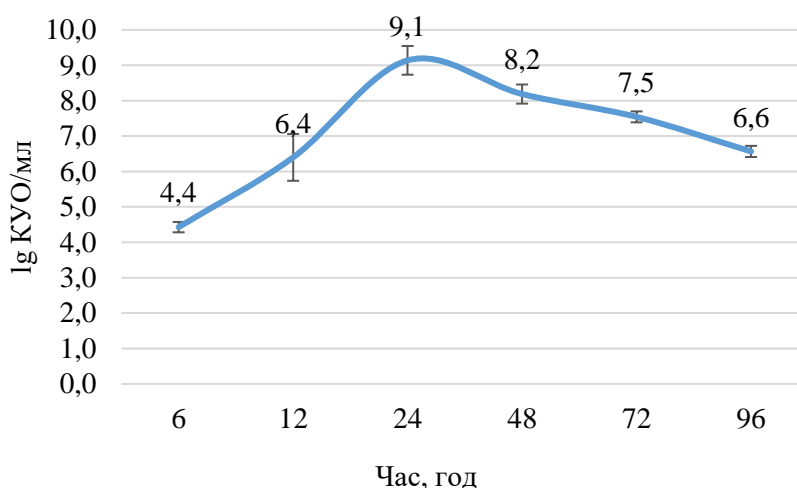


Рис. 4.17 Динаміка утворення біоплівки *Acinetobacter spp.* (M(SD) lg КУО/мл).

Біомаса в складі біоплівки без заміни поживного середовища була здатна до підтримки свого пулу щонайменше до 96 год дослідження, коли втрата життєздатних склала майже третину – 27,0%.

#### 4.6 Узагальнення результатів дослідження

Мікробний фактор відіграє важливу роль в розвитку ускладнень дентальної імплантації. Ауксотрофна модифікація *S. aureus* та значний внесок в розвиток інфекційно-запальних процесів периімплантних тканин строгих анаеробів має важливе практичне. Такі фактори можуть викликати складнощі мікробіологічної діагностики, призводити до помилок ідентифікації, або навіть упущення, через ненавмисне недотримання умов культивування, а отже, мати наслідки для здоров'я та якості життя пацієнта. Кисень є токсичним для строгих анаеробів навіть в мінімальній кількості, а тому дотримання аносії



вже на етапі транспортування біологічного матеріалу є запорукою надійності результатів, отриманих на подальших етапах мікробіологічного дослідження.

В нашому дослідженні частка ауксотрофів *S. aureus* становила близько 27% (8 з 30 культур). Колонії були отримані виключно від пацієнтів з пізнім відторгненням імплантату ( $p < 0,05$ ). Такі результати свідчать на користь в'яло протікаючого інфекційно-запального процесу періімплантних тканин, для якого характерним є існування тихого пулу збудників, невидимих для імунного і механічного кліренсу та антибіотиків, та здатного до постійного підтримання життєздатності мікробної популяції в умовах мікросередовища ротової порожнини.

Й хоча атипових морфологічних та культуральних властивостей не виявлено для інших культур, окрім *S. aureus*, насторожує високий профіль резистентності ізолятів *Klebsiella spp.* та *Acinetobacter spp.* За даними тестування на чутливість до антибіотиків встановлено, що профіль розширеної лікарської стійкості мали 11 ізолятів *Staphylococcus* – MRSA, MRSE; 6 культур *Klebsiella spp.* та 5 ізолятів *Acinetobacter spp.* За даними популяційних досліджень встановлено, що поширеність *K. pneumoniae*-продуцентів карбапенемаз дуже різниться і становить від 0,13% до 20% в залежності від регіону, і є найбільшою в країнах, що розвиваються [138]. Тож, з в нашому дослідженні частка становила близько 50%, що свідчить про високий рівень локальної стійкості інфекту, пов'язаного з наданням стоматологічної медичної допомоги.

В нашому дослідженні також показано, що мікроорганізми, в тому числі з розширеним профілем лікарської стійкості, є продуцентами біоплівки. Така властивість пов'язана з терапевтичними ускладненнями та додатково унеможлиблює ерадикацію інфекційного агенту і призводить розвитку хронічних процесів в ділянці стояння імплантату та, вірогідно, може мати системні наслідки.

### ВПЛИВ N-ХЛОРТАУРИНУ НА ВІРУЛЕНТНІСТЬ ЗБУДНИКІВ, АСОЦІЙОВАНИХ З УСКЛАДНЕННЯМИ ДЕНТАЛЬНОЇ ІМПЛАНТАЦІЇ

ВООЗ визначила пріоритетний перелік патогенів, відносно яких пошук альтернативних стратегій ерадикації є необхідним. До переліку з позначкою «критичний пріоритет» серед інших включено *A. baumannii* та карбапенемази-продукуючі представники порядку Enterobacterales, а також *K. pneumoniae* з резистентністю до цефалоспоринів III покоління. Позначку «високий пріоритет» мають мікроорганізми *S. aureus* через їх здатність розвивати резистентність до метициліну [29].

Як показано в дослідженнях, сполука NCT в різній концентрації має широкий профіль ефективності проти планктонних форм бактерій та грибів [81, 85, 86, 87, 88]. Проте мікроорганізми в організмі людини живуть радше в складі організованих консорціумів, а тому пошук ефективних стратегій впливу на біоплівку є актуальним завданням сучасної медичної науки.

Для даного етапу дисертаційного дослідження ми використали 1% розчин NCT, як такий, що показав ефективність в попередніх роботах. Проте ми також дослідили вплив NCT на планктонні і біоплівкові форми мікроорганізмів з профілем розширеної лікарської стійкості в залежності від їх фенотипу резистентності.

#### **5.1 Вплив NCT на планктонні форми мікроорганізмів, асоційованих з ускладненням дентальної імплантації**

На даному етапі ми вивчали вплив розчину NCT на планктонні культури, вирощені протягом нічної культивуації.

### 5.1.1 Вивчення ефективності NCT методом дифузії в агар

Для дослідження було відібрано шість культур *K. pneumoniae*, 11 ізолятів *S. aureus* та шість роду *Acinetobacter*, які відповідали визначенню щодо розширеної лікарської стійкості. Вплив NCT на виділені ізоляти порівнювали з ефективністю проти культур, які вважали умовно чутливими – шість культур *K. pneumoniae* та 16 ізолятів *S. aureus*.

Всі 45 досліджених культур з розширеним виявилися чутливими до 1% розчину NCT. Діаметр зон затримки росту для всіх досліджених культур становив щонайменше 15 мм.

Різниця діаметрів зон затримки росту для метицилін-резистентних та метицилін-чутливих культур *S. aureus* не була статистично значущою та лежала в межах -0,3 (95%ДІ -1,37 – 0,77) мм,  $p > 0,05$ . Різниця діаметрів зон затримки росту для умовно чутливих та стійких ізолятів *K. pneumoniae* також не була статистично значущою та лежала в межах 0,8 (95%ДІ -0,81 – 2,41) мм,  $p > 0,05$ . Тобто, досліджуваний розчин 1% розчин NCT був ефективним незалежно від механізмів лікарської стійкості, які набули мікроорганізми. Результати, отримані в експериментах в агарі, наведені в табл. 5.1.

Таблиця 5.1

Чутливість до 1% розчину NCT мікроорганізмів, що наділені різними механізмами резистентності (Me (SE), мм)

MRSA	<i>K. pneumoniae</i> KPC	<i>K. pneumoniae</i> MBL	<i>A. baumannii</i> complex MBL
n = 11	n = 3	n = 3	n = 6
20 (3) мм	18 (3) мм	18 (3) мм	18 (2) мм

MRSA – метицилін-резистентний *S. aureus*

KPC – продукція карбапенемаз класу А

MBL – продукція металло-β-лактамаз

Проте при подальшому порівнянні чутливості до NCT грам-позитивних та грам-негативних культур встановлено, що мікроорганізми *S. aureus* продукують більшу на 2,0 (95%ДІ 0,54-2,86) мм зону затримки росту навколо «колодязя» з антисептиком в порівнянні з *K. pneumoniae* та *A. baumannii* (H=9,90; p <0,05).

На рис. 5.1 зображено результати проведених дослідів з визначення чутливості до NCT методом «колодязів».



Рис. 5.1 Вплив 1% розчину NCT на патогени з розширеною лікарською стійкістю, асоційовані з ускладненнями дентальної імплантації (зліва направо *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, MRSA)

### **5.1.2 Вивчення динаміки впливу NCT на життєздатність планктонних форм мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації**

При проведенні досліджень в 1% розчині NCT отримано аналогічні результати. Всі культури були чутливими до NCT та показали зменшення мікробного навантаження щонайменше на 2 lg кроки КУО/мл вже через 10 хв від початку дослідження. Через 10 хв від початку дослідження мікробне навантаження роду *Staphylococcus* складало 5,2 (0,5) lg КУО/мл, роду *Streptococcus* – 5,1 (0,4) lg КУО/мл, *Klebsiella sp.* – 6,0 (0,3) lg КУО/мл, *Acinetobacter spp.* – 6,5 (0,5) lg КУО/мл. Аналіз різниці змін мікробного навантаження на 10 хв дослідження показав, що грам-позитивні ізоляти демонстрували кращі результати (H=28,11; p >0,05). На даному етапі для всіх культур мікробне навантаження в лунках з хлоргексидином та NCT не

відрізнялося для родів *Staphylococcus*, *Streptococcus* та *Klebsiella* (U-критерій;  $p > 0,05$ ), але не для *Acinetobacter* – різниця становила 2,6 (95%ДІ 0,7 – 4,5) lg КУО/мл ( $t = 3,00$ ;  $p < 0,05$ ).

Динаміка мікробного навантаження на 20 хв дослідження не показала статистично значущих відмінностей в порівнянні з попереднім результатом для всіх досліджуваних культур (W – критерій,  $p > 0,05$ ), проте тенденція зміни КУО/мл залишалася негативною. Аналогічно до попереднього часового періоду, на 20 хв дослідження хлоргексидин був більш ефективним проти *Acinetobacter spp.* в порівнянні з NCT – різниця становила 3,2 (95%ДІ 2,1 – 4,3) lg КУО/мл ( $t = 6,64$ ;  $p < 0,05$ ).

Після додаткових 10 хв експозиції вдалося досягти відмінностей в мікробному навантаженні в порівнянні з попереднім часовим періодом та невизначуваного рівня (W – критерій,  $p < 0,05$ ). Висіви з лунок після 30 хв експозиції в NCT показали, що рівень мікробного навантаження всіх дослідних культур становив  $\leq 2$  lg КУО/мл. Ефективність протимікробного кліренсу NCT на 30 хв дослідження не відрізнялася від результатів в лунках з хлоргексидином (U-критерій;  $p < 0,05$ ). Пролонгація експозиції в NCT до 40 хв не додавала значущих результатів для всіх дослідних культур – W-критерій,  $p > 0,05$ .

На всіх часових проміжках не було суттєвої різниці в ефективності NCT проти умовно чутливих та агентів з розширеною лікарською стійкістю (U-критерій,  $p > 0,05$ ).

Результати з вивчення редукції мікробного навантаження планктонних форм мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації, узагальнено на рис. 5.2.

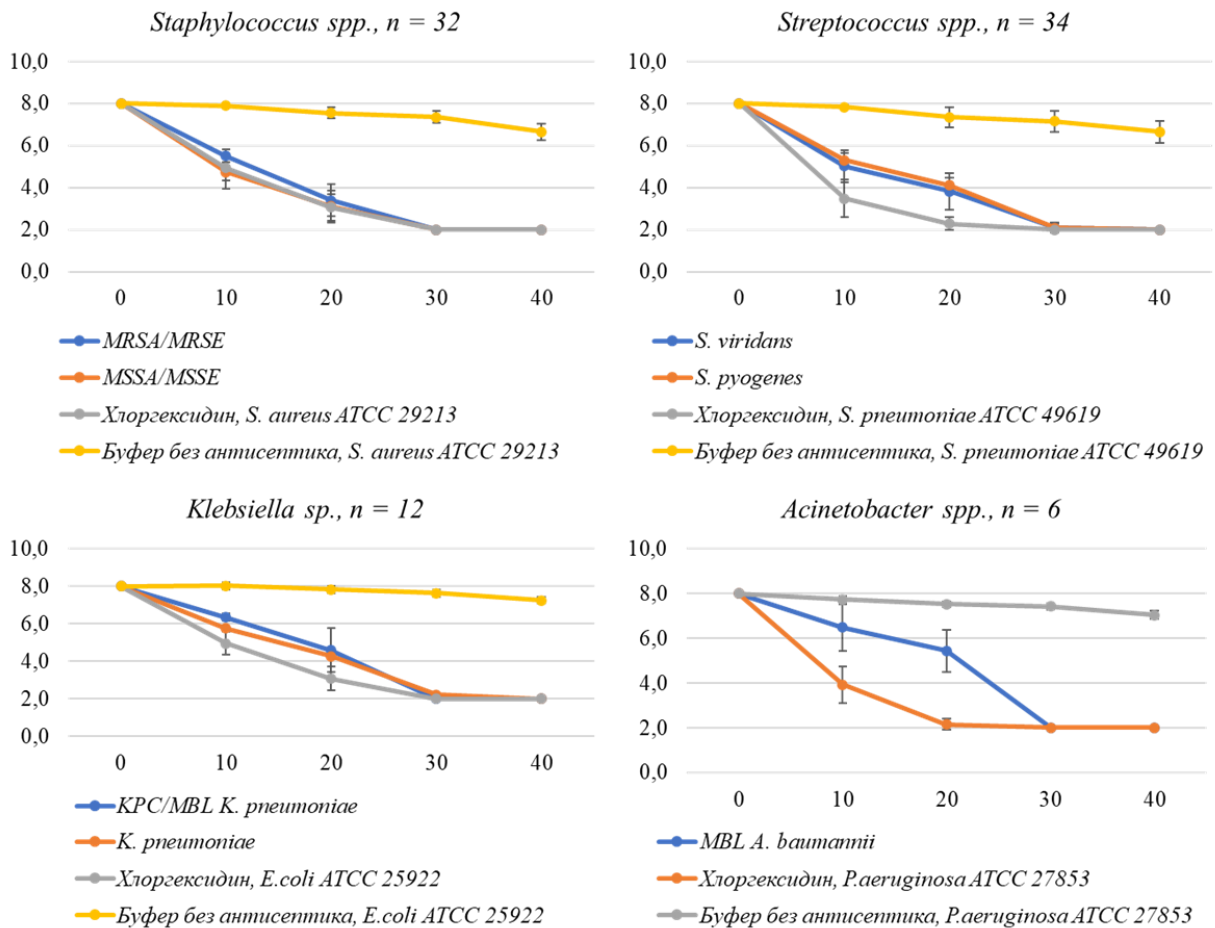


Рис. 5.2 Вплив 1% розчину NCT на планктонні форми мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації. М (SD) lg КУО/мл

## 5.2 Вплив NCT на тривало сформовану біоплівку на поверхні титанових імплантатів *in vitro*

Оскільки в попередньому досліді було отримано позитивні результати, ми вирішили вивчити вплив NCT на сформовану біоплівку. Вирощені на поверхні імплантату біоплівки піддавали впливу NCT та визначили спектр чутливих мікроорганізмів, необхідну тривалість експозиції, що забезпечувала мікробіцидну дію, та вплив антисептика на метаболічну активність мікробіоти, асоційованої з ускладненнями дентальної імплантації.

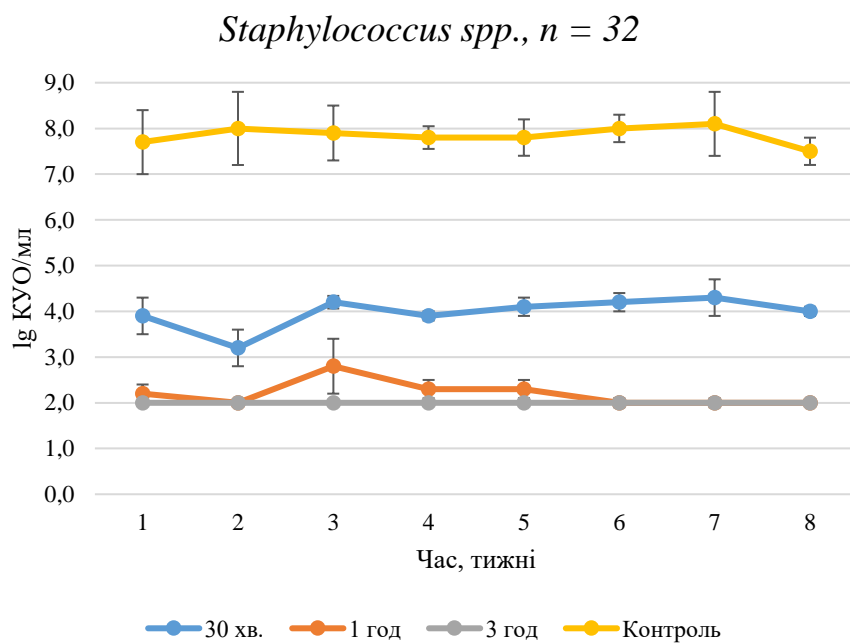
### 5.2.1 Вплив НСТ на біоплівкові форми мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації

Мікробне навантаження в необроблених біоплівках, утворених мікроорганізмами, асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації, сягало 9 lg КУО/мл.

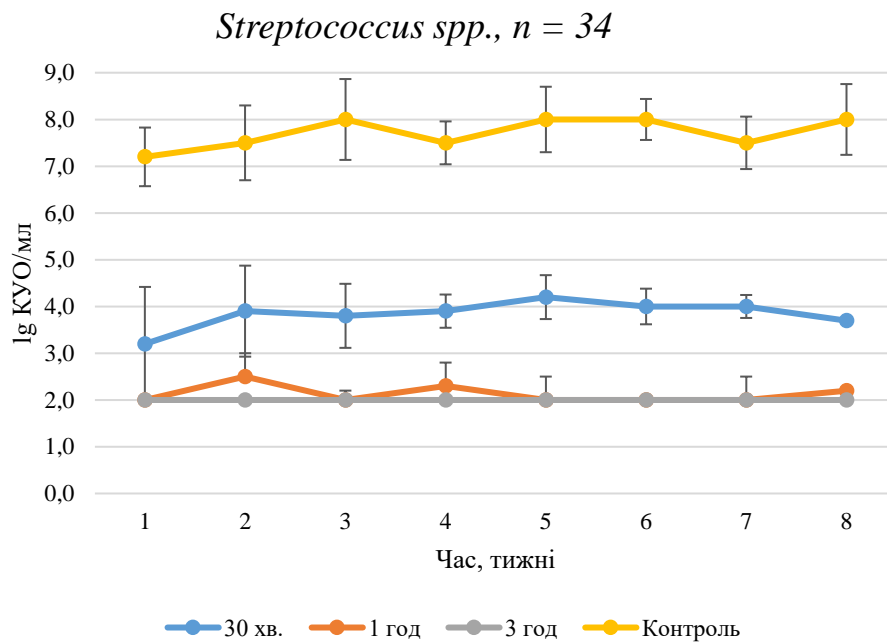
Після обробки культур 1%-розчином НСТ виявлено значну бактерицидну активність відносно всіх досліджуваних біоплівкових форм бактерій вже через 30 хв від початку дослідження, коли редукція мікробного навантаження склала в середньому 3,2 lg КУО/мл. Для родів *Staphylococcus* та *Streptococcus* життєздатність бактерій в біоплівці не відрізнялася ( $U = 37,0$ ;  $p > 0,05$ ) і становила 4,0 (0,1) lg КУО/мл і 4,0 (0,2) lg КУО/мл відповідно. Для грам-негативних культур ростові показники також були приблизно рівними ( $U = 14,5$ ;  $p > 0,05$ ) і становили: *Klebsiella sp.* – 4,7 (0,3) lg КУО/мл, *Acinetobacter spp.* – 5,2 (0,3) lg КУО/мл. Тож, різниця в зміні мікробного навантаження грам-позитивних та грам-негативних мікроорганізмів біоплівкового походження після 30 хв експозиції в НСТ становила 1,1 (95%ДІ 0,9-1,3) lg КУО/мл.

Пролонгація експозиції до 60 хв в НСТ призвела до подальшої редукції кількості життєздатних клітин усіх дослідних культур та зрівняння мікробного навантаження в лунках (W-критерій,  $p < 0,05$ ). На 60 хв досліду ріст з лунок зі *Staphylococcus spp.* становив 2,2 (0,2) lg КУО/мл, *Streptococcus spp.* – 2,1 (0,1) lg КУО/мл, *Klebsiella sp.* – 2,2 (0,1) lg КУО/мл, *Acinetobacter spp.* – 2,3 (0,3) lg КУО/мл ( $H=4,10$ ;  $p > 0,05$ ). Тож, додаткові 30 хв експозиції в НСТ призвели до зникнення різниці в мікробному навантаженні грам-позитивних та грам-негативних культур (W-критерій;  $p > 0,05$ ). Пролонгація досліду до 3 год не додавала статистично значущих результатів для усіх досліджуваних культур (W-критерій,  $p < 0,05$ ).

На рис. 5.3 (А – Г) узагальнено результати, отримані в досліді з вивчення активності NCT проти біоплівкових форм мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації.

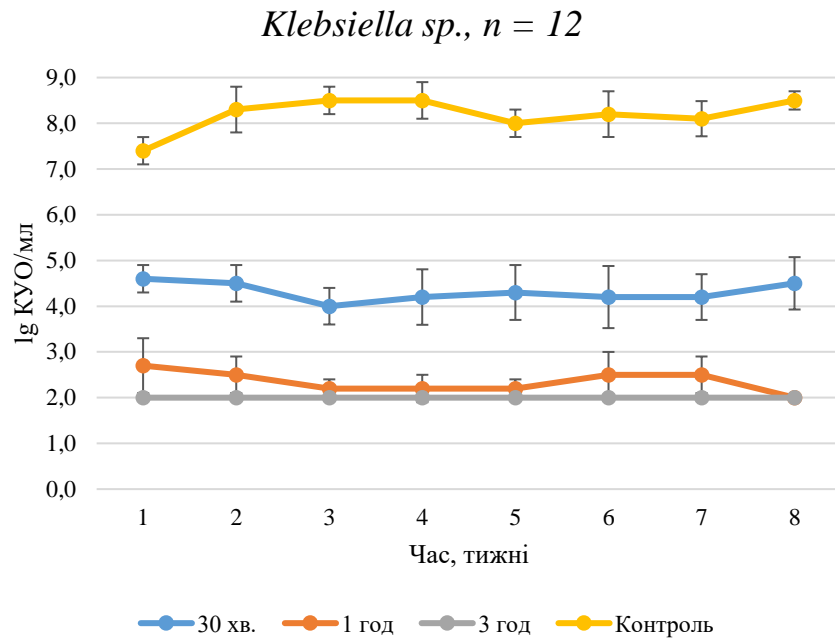


А

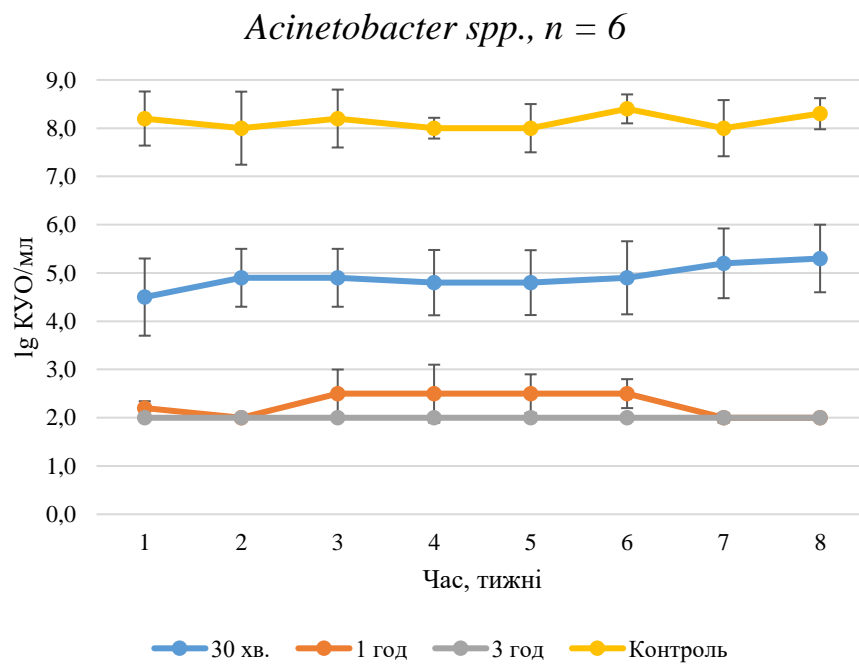


Б





В



Г

Рис. 5.3 Бактерицидна активність 1% НСТ при рН 7,1 і  $t = 37^{\circ}\text{C}$  проти біоплівок клінічних ізолятів *Staphylococcus spp.* (А), *Streptococcus spp.* (Б), *Klebsiella sp.* (В), *Acinetobacter spp.* (Г), вирощуваних протягом 8 тижнів. Життєздатність досліджували щотижня кількісним культуральним методом.

M (SD) Ig КУО/мл;  $p < 0,001$  для всіх значень 30 хв, 1 год, 3 год NCT і в порівнянні з контролем;  $p > 0,05$  для щотижневих змін мікробного навантаження в утворюваній *in vitro* біоплівці

### **5.2.2 Вплив NCT на метаболічну активність біоплівкових форм мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації**

Метаболічний зсув після інкубації в 1% NCT протягом 30 хв, 1 год та 3 год реєстрували за допомогою аналізу ХТТ.

Досліджена концентрація NCT значно знижувала метаболізм в мікробних клітинах. Високі значення для більшості досліджених ізолятів були досягнуті вже через 30 хв інкубації. Зокрема серед *Staphylococcus spp.* на початкових етапах дослідження експозиція в NCT призводила до втрати 53,0 (2,5)% метаболічної активності; *Streptococcus spp.* – 61 (2,2)%, *Klebsiella sp.* – 42 (5,5)%, *Acinetobacter spp.* – 51 (4,8)%. Тож, показники 30-хвилинного впливу NCT на метаболічну активність грам-позитивних та грам-негативних культур дещо відрізнялися між собою, різниця становила – 8 (2,5)% (U-критерій,  $p < 0,05$ ).

Подальша інкубація сприяла наростанню метаболічного обороту; порівняно з 30 хв експозиції, тривала інкубація протягом 60 хв призвела до прогресивного зниження метаболічної активності (W-критерій,  $p < 0,05$ ). Дефіцит метаболічної активності *Staphylococcus spp.* становив 84,0 (3,0)%, *Streptococcus spp.* – 84 (5,0)%, *Klebsiella sp.* – 83 (5,5)%, *Acinetobacter spp.* – 80 (5,5)%. Тож, через додаткові 30 хв. експозиції в NCT призвели до нівелювання існуючої різниці між грам-позитивними та грам-негативними культурами (U-критерій,  $p > 0,05$ ).

Результати визначення метаболічного дефіциту після 3-годинної експозиції в NCT не продемонстрували значних змін (W-критерій,  $p > 0,05$ ).

На всіх часових проміжках результати в лунках з NCT достовірно відрізнялися від негативного контролю (*P. aeruginosa* ATCC 27853) без додавання антисептику (U-критерій,  $p < 0,05$ ).

Результати, отримані на даному етапі дослідження узагальнено на рис.

5.4.

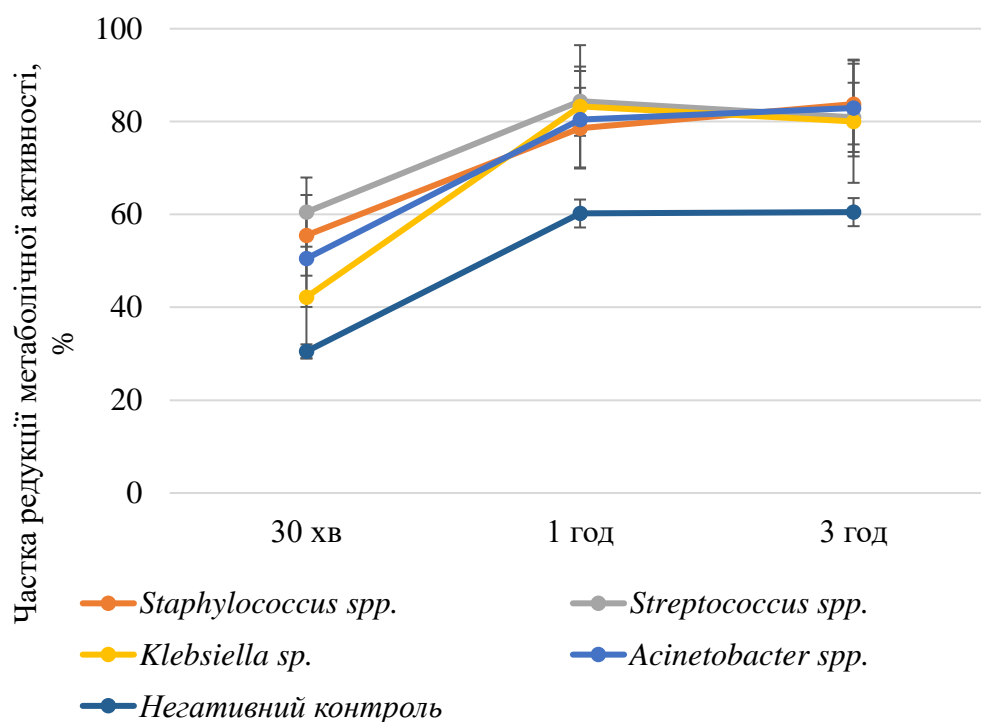


Рис. 5.4 Визначення втрати метаболічної активності в біоплівках за допомогою ХТТ – тесту. М (SD), %;  $p < 0,01$  для часових точок 30 хвилин і 1 година;  $p < 0,01$  у всіх точках часу для досліджуваних ізолятів і контролю;  $p > 0,05$  для моментів часу 1 година та 3 години.

### 5.3 Узагальнення результатів дослідження

В даному розділі проведено оцінку ефективності 1% розчину NCT проти планктонних та біоплівкових форм мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації. Показано, що NCT володіє високою активністю в тому числі проти ізолятів з розширеною лікарською стійкістю незалежно від механізмів резистентності, які вони розвинули (U-критерій,  $p > 0,05$ ). Проте в досліджах в агарі прослідковувалася більш виражена активність NCT саме проти грам-позитивних культур ( $H=9,90$ ;  $p < 0,05$ ).

При проведенні експериментів в 1% розчині NCT також всі культури були чутливими до NCT та показали зменшення мікробного навантаження

щонайменше на 2 lg кроки КУО/мл вже через 10 хв від початку дослідження. На початкових етапах дослідження грам-позитивні ізоляти демонстрували кращі результати ( $H=28,11$ ;  $p > 0,05$ ). Проте подальша культивування до 20 і 30 хв призвела до зрівняння показників грам-позитивних та грам-негативних мікроорганізмів ( $H$  – критерій,  $p > 0,05$ ). Через 30 хв від початку дослідження вдалося досягти невизначуваного рівня мікробного навантаження в усіх лунках ( $p < 0,05$ ). На всіх часових проміжках не було суттєвої різниці в ефективності НСТ проти умовно чутливих та агентів з розширеною лікарською стійкістю ( $U$ -критерій,  $p > 0,05$ ).

При дослідженні впливу 1% розчину НСТ на сформовану біоплівку виявлено значну бактерицидну активність антисептика відносно всіх досліджуваних культур вже через 30 хв від початку дослідження, коли редукція мікробного навантаження склала в середньому 3,2 lg КУО/мл. На початку дослідження не було відмінностей між мікробним навантаженням лунок *Staphylococcus* та *Streptococcus* ( $U = 37,0$ ;  $p > 0,05$ ) і *Klebsiella sp.* (0,3) lg КУО/мл та *Acinetobacter spp.* ( $U = 14,5$ ;  $p > 0,05$ ). Проте, аналогічно до попередніх результатів, на початкових етапах дослідження, відмічалася різниця в чутливості грам-позитивних та грам-негативних ізолятів – 1,1 (95%ДІ 0,9-1,3) lg КУО/мл. Тим не менш, пролонгація експозиції до 60 хв призвела до подальшої редукції кількості життєздатних клітин усіх дослідних культур та зрівняння мікробного навантаження в лунках ( $W$ -критерій,  $p < 0,05$ ). Пролонгація досліду до 3 год не додавала статистично значущих результатів для усіх досліджуваних культур ( $W$ -критерій,  $p < 0,05$ ).

В дослідженні також було показано, що досліджувана концентрація НСТ значно знижувала метаболізм в мікробних клітинах. Вже через 30 хв інкубації дефіцит метаболічної активності становив 53-61% в залежності від виду. Додаткові 30 хв інкубації призводили до подальшого наростання метаболічного обороту до 80-84% в залежності від виду ( $W$ -критерій,  $p < 0,05$ ). Результати визначення метаболічного дефіциту після 3-годинної експозиції в НСТ не продемонстрували значних змін ( $W$ -критерій,  $p > 0,05$ ).

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі розв'язана важлива проблема сучасної медицини щодо важливості мікробіологічного дослідження в стоматології та запропоновано шляхи боротьби з патогенами, асоційованими з ускладненнями дентальної імплантації.

За результатами роботи зроблено наступні висновки:

1. Серед факторів, пов'язаних з ускладненнями дентальної імплантації, в нашому дослідженні ми виділили недотримання гігієни порожнини рота, куріння, пародонтит та зсуви в мікробному складі біоплівки. Область імплантації, використання антибіотиків протягом останніх трьох місяців та стать не показали суттєвого впливу на наслідки дентального протезування.

2. Біоплівка пошкоджених зубних імплантатів є неоднорідною. Основними інфектами були *Staphylococcus spp.*, *Porphyromonas spp.* та *Fusobacterium spp.* Видовий склад мікробіоти періімплантної ділянки з гнійно-запальним потенціалом відрізнявся більшою питомою вагою родів *Fusobacterium* і *Porphyromonas*, особливо при пізній втраті імплантату. Рання втрата дентального протезу була пов'язана з виділенням *Haemophilus spp.*, *S. pyogenes*, *Actinomycetales*, *S. aureus*. Біоплівка періімплантної ділянки здорових імплантатів мала більшу різноманітність та включала коменсальні роди *Aerococcus*, *Peptostreptococcus* та *Prevotella*.

3. Здебільшого отримані культури мали типові культуральні, морфологічні та біохімічні характеристики. Проте серед усіх ізолятів *S. aureus* 25,0% мали фенотип МКФ. Ауксотрофія з'являлася на фоні лікування антибіотиками і при ко-інфекції з НФГНМО ( $p < 0,05$ ). Колонії з морфотипом МКФ мали достовірно вищі біоплівко-утворювальні та адгезивні властивості в порівнянні з диким фенотипом. Більшість ізолятів невибагливих грам-негативних паличок володіли середнім та високим адгезивним потенціалом. При чому ступінь адгезивності та щільності утворення біоплівки корелювали достовірно корелювали між собою. Стійкі ізоляти *K. pneumoniae* були наділені більшими

адгезивними та біоплівко-утворювальними властивостями в порівнянні з умовно чутливими.

4. Загалом мікроорганізми, асоційовані з ускладненнями дентальної імплантації, мали варіабельні показники чутливості до антибіотиків. Серед усіх ізолятів роду *Staphylococcus* профіль метицилін-резистентності мали 11 культур. Низькі показники чутливості відмічали також для скринінгу з норфлоксацином – 25% та еритроміцином – 28%, а також до кліндаміцину – 53,1%. Профіль чутливості мікроорганізмів родів *Streptococcus* та *Aerococcus* був задовільним. Але, на відміну від грам-позитивних коків, невибагливі грам-негативні палички мали високі показники лікарської стійкості – зокрема 50% ізолятів *K. pneumoniae* та 100% культур *Acinetobacter spp.* За результатами фенотипових тестів встановлено продукцію карбапенемаз та металло- $\beta$ -лактамаз у грам-негативних паличок.

5. NCT у мілімолярній концентрації ефективно обмежує життєздатність широко спектру мікроорганізмів, здатних до біоплівкових форм життя, щонайменше *in vitro*. Таким чином, сполука виглядає як багатообіцяючий кандидат для досліджень у клінічних умовах для контролю мікробної колонізації та утворення біоплівки в зубних імплантатах. Наше дослідження підтверджує, що різні механізми стійкості до антибіотиків не впливають на бактерицидну активність NCT, що робить його перспективним для лікування резистентних інфекцій.

Тож, оральний мікробіом є зміненим і містить патогенів зі зміненими вірулентними властивостями. Стандартна протимікробна терапія, з одного боку, є можливістю контролю колонізації, але з іншого – сприяє селекції мультирезистентних клонів. NCT є багатообіцяючою перспективою.

Ці висновки наголошують на важливості комунікації між клінічними мікробіологами та клініцистами, що задіяні в лікуванні інфекційно-запальних процесів ротової порожнини. Така співпраця була б корисною для вибору оптимальної тактики лікування та попередження подальшого прогресування

патологічного процесу в ділянці стоянні імплантату, а отже, покращення якості життя та середньої очікуваної тривалості стояння імплантату.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Забезпечення впливу на модифікуючі фактори ризику, в тому числі різноманіття нормальної мікробіоти, при дентальній імплантації задля забезпечення якнайдовшої тривалості стояння дентального імплантату

Використовувати мікробіологічний профіль дентального імплантату на ряду з іншими об'єктивними методами при діагностиці інфекційно-запальних процесів періімплантних тканин.

На преаналітичному етапі мікробіологічного дослідження зразків з періімплантних тканин дотримуватися вимог щодо транспортування біологічного матеріалу задля підвищення чутливості методу.

На аналітичному етапі мікробіологічного дослідження звертати увагу на існування особливих морфотипів традиційних інфекційних агентів, які можуть бути виділені при використанні додаткових поживних середовищ та/або пролонгованого часу культивуації.

З огляду на високий профіль стійкості ряду мікроорганізмів, асоційованих з ускладненнями дентальної імплантації, при прийнятті рішення щодо призначення антибіотиків враховувати результати тестування на чутливість.

Розглянути перспективу використання NCT в якості антисептика для планування подальших досліджень в даній галузі.

З врахуванням найкращих практик та свого власного досвіду опубліковано наукову працю, що містить рекомендації для роботи з біологічним матеріалом від пацієнтів з ускладненнями дентальної імплантації на всіх етапах мікробіологічного дослідження з метою покращення ефективності нагляду та якості надання медичної допомоги (Єфіменко А. О., Іщенко О. В. Особливості мікробіологічних досліджень в стоматологічній практиці. Перспективи та інновації науки (Серія «Медицина»). 2023; 14 (32): 969-986. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-969-986](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-969-986)).



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- 1 Yu J, Zhou M, Zhang L, Wei H. Antibacterial Adhesion Strategy for Dental Titanium Implant Surfaces: From Mechanisms to Application. *J Funct Biomater*. 2022; 13 (4): 169. <https://doi.org/10.3390/jfb13040169>
- 2 Gómez-de Diego R, Mang-de la Rosa Mdel R, Romero-Pérez MJ, Cutando-Soriano A, López-Valverde-Centeno A. Indications and contraindications of dental implants in medically compromised patients: update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014; 19 (5): e483-e489. <https://doi.org/10.4317/medoral.19565>
- 3 Rotim Ž, Pelivan I, Sabol I, Sušić M, Čatić A, Bošnjak AP. The effect of local and systemic factors on dental implant failure - analysis of 670 patients with 1260 implants. *Acta Clin Croat*. 2022; 60 (3): 367-372. <https://doi.org/10.20471/acc.2021.60.03.05>
- 4 Loban HA, Faustova MO, Ananieva MM, Basarab YO. The unique properties of microorganisms that form a biofilm of the oral cavity. *ZMJ [Internet]*. [cited 2023Nov.20]; (3). <https://doi.org/10.14739/2310-1210.2019.3.169198>
- 5 Гончарук-Хомин М, Русин В, Кенюк А, Бокоч А, Мельник Л. Аналіз поширеності періімплантиту за даними систематичних оглядів на пацієнта- та імплантат- досліджуваних рівнях. *іновасії [інтернет]*. 2022; (1): 48-5. [цит. за 10, Листопад 2023] <https://doi.org/10.35220/2523-420X/2022.1.8>
- 6 Berglundh T, Armitage G, Araujo MG, Avila-Ortiz G, Blanco J, Camargo PM, et al. Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018; 89 (1): 313-318. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0739>.

- 7 Kochar SP, Reche A, Paul P. The Etiology and Management of Dental Implant Failure: A Review. *Cureus*. 2022; 14 (10): e30455. <https://doi.org/10.7759/cureus.30455>
- 8 Moraschini V, Poubel LAC, Ferreira VF, Barboza ESP. Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015; 44 (3): 377–388. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2014.10.023>.
- 9 Sun TC, Chen CJ, Gallucci GO. Prevention and management of peri-implant disease. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2023; 25 (4): 752-766. <https://doi.org/10.1111/cid.13206>
- 10 Korsch M, Marten SM, Stoll D, Prechtel C, Dötsch A. Microbiological findings in early and late implant loss: an observational clinical case-controlled study. *BMC oral health*. 2021; 21 (1): 112. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01439-w>.
- 11 Römling U. Is biofilm formation intrinsic to the origin of life? *Environ Microbiol*. 2023; 25 (1): 26-39. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.16179>.
- 12 Coraça-Huber DC, Ammann CG, Fille M, Hausdorfer J, Nogler M, Nagl M. Bactericidal activity of N-chlorotaurine against biofilm-forming bacteria grown on metal disks. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58 (4): 2235-2239. <https://doi.org/10.1128/AAC.02700-13>
- 13 Фаустова МО. Мікробіологічне обґрунтування застосування Антисептичних препаратів для профілактики та лікування інфекційно-запальних ускладнень одонтоімплантації [дисертація]. Вінниця; 2018. 206 с.
- 14 Pjetursson BE, Tan K, Lang NP, Brägger U, Egger M, Zwahlen M. A systematic review of the survival and complication rates of fixed partial dentures (FPDs) after an observation period of at least 5 years. *Clin Oral*

- Implants Res. 2004; 15 (6): 625-642. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01117.x>
- 15 Atieh MA, Alsabeeha NH, Faggion CM Jr, Duncan WJ. The frequency of peri-implant diseases: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2013; 84 (11): 1586-1598. <https://doi.org/10.1902/jor.2012.120592>
- 16 Сапальов СО. Клініко-біомеханічне обґрунтування показань до застосування імплантатів в змінному зубному протезуванні [дисертація]. Запоріжжя; 2021. 161 с.
- 17 Salvi GE, Monje A, Tomasi C. Long-term biological complications of dental implants placed either in pristine or in augmented sites: A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2018; 29 Suppl 16: 294-310. <https://doi.org/10.1111/clr.13123>
- 18 Ting M, Craig J, Balkin BE, Suzuki JB. Peri-implantitis: A Comprehensive Overview of Systematic Reviews. *J Oral Implantol.* 2018; 44 (3): 225-247. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-16-00122>
- 19 de Waal YC, van Winkelhoff AJ, Meijer HJ, Raghoobar GM, Winkel EG. Differences in peri-implant conditions between fully and partially edentulous subjects: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2013; 40 (3): 266-286. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12013>
- 20 Мазур І, Венцурик Ю, Мазур П, Буря Д. Фактори ризику розвитку пері-імплантиту. *umv [інтернет].* 2023 [цит. за 22, Жовтень 2023]; (2): 83-7. <https://doi.org/10.32782/umv-2023.2.16>
- 21 Mohanty R, Asopa SJ, Joseph MD, Singh B, Rajguru JP, Saidath K et al. Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. *J Family Med Prim Care.* 2019; 8 (11): 3480-3486. [https://doi.org/10.4103/jfmprc.jfmprc\\_759\\_19](https://doi.org/10.4103/jfmprc.jfmprc_759_19)
- 22 Sá AM, Mendes JM, Silva AS, Gonçalves MdP, Cardoso M, Coelho C. Opportunistic Pathogens Isolated from Peri-Implant and Periodontal

- Subgingival Plaque from Adjacent Teeth. *Applied Sciences*. 2023; 13 (16): 9078. <https://doi.org/10.3390/app13169078>
- 23 Turri A, Rossetti PH, Canullo L, Grusovin MG, Dahlin C. Prevalence of Peri-implantitis in Medically Compromised Patients and Smokers: A Systematic Review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016; 31 (1): 111-118. <https://doi.org/10.11607/jomi.4149>
- 24 Chmielewski M, Pilloni A. Current Molecular, Cellular and Genetic Aspects of Peri-Implantitis Disease: A Narrative Review. *Dent J (Basel)*. 2023; 11 (5): 134. <https://doi.org/10.3390/dj11050134>
- 25 Belibasakis GN, Manoil D. Microbial Community-Driven Etiopathogenesis of Peri-Implantitis. *Journal of Dental Research*. 2021; 100 (1): 21-28. <https://doi.org/10.1177/0022034520949851>
- 26 Ata-Ali J, Flichy-Fernández AJ, Alegre-Domingo T, Ata-Ali F, Palacio J, Peñarrocha-Diago M. Clinical, microbiological, and immunological aspects of healthy versus peri-implantitis tissue in full arch reconstruction patients: a prospective cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2015; 15: 43. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0031-9>
- 27 Sharma D, Misba L, Khan AU. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019; 8: 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>
- 28 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* 2022; 399 (10325): P629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- 29 Asokan GV, Ramadhan T, Ahmed E, Sanad H. WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman Med J*. 2019; 34 (3): 184-193. <https://doi.org/10.5001/omj.2019.37>

- 30 Wadia R. Periodontitis treatment outcomes and peri-implantitis. *Br Dent J.* 2021; 230 (6): 362. <https://doi.org/10.1038/s41415-021-2853-y>
- 31 Reise M, Kranz S, Heyder M, Beck J, Roth C, Guellmar A, von Eggeling F, Schubert U, Löffler B, Sigusch B. Salivary Pellicle Formed on Dental Composites Evaluated by Mass Spectrometry – An In Situ Study. *Molecules.* 2023; 28 (19): 6804. <https://doi.org/10.3390/molecules2-8196804>
- 32 Belibasakis GN, Charalampakis G, Bostanci N, Stadlinger B. Peri-implant infections of oral biofilm etiology. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 830: 69-84. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11038-74>
- 33 Payne JB, Johnson PG, Kok CR, et al. Subgingival Microbiome Colonization and Cytokine Production during Early Dental Implant Healing. *mSphere.* 2017; 2 (6): e00527-17. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00527-17>
- 34 Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Arch Oral Biol.* 2014; 59 (1): 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.09.013>
- 35 Heitz-Mayfield LJ, Teles R, Lang NP. 2015. Peri-implant infections. In: Lang NP, Lindhe J, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry.* 6th ed. New York: Wiley. p. 222–237.
- 36 Кравченко АВ. Попередження ускладнень на етапі хірургічного лікування і реабілітації генералізованого пародонтиту, асоційованого із персистуючою герпесвірусною інфекцією [дисертація]. Київ. 2021; 210 с.
- 37 Bornes R, Montero J, Correia A, Marques T, Rosa N. Peri-implant diseases diagnosis, prognosis and dental implant monitoring: a narrative review of novel strategies and clinical impact. *BMC Oral Health.* 2023; 23 (1): 183. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-02896-1>.

- 38 Kado I, Hisatsune J, Tsuruda K, Tanimoto K, Sugai M. The impact of fixed orthodontic appliances on oral microbiome dynamics in Japanese patients. *Sci Rep.* 2020; 10: 21989. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78971-2>
- 39 Blank, E., Grischke, J., Winkel, A. et al. Evaluation of biofilm colonization on multi-part dental implants in a rat model. *BMC Oral Health.* 2021; 21: 313. <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01665-2>
- 40 Yeh HC, Lu JJ, Chang SC, Ge MC. Identification of microbiota in peri-implantitis pockets by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Sci Rep.* 2019; 9: 774. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37450-5>
- 41 Ghensi P, Manghi P, Zolfo M, Armanini F, Pasolli E, Bolzan M et al. Strong oral plaque microbiome signatures for dental implant diseases identified by strain-resolution metagenomics. *npj Biofilms Microbiomes.* 2020; 6: 47. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00155-7>
- 42 Sun F, Liu J, Li SQ, Wei YP, Hu WJ, Wang C. [Profiles and differences of submucosal microbial in peri-implantitis and health implants: A cross-sectional study]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2023; 55 (1): 30-37. [in Chinese] <https://doi.org/10.19723/j.issn.1671-167X.2023.01.005>.
- 43 Butera A, Pascadopoli M, Pellegrini M, Gallo S, Zampetti P, Scribante A. Oral Microbiota in Patients with Peri-Implant Disease: A Narrative Review. *Applied Sciences.* 2022; 12 (7): 3250. <https://doi.org/10.3390/app12073250>
- 44 Suzuki H, Tsuzukibashi O, Fukatsu A. Health Indicator Bacteria That Is Useful for Risk Assessment of Peri-Implantitis. *Open Journal of Stomatology.* 2021; 11: 360-372. <https://doi.org/10.4236/ojst.2021.119032>
- 45 Polymeri A, van der Horst J, Buijs MJ, Zaura E, Wismeijer D, Crielaard W et al. W. Submucosal microbiome of peri-implant sites: A cross-

- sectional study. *J Clin Periodontol.* 2021; 48 (9): 1228-1239.  
<https://doi.org/10.1111/jcpe.13502>
- 46 Veseli E, Staka G, Tovani-Palone MR. Evaluation of red-complex bacteria loads in complete denture patients: a pilot study. *BDJ Open.* 2023; 9: 7.  
<https://doi.org/10.1038/s41405-023-00133-z>
- 47 Hashimoto Y, Okada S, Yasuda K, Kawagoe M, Kajiya M, Tsuga K. Microbial differences between active and remission peri-implantitis. *Sci Rep* 12. 2022; 5284. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09192-y>
- 48 Colombo APV, do Souto RM, Araújo LL, et al. Antimicrobial resistance and virulence of subgingival staphylococci isolated from periodontal health and diseases. *Sci Rep.* 2023; 13 (1): 11613.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-38599-4>
- 49 Groeger S, Zhou Y, Ruf S, Meyle J. Pathogenic Mechanisms of *Fusobacterium nucleatum* on Oral Epithelial Cells. *Front Oral Health.* 2022; 3: 831607. <https://doi.org/10.3389/froh.2022.831607>
- 50 Brennan CA, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* - symbiont, opportunist and oncobacterium. *Nat Rev Microbiol.* 2019; 17: 156–66.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0129-6>
- 51 Miyamoto M, Ishihara K, Okuda K. The *Treponema denticola* surface protease dentilisin degrades interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun.* 2006; 74 (4): 2462-2467.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.74.4.2462-2467.2006>
- 52 Pérez-Chaparro PJ, Duarte PM, Shibli JA, Montenegro S, Lacerda Heluy S, Figueiredo LC et al. The Current Weight of Evidence of the Microbiologic Profile Associated With Peri-Implantitis: A Systematic Review. *Journal of Periodontology.* 2016; 87 (11): 1295–1304.  
<https://doi.org/10.1902/jop.2016.160184>

- 53 Mahlen SD, Clarridge JE 3rd. Oral abscess caused by *Campylobacter rectus*: case report and literature review. *J Clin Microbiol.* 2009; 47 (3): 848-851. <https://doi.org/10.1128/JCM.01590-08>
- 54 Aleksijević LH, Aleksijević M, Škrlec I, Šram M, Šram M, Talapko J. *Porphyromonas gingivalis* Virulence Factors and Clinical Significance in Periodontal Disease and Coronary Artery Diseases. *Pathogens.* 2022; 11 (10): 1173. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101173>
- 55 Minkiewicz-Zochniak A, Jarzynka S, Iwańska A, et al. Biofilm Formation on Dental Implant Biomaterials by *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients with Cystic Fibrosis. *Materials (Basel).* 2021; 14 (8): 2030. <https://doi.org/10.3390/ma14082030>
- 56 Gherardi G. *Staphylococcus aureus* Infection: Pathogenesis and Antimicrobial Resistance. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023; 24 (9): 8182. <https://doi.org/10.3390/ijms24098182>
- 57 Li C, Wu Y, Riehle A, Ma J, Kamler M, Gulbins E, et al. *Staphylococcus aureus* Survives in Cystic Fibrosis Macrophages, Forming a Reservoir for Chronic Pneumonia. *Infect Immun.* 2017; 21: 85 (5): e00883-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00883-16>
- 58 Melter O, Radojevič B. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*--review. *Folia Microbiol (Praha).* 2010; 55 (6): 548-58. <https://doi.org/10.1007/s12223-010-0089-3>
- 59 Masoud-Landgraf L, Zarfel G, Kaschnigg T, Friedl S, Feierl G, Wagner-Eibel U, et al. Analysis and Characterization of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants Isolated From Cystic Fibrosis Patients in Austria. *Curr Microbiol.* 2016; 2 (5): 606-11. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-0994-z>
- 60 Loss G, Simões PM, Valour F, et al. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): News From a Chronic Prosthetic Joint



- Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9: 363.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00363>
- 61 Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics.* 2023; 12 (2): 234.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12020234>
- 62 Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr.* 2016; 4 (1): 10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012>
- 63 Chakravarty B. Genetic mechanisms of antibiotic resistance and virulence in *Acinetobacter baumannii*: background, challenges and future prospects. *Mol Biol Rep.* 2020; 47 (5): 4037-4046. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05389-4>
- 64 Shadan A, Pathak A, Ma Y, Pathania R, Singh RP. Deciphering the virulence factors, regulation, and immune response to *Acinetobacter baumannii* infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023; 13: 1053968.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1053968>
- 65 Sridhar S, Wang F, Wilson TG, Palmer K, Valderrama P, Rodrigues DC. The role of bacterial biofilm and mechanical forces in modulating dental implant failures. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2019; 92: 118-127.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.01.012>
- 66 Gondil VS, Subhadra B. Biofilms and their role on diseases. *BMC Microbiol.* 2023; 23 (1): 203. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02954-2>
- 67 Kovalchuk VP, Nazarchuk OA, Burkot VM, Fomina NS, Prokopchuk ZM, Dobrovanov O. Biofilm forming activity of non-fermenting gram-negative bacteria. *Wiad Lek.* 2021; 74 (2): 252-6

- 68 Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol.* 2022; 20 (10) :608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- 69 Ruhul R, Kataria R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiol Res.* 2021; 251: 126829. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126829>
- 70 Абатуров ОЄ, Крючко ТО. Медикаментозний вплив на диспергування біоплівки. Амінокислоти та їх деривати. *Здоров'я дитини.* 2019; 14 (8) :490-495. <https://doi.org/10.22141/2224-0551.14.8.2019.190844>
- 71 Demkovych AE, Dmitriev MO, Polishchuk SS, Yakymchuk MM. Сучасні методи лікування перімплантиту. *КС [інтернет].* 2020 [cited 22, Листопад 2022]; (1): 43-51. <https://doi.org/10.11603/2311-9624.2020.1.11220>
- 72 Krishnamoorthy G, Narayana A, Balkrishanan D. Chlorhexidine for the Treatment of Peri-Implantitis: Is it a Benison?. *J Long Term Eff Med Implants.* 2022; 32 (1): 19-23. <https://doi.org/10.1615/JLongTermEffMedImplants.2021039510>
- 73 Demkovych AE, Dmitriev MO, Polishchuk SS, Yakymchuk MM. Сучасні методи лікування перімплантиту. *Клінічна Стоматологія.* 2020; 1: 43–51. <https://doi.org/10.11603/2311-9624.2020.1.11220>
- 74 Rokaya D, Srimaneerpong V, Wisitrasameewon W, Humagain M, Thunyakitpisal P. Peri-implantitis Update: Risk Indicators, Diagnosis, and Treatment. *Eur J Dent.* 2020; 14 (4): 672-682. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1715779>
- 75 Mayer Y, Ginesin O, Horwitz J. A nonsurgical treatment of peri-implantitis using mechanic, antiseptic and anti-inflammatory treatment: 1 year follow-up. *Clin Exp Dent Res.* 2020; 6 (4): 478-485. <https://doi.org/10.1002/cre2.286>

- 76 Bürgers R, Witecy C, Hahnel S, Gosau M. The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*. *Arch Oral Biol.* 2012; 57 (7): 940-947. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.01.015>
- 77 Britsun VM, Simurova NV, Popova IV, Simurov OV. Modern chemical disinfectants and antiseptics. Part II. *J. Org. Pharm. Chem.* [Internet]. 2022 [cited 2023 Oct.22]; 19: 4(76): 20-32.
- 78 Faustova MO, Chumak YV, Loban' GA, Ananieva MM and Havryliev VM. Decamethoxin and chlorhexidine bigluconate effect on the adhesive and biofilm-forming properties of *Streptococcus mitis*. *Front. Oral. Health* 2023; 4: 1268676. <https://doi.org/10.3389/froh.2023.1268676>
- 79 Bagnyuk NA, Nazarchuk OA, Babina YM, Chornopyschuk RM, Kulyk AV. Antimicrobial activity of antiseptics in the prevention of postoperative infectious complications. *Biomed. and Biosoc. Anthropol.* [Internet]. 2021; 40: 33-6. <https://doi.org/10.31393/bba40-2020-05>
- 80 Boccia G, Di Spirito F, D'Ambrosio F, Di Palo MP, Giordano F, Amato M. Local and Systemic Antibiotics in Peri-Implantitis Management: An Umbrella Review. *Antibiotics (Basel)*. 2023; 12 (1): 114. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010114>
- 81 Grimus V, Coraça-Huber DC, Steixner SJM, Nagl M. Activity of N-Chlorotaurine against Long-Term Biofilms of Bacteria and Yeasts. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10 (8): 891. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080891>
- 82 Murashevych B, Girenko D, Maslak H. Acute inhalation toxicity of aerosolized electrochemically generated solution of sodium hypochlorite. *Inhal Toxicol.* 2022; 34 (1-2): 1-13. <https://doi.org/10.1080/08958378.2021.2013348>
- 83 Murashevych B, Koshova I, Surmasheva E, Girenko D, Chuiko V, Stepanskyi D. Broad-purpose antimicrobial chlorine-active polymers:

- suppression of multidrug-resistant microorganisms and microbial penetration resistance. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022; 5 (39): 64–73. <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.266171>
- 84 Toropin VM, Murashevych BV, Stepanskyi DO, Toropin MV, Kremenchutskiy HM, Burmistrov KS. New forms of immobilized active chlorine and its potential applications in medicine. *Journal on National Academy of medical sciences of Ukraine*. 2019; 3: 340-352. [Internet] [Cited 6 Oct 2023].
- 85 Gottardi W, Nagl M. N-chlorotaurine, a natural antiseptic with outstanding tolerability. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65 (3): 399-409. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp466>.
- 86 Neher A, Nagl M, Appenroth E, et al. Acute otitis externa: efficacy and tolerability of N-chlorotaurine, a novel endogenous antiseptic agent. *Laryngoscope*. 2004; 114 (5): 850-854. <https://doi.org/10.1097/00005537-200405000-00011>
- 87 Lackner M, Rössler A, Volland A, Stadtmüller MN, Müllauer B, Banki Z et al. N-chlorotaurine is highly active against respiratory viruses including SARS-CoV-2 (COVID-19) in vitro. *Emerg Microbes Infect*. 2022; 11 (1): 1293-1307. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2065932>.
- 88 Arnitz R, Stein M, Bauer P, Lanthaler B, Jamnig H, Scholl-Bürgi S et al. Tolerability of inhaled N-chlorotaurine in humans: a double-blind randomized phase I clinical study. *Ther Adv Respir Dis*. 2018; 1753466618778955. <https://doi.org/10.1177/1753466618778955>.
- 89 Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *J Endod*. 2013; 39 (4): 473-7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.024>.
- 90 Bahrami S, Asadi Z, Zarei M, Hamidinejat H, Henriquez FL. Exposure to sublethal concentrations of chlorine enhances the cytotoxicity of

- Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res.* 2023; 122 (6): 1371-1380.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-023-07837-z>
- 91 Zarei M, Paknejad M, Eskandari MH. Sublethal chlorine stress promotes the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* serovars enteritidis and expression of the related genes. *Food Microbiol.* 2023; 112: 104232.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104232>
- 92 Dhakal J, Sharma CS, Nannapaneni R, McDaniel CD, Kim T, Kiess A. Effect of Chlorine-Induced Sublethal Oxidative Stress on the Biofilm-Forming Ability of *Salmonella* at Different Temperatures, Nutrient Conditions, and Substrates. *J Food Prot.* 2019; 82 (1): 78-92.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-119>
- 93 Karumathil DP, Yin HB, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K. Effect of chlorine exposure on the survival and antibiotic gene expression of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in water. *Int J Environ Res Public Health.* 2014; 11 (2): 1844-1854.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph110201844>
- 94 Jin M, Liu L, Wang DN, Yang D, Liu WL, Yin J, Yang ZW et al. Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation. *The ISME journal.* 2020; 14 (7): 1847–1856. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0656-9>
- 95 Liu SS, Qu HM, Yang D, Hu H, Liu WL, Qiu ZG, Hou AM. Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant. *Water research.* 2018; 136: 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.036>
- 96 Anich C, Orth-Höller D, Lackner M, Nagl M. N-chlorotaurine, a potent weapon against multiresistant bacteria. *J Appl Microbiol.* 2021; 131 (4): 1742-1748. <https://doi.org/10.1111/jam.15052>
- 97 Nagl M, Hess MW, Pfaller K, Hengster P, Gottardi W. Bactericidal activity of micromolar N-chlorotaurine: evidence for its antimicrobial

- function in the human defense system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44 (9): 2507-2513. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2507-2513.2000>
- 98 Кузьмініх СС, Іщенко ОВ, Стеценко ІЮ, Титов ПІ, Макаренко ОВ. Мікробіологічне обґрунтування застосування п-хлортаурину при вторинному перитоніті. *Вістник проблем біології і медицини.* 2021; 2 (160): 184-188. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2021-2-160-184-188>
- 99 Bornes R, Montero J, Correia A, Marques T, Rosa N. Peri-implant diseases diagnosis, prognosis and dental implant monitoring: a narrative review of novel strategies and clinical impact. *BMC Oral Health.* 2023; 23 (1): 183. <https://doi.org/10.1186/s12903-023-02896-1>.
- 100 Lu H, Zou P, Zhang Y, Zhang Q, Chen Z, Chen F. The sampling strategy of oral microbiome (protocol). *iMETA.* 2022; 1 (2): e23. <https://doi.org/10.1002/imt2.23>
- 101 Hussein H. Oral Sampling Techniques. *Methods Mol Biol.* 2021;2327:17-29. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1518-82>
- 102 Monsen T, Lövgren E, Widerström M, Wallinder L. In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J Clin Microbiol.* 2009; 47 (8): 2496-2501. <https://doi.org/10.1128/JCM.02316-08>
- 103 Cornaglia G, Courcol R, Herrmann J-L, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Vila J. *ESCMID: European manual of clinical microbiology.* 1-st ed. 2012. 472 p
- 104 Claesson R, Johansson A, Belibasakis GN. Clinical laboratory diagnostics in dentistry: Application of microbiological methods. *Front Oral Health.* 2022; 3: 983991. <https://doi.org/10.3389/froh.2022.983991>.
- 105 Tanner AC. Anaerobic culture to detect periodontal and caries pathogens. *J Oral Biosci.* 2015; 57 (1): 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.job.2014.08.001>.

- 106 Maduka-Ezeh A, Seville MT, Kusne S, et al. Thymidine auxotrophic *Staphylococcus aureus* small-colony variant endocarditis and left ventricular assist device infection. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (3): 1102-1105. <https://doi.org/10.1128/JCM.01170-1>
- 107 Rodríguez-Arce I, Martí S, Euba B, et al. Inactivation of the Thymidylate Synthase *thyA* in Non-typeable *Haemophilus influenzae* Modulates Antibiotic Resistance and Has a Strong Impact on Its Interplay with the Host Airways. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017; 7: 266 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00266>
- 108 Coenye T, Goeres D, Van Bambeke F, Bjarnsholt T. Should standardized susceptibility testing for microbial biofilms be introduced in clinical practice?. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24 (6): 570-572. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.003>
- 109 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0 [Internet]. 2023 [cited 2023 Nov 15]. Available from: <http://www.eucast.org>
- 110 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Intrinsic resistance and unusual phenotypes. Expert rules. Version 3.3 [Internet]. 2021. [cited 2023 Nov 15]. Available from: <http://www.eucast.org>
- 111 The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Guidance Documents [Internet]. [cited 2023 Nov 15]. Available from: <http://www.eucast.org>
- 112 Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18 (3): 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

- 113 EUCAST Subcommittee for Detection of Resistance Mechanisms. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0 [Internet]. 2013. [cited 2023 Nov 15]. Available from: <http://www.eucast.org>
- 114 Степанський ДО, Кременчуцький ГМ, Кошова ІІ. Доклінічне вивчення властивостей аутосимбіонтів людини *A. viridans*. Мед. перспективи. 2016; 21 (2): 87-93
- 115 Stepanskyi D, Koshova I, Khomiak O, Nefedov A. Study of autotymbiont aerococcus *viridans* adhesive properties on epithelial cells model. Modern Science – Moderní věda. 2017; 2: 129-33
- 116 Іщенко ОВ, Плотнікова ММ, Столетова ЮЮ, Шарун ОВ, Степанський ДО. Вплив різних концентрацій пектину на адгезивні властивості клінічних ізолятів, отриманих від хворих на муковісцидоз. Вістник проблем біології і медицини. 2020; 1 (155): 137-140. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2020-1-155-137-140>.
- 117 O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp. 2011; (47): 2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
- 118 Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007; 115 (8): 891-9. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
- 119 Coffey BM, Anderson GG. Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. In: Filloux A, Ramos JL, eds. *Pseudomonas Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. Humana, New York. 2014; 1149: 631-641. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0\\_48](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48)
- 120 Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID Study Group for Biofilms and Consulting External Expert



- Werner Zimmerli. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21(Suppl 1): S1-25. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>
- 121 Yu J, Zhou M, Zhang L, Wei H. Antibacterial Adhesion Strategy for Dental Titanium Implant Surfaces: From Mechanisms to Application. *J Funct Biomater.* 2022; 13 (4): 169. <https://doi.org/10.3390/jfb13040169>.
- 122 Jin M, Liu L, Wang DN, Yang D, Liu WL, Yin J et al. Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation. *The ISME journal.* 2020; 14 (7): 1847–1856. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0656-9>
- 123 Ata-Ali J, Ata-Ali F, Ata-Ali F. Do antibiotics decrease implant failure and postoperative infections? A systematic review and meta-analysis. *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 2014; 43(1): 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2013.05.019>
- 124 Рижов ОА, Пенкін ЮМ. Статистичні методи опрацювання результатів медично-біологічних досліджень. *Магнолія* 2006; 2022. 160 с.
- 125 О.В. Мулик, Т.Г. Пригалінська, Л.О. Свистун-Золотаренко. Біостатистика засобами MS Excel. Навчальний посібник. Київ 2023; 2023. 364 с.
- 126 D'Abramo F, Neumeyer S. A historical and political epistemology of microbes. *Centaurus.* 2020; 62 (2): 321-330. <https://doi.org/10.1111/1600-0498.12300>
- 127 van Hoogstraten SWG, Kuik C, Arts JJC, Cillero-Pastor B. Molecular imaging of bacterial biofilms-a systematic review. *Crit Rev Microbiol.* 2023; 1-22. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2023.2223704>
- 128 Dahlen G, Basic A, Bylund J. Importance of Virulence Factors for the Persistence of Oral Bacteria in the Inflamed Gingival Crevice and in the

- Pathogenesis of Periodontal Disease. *J Clin Med*. 2019; 8 (9): 1339.  
<https://doi.org/10.3390/jcm8091339>
- 129 Vilcant V, Hai O. Bacterial Endocarditis. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470547/>
- 130 Stepanskiy D, Krushinska T, Kremenchutsckyy G, Turlyun S, Koshevaya I, Val'chuk S, et al. Restoration of laboratory animal's normal microflora with induced dysbiosis. *Reports of Vinnytsia National Medical University*. 2018; 22 (2): 276-9. [https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2018-22\(2\)-08](https://doi.org/10.31393/reports-vnmedical-2018-22(2)-08)
- 131 Степанський ДО, Кременчуцький ГМ, Кошова ІП. Вивчення біологічної дії аутоштамів аерококів на моделях стафілокової інфекції. *Мед. перспективи*. 2017; 22 (2): 78-85.
- 132 Stepanskyi DO, Kremenchutskyi GM, Koshova IP. Experimental study action autostrains *Aerococcus viridans* on the model *Pseudomonas* infection. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017; 8 (3): 313-6. <https://doi.org/10.15421/021749>
- 133 Gutiérrez-Fernández J, Gámiz-Gámiz A, Navarro-Marí JM, Santos-Pérez JL. Genitourinary tract infection in children due to *Aerococcus* other than *Aerococcus viridans*. Literature review and 3 case reports. *Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed)*. 2021; 39 (3): 156-8. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.05.017>
- 134 Parrey AH, Sofi F, Ahmad M, Kuchay A. *Aerococcus viridans* infection presenting as cutaneous vasculitis in an immunocompetent patient. *Reumatologia*. 2016; 54 (6): 318-20. <https://doi.org/10.5114/reum.2016.64909>
- 135 Chen LY, Yu WC, Huang SH, Lin ML, Chen TL, Fung CP, et al. Successful treatment of *Aerococcus viridans* endocarditis in a patient

- allergic to penicillin. *J Microbiol Immunol Infect.* 2012; 45 (2): 158-60.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2011.09.010>
- 136 Varshini K, Ganesan V, Charles J. *Aerococcus viridans* Bacteremia: A Rare Case Report from India. *Indian J Crit Care Med.* 2022; 26 (1): 127-8.  
<https://doi.org/10.5005/jp-journals-10071-24072>
- 137 Zhou W, Nanci V, Jean A, Salehi AH, Altuwaijri F, Cecere R, et al. *Aerococcus viridans* native valve endocarditis. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2013; 24 (3): 155-8. <https://doi.org/10.1155/2013/470413>
- 138 Tesfa T, Mitiku H, Edae M, Assefa N. Prevalence and incidence of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* colonization: systematic review and meta-analysis. *Syst Rev.* 2022; 11 (1): 240. doi:10.1186/s13643-022-02110-3

## ДОДАТКИ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи



Дніпровського державного медичного  
університету

д. мед. н., професор Олександр ГУДАР'ЯН

«\_\_\_\_\_»

2023 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

#### Результатів наукових досліджень

1. Назва пропозиції: «Використання антисептиків ендogenous походження з метою корекції дисбіотичних порушень в ділянці стояння дентального імплантату».
2. Установа-розробник: Дніпровський державний медичний університет, вул. Вернадського, 9, Дніпро, 49044, Україна.
3. Розробник: Єфіменко Анастасія Олегівна.
4. Джерела інформації:
  1. Єфіменко А. О., Степанський О. Д., Богомольна Л. О., Кошова І. П., Іщенко О. В. Мікробіологічні особливості мікробіоценозу периімплантатної ділянки при ранніх та пізніх ускладненнях дентальної імплантації. Вісник проблем біології і медицини. 2023; № 1 (168): 291–300. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-1-168-291-300>.
  2. Efimenko A. O., Stepanskyi O. D., Bogomolny L. O., Ishchenko O. V. Effect of N-chlorotaurine on biofilms of pathogens associated with complications of dental implantation. Вісник проблем біології і медицини. 2023; № 2 (169): 432-437. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-2-169-432-437>.
5. Де впроваджено. Впроваджено в навчальний процес кафедри мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології та медико-біологічної фізики й інформатики Дніпровського державного медичного університету (протокол засідання кафедри № 2 від 20.09.2023р.).
6. Ефективність впровадження: застосування результатів наукових досліджень Єфіменко А. О. в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо сучасних методів впливу на мікробіоту, асоційовану з ускладненнями дентальної імплантації.  
Зауваження та пропозиції: немає.

Голова комісії:  
К.мед.н., доцент

Ірина КОШОВА

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної та лікувальної роботи закладу вищої освіти Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України,

Василь ПОГОРІЛИЙ  
«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

### Результатів наукових досліджень

1. Назва пропозиції: «Особливості мікробіологічного дослідження при інфекційно-запальних ускладненнях дентальної імплантації».
2. Установа-розробник: Дніпровський державний медичний університет, вул. Вернадського, 9, Дніпро, 49044, Україна.
3. Розробник: Єфіменко Анастасія Олегівна
4. Джерела інформації:
  1. Efimenko A., Ishchenko O., Stepanyki O., Stepanyki D. Microbiological features of Staphylococcus associated with complications of dental implantation. *Wiadomości Lekarskie Medical Advances*. 2023; 76 (5, p. 1): 936-943. <https://doi.10.36740/WLek202305107>.
  2. Єфіменко А. О., Степанський О. Д., Богомольна Л. О., Кошова І. П., Іщенко О. В. Мікробіологічні особливості мікробіоценозу периімплантатної ділянки при ранніх та пізніх ускладненнях дентальної імплантації. *Вісник проблем біології і медицини*. 2023; № 1 (168): 291–300. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-1-168-291-300>
  3. Єфіменко А. О., Іщенко О. В. Особливості мікробіологічних досліджень в стоматологічній практиці. *Перспективи та інновації науки (Серія «Медицина»)*. 2023; 14 (32): 969-986. [https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14\(32\)-969-986](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-14(32)-969-986)
  4. Efimenko A. O., Stepanyki O. D., Bogomolny L. O., Ishchenko O. V. Effect of N-chlorotaurine on biofilms of pathogens associated with complications of dental implantation. *Вісник проблем біології і медицини*. 2023; № 2 (169): 432-437. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-2-169-432-437>
5. Де впроваджено. Впроваджено в навчальний процес на практичних заняттях на кафедрі мікробіології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова (протокол засідання кафедри № 5 від 30 жовтня 2023 р.).
6. Ефективність впровадження: застосування результатів наукових досліджень Єфіменко А. О. в науково-педагогічному процесі дозволяє розширити знання студентів щодо сучасних аспектів мікробіологічної практики в контексті периімплантиту. Зауваження та пропозиції: немає.

Відповідальний за впровадження:  
к.мед.н., доцент ЗВО

Завідувач кафедри мікробіології ЗВО  
Вінницький національний медичний  
університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України,  
д.мед.н., професор

Ірина ВОВК

Валентин КОВАЛЬЧУК