

С.М. ПУХЛІК, А.П. ЩЕЛКУНОВ, О.А. ЩЕЛКУНОВ

РОЛЬ МІКРООРГАНІЗМІВ, ЩО УТВОРЮЮТЬ БІОПЛІВКИ, У ВИНИКНЕННІ ПАТОЛОГІЇ НОСА ТА ЛІМФО-ГЛОТКОВОГО КІЛЬЦЯ ТА ШЛЯХИ КОРЕКЦІЇ БІОЦЕНОЗУ

*Каф. оториноларингології (зав. – проф. С.М. Пухлік)
Одеського національного медичного університету
(ректор – академік НАМН України, проф. В.М. Запорожан)*

Стрімкий розвиток стійкості мікроорганізмів до антибіотиків є складною проблемою біології та медицини [1, 2]. Протягом останніх років усе більша увага приділяється вивченню механізмів і причин розвитку антибіотикорезистентності та шляхам її подолання [3]. Згідно з даними ВООЗ, результатами численних наукових досліджень, суттєво зростає значення умовно-патогенних мікроорганізмів у розвитку інфекційних ускладнень, що обумовлене високим ступенем їхньої стійкості до протимікробних препаратів.

Однією з причин формування хронічних запальних процесів, що рецидивують, є здатність бактерій утворювати біоплівку – складно організоване угруповання, що має місце як у навколишньому середовищі, так і в організмі людини [4].

Біоплівки є самоорганізованою сукупністю мікроорганізмів, фіксованих на поверхні та оточених самоутвореним екстрацелюлярним полімерним матриксом [5], що є формою співіснування мікроорганізмів на різних поверхнях, у тому числі і на різних органах [6]. Екзополісахаридний матрикс є основним компонентом біоплівки та становить 50-90 % її об'єму [7].

У природі форма існування мікроорганізмів у вигляді біоплівки більш поширена порівняно з планктонними формами – до 99 % усіх мікроорганізмів [8] та є предме-

том активного вивчення, починаючи з 1978 р., коли В. Costerton описав і в подальшому розвинув концепцію біоплівок як спільноту мікроорганізмів, що існує на поверхнях [9]. Це не просто сукупність мікроорганізмів та особлива форма їх співіснування, яка має особливий фенотип, експресію специфічних генів, що надають їм особливі якості – стійкість до факторів зовнішнього середовища, можливість уникати імунної відповіді макроорганізму, здатність до регуляції кількості бактерій та конкурентну перевагу над іншими мікроорганізмами [10].

Життєвий цикл біоплівки складається з 5 фаз: зворотня фіксація, незворотня фіксація, первинне дозрівання, вторинне дозрівання, вивільнення планктонних форм мікроорганізмів [11]. Під час початкового прикріплення планктонні бактерії контактують із субстратом і фіксуються, але ця фіксація оборотна. Наступна стадія утворення біоплівок підрозділяється на дві – стадія дозрівання 1, під час якої клітини втрачають рухливість, прикріплення стає незворотним, утворюються мікроколонії та шар біоплівки потовщується. На наступному етапі – стадія дозрівання 2 – утворюються кластери мікроколоній, що досягають максимальної густини. Через якийсь час після початку утворення біоплівки структура кластерів змінюється та починається остання стадія – процес дисперсії (розпаду), під час якого бакте-

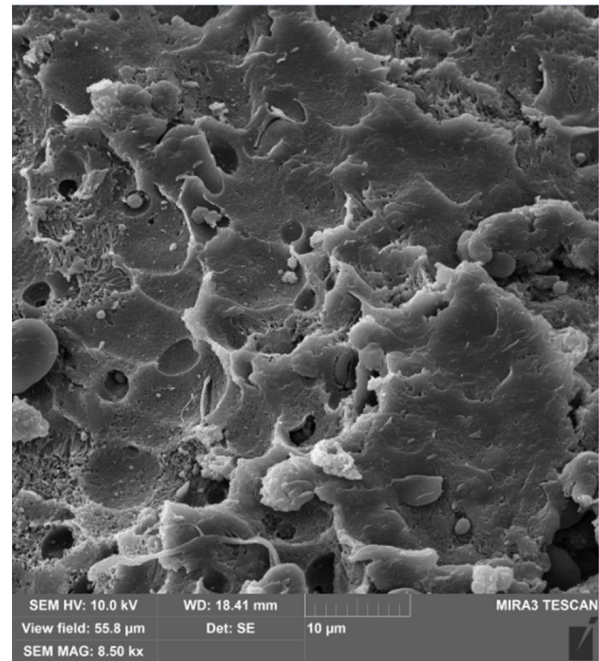
рії здатні активно залишати біоплівку. Розпад матриксу відбувається під впливом ферментів (наприклад, полісахаридаз), секретованих бактеріями та активації функції рухливості. Цикл розвитку біоплівки завершується тим, що бактерії випливають через відкриті канали та знову повертаються до планктонного способу життя.

На сьогоднішній день здатність мікроорганізмів до утворення біоплівок розглядається як один із факторів колонізації, патогенності та вірулентності патологічних мікроорганізмів [12]. Звичайно, така форма існування є характерною і для нормальної мікрофлори організму людини, зокрема в порожнині рота, кишечнику, що забезпечує можливість виконання нею основних функцій [13]. Проте для верхніх дихальних шляхів така форма існування не типова, адже респіраторний епітелій є добре вентильованою ділянкою, покритою слизом, одна з функцій якого – постійне очищення поверхні, що ускладнює першу фазу утворення біоплівки – фіксацію до поверхні [14].

Співіснування патогенної та умовно патогенної мікрофлори в такій формі створює умови для розвитку хронічного гнійного запального процесу [6], що підтверджено в численних дослідженнях наявності біоплівок за різної патології [15]. Така форма існування забезпечує вищу резистентність та толерантність до антибіотиків, ніж у планктонних форм [15, 16], знижуючи їх чутливість у 1000 разів [17]. Вважається, що утворення біоплівки є відповіддю бактерій на стресові умови існування та забезпечує виживання навіть клітин з низьким енергетичним рівнем [16]. Саме тому одним з важливих провокуючих факторів утворення біоплівки є вплив субінгібуючої концентрації антибіотиків в осередку інфекційного процесу [18].

Одними з найбільш поширених збудників, що утворюють біоплівки, є *St. aureus* та *St. epidermidis* [19], проте вони водночас є й одними з найбільш поширених мікроорганізмів, які висіваються з порожнини носа здорових осіб. *St. aureus* є одним з найбільш поширених умовно-патогенних мікроорганізмів, що персистують на аденоїдних вегетаціях [19, 20], причому біоплівки виявляються частіше у пацієнтів з метицилін-

резистентними штамами *St. aureus*. Поширеність цього мікроорганізму вище у дітей, старших семирічного віку, на відміну від більш молодших, для яких характерним є *Str. pneumoniae* [21]. Іншими комменсалами носоглотки, здатними до утворення біоплівок, є *H. influenzae* та *Str. pneumoniae* [22] і *M. catarrhalis* [23]. При цьому автори зазначають важливу роль факту коінфекції. Зміна умов існування біоплівок з боку хазяїна, наприклад у разі вірусної інфекції, призводить до вивільнення планктонних форм збудників та подальшого поширення мікроорганізмів і, як наслідок, до розвитку інфекційного процесу [24]. Високий ступінь здатності до утворення біоплівок має *Ps. aeruginosa* [25].



Глотковий мигдалик. Зріла біоплівка. Скануюча електронна мікроскопія допомогою растрового скануючого електронного мікроскопа Tescan Mira 3 LMU [28].

Оскільки 60-80 % усіх випадків хронічного інфекційного запалення пов'язують з утворенням біоплівок з патогенною мікрофлорою [26], це спонукає дослідників проводити активний пошук напрямів боротьби з ними. Один з напрямків подібний до онкологічних принципів – механічне видалення

та створення високих локальних концентрацій антибактерійних препаратів з тривалою експозицією [27].

Подальше вивчення механізмів формування біоплівки та її функцій відкриває нові можливості для лікування та профілактики цілого ряду захворювань. В даний час показано роль і значення мікробних біоплівок в етіології та патогенезі багатьох гострих і особливо хронічних бактеріальних інфекцій людини. Виходячи з опублікованих даних, частота інфекцій, зумовлених біоплівкою, становить 65-80%. Більше того, за деякими даними, понад 60% внутрішньолікарняних інфекцій пов'язані з мікроорганізмами, що перебувають у біоплівках. Видовий склад біоплівок у значній частині випадків представлений: *S. aureus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *E. coli*.

Прикладом статичного методу вивчення освіти біоплівок є культивування мікроорганізмів у 96-лункових пластикових планшетах. Суть методу полягає в наступному: суспензію бактерій вносять в лунки планшета і після інкубації в оптимальних умовах планктонна фаза популяції бактерій видаляється разом з живильним середовищем, а біоплівку, що утворилася, виявляють різними методами. Наприклад, до методів, які візуалізують структуру мікробних співтовариств і дозволяють ідентифікувати мікроорганізми у складі біоплівок, слід віднести електронну мікроскопію, метод флюоресцентної гібридизації *in situ*, метод визначення оптичної щільності ін. Найбільш простий із перерахованих є метод визначення оптичної щільності. Він і використовувався у наших дослідженнях. Але головна проблема полягає в тому, що лікування інфекцій, асоційованих з біоплівками, становить значні труднощі. Насамперед це стосується хронічних інфекцій. Підвищити ефективність лікування можна, мабуть, лише відмовившись від традиційної антибіотикотерапії. Пов'язано це з тим, що у складі біоплівок бактерії набувають якісно нових властивостей порівняно з мікроорганізмами у планктонній формі. Це стосується, насамперед, здатності біоплівкових бактерій захищатися від стресових впливів, включаючи стійкість до антибіотиків, дезінфектантів та

ефекторів (гуморальних та клітинних) імунної системи людини.

Біоплівки посіяти неможливо. Ми планували висівати мікрофлору для звичайного посіву для визначення мікроорганізму та його кількості, чутливості до антибіотиків. Потім лабораторія вивчає мікроорганізми на здатність утворювати біоплівки. Розсаджують мікроорганізми на лунковий планшет, культивують їх і визначають оптичну щільність початкову, і після нанесення в лунку речовини, що досліджується, в різних розведеннях.

Мета дослідження: Поліпшити якість лікування хворих, страждаючих на хронічну патологію носа та глотки, а саме хронічні синусити, хронічні захворювання піднебінних мигдаликів, глоткового мигдалика та язикового мигдалика, використовуючи дані кількісного та якісного визначення флори в осередку запалення та здатність даних мікроорганізмів утворювати біоплівки, здійснити пошук найбільш оптимальних препаратів, що подавляють біоплівкоутворюючу здатність мікроорганізмів.

Завдання дослідження

1. Відповідно посіву з осередку запалення провести кількісний аналіз патогенної флори та визначити можливість її утворювати біоплівки різної оптичної густини.

2. Визначити здатність деяких доступних фармацевтичних препаратів руйнувати біоплівки та впливати на мікрофлору, що бере участь у їх утворенні.

3. Оцінити можливість отриманих даних для застосування у практичній медицині.

Концепція роботи

Проведена нами робота була спрямована на пошук мікроорганізмів та визначення їх здатності утворювати біоплівки, шляхом аналізу даних кількісного посіву та посіву на біоплівки з пошуком та визначенням речовин, здатних руйнувати ці біоплівки. У роботі з біоплівками використовувався метод визначення оптичної щільності біоплівок і, відповідно, чим щільність вище – тим більша здатність мікроорганізмів до біоплівкоутворення. Потім на виявлені мікроорганізми, що знаходяться в біоплівці, нано-

сили випробувані речовини в різному розведенні та їх переважну здатність визначали знову по оптичній щільності біоплівки після впливу випробуваними речовинами. Потім проводили комплексну терапію хворих з різною патологією ЛОР-органів, у тому числі використовуючи препарати, що руйнують біоплівки. В подальшому до кожного пацієнта використовувався індивідуальний підхід, виходячи з даних посівів. Поруч із препаратами, руйнуючими біоплівки, також застосовувалися антибіотики, оптимально чутливі до мікроорганізму, що утворює біоплівку. Ці дані ми отримували, використовуючи звичайний посів. Оцінювався стан хворого після лікування, вираженість симптоматики та клінічних даних. Після лікування виконувались контрольні посіви та проводилося їх порівняння з первісними.

Препарати для дослідження ми вибирали довільно, тобто брали ті, які допустимі протоколами для застосування при лікуванні захворювань ЛОР-органів. Ми вибрали декілька, які досліджували на їхню можливість руйнувати біоплівки і, відповідно, в дослідженні знижувати оптичну щільність досліджуваного матеріалу. Якись із них ефективно знижували біоплівкоутворюючу здатність мікроорганізмів, тобто оптичну щільність у допустимих концентраціях. Якись знижували оптичну густину в концентраціях, неприпустимих для використання у людини (наприклад «Бетадин», який пригнічує біоплівкоутворюючу здатність в концентрації без розведення). Ще один важливий момент – для виключення попадання в посівний матеріал колійної флори та внесення сумніву в ці посіви на флору та чутливість ми вважаємо за необхідне брати біопсійний матеріал, тобто невеликий фрагмент слизової оболонки обстежуваного органу та дослідження його як мазка. Нами досліджено деяку кількість матеріалу, тобто фрагментів тканин отриманих під час оперативного втручання та при аналогічних ситуаціях при взятті посіву, тобто посів до операції та посів з біоптату дещо відрізнялися.

Ми зараз не готові порівняти найкращий спосіб забору матеріал-зіскоб, посів або біоптат. Але для даного методу визначення оптичної густини різниці немає ніякої. Для того, щоб виявити мікроорганізм,

визначити його кількість – тобто ступінь росту, та чутливість до антибіотиків (кількісний). Потім визначалася біоплівкоутворювальна здатність мікроорганізмів (якісний).

Нижче наведено приклади посівів на біоплівки (табл. 1-3), до і після впливу досліджуваними препаратами з визначенням їх оптичної щільності (табл. 4), які виконані у пацієнта А., 9 років; д-з: Аденоїди.

На початку нашої роботи ми досліджували лише здатність мікроорганізмів утворювати біоплівки. Вище представлений приклад обстеження. У пацієнтів бралися мазки з носа та зіву, у декількох пацієнтів (11 осіб) досліджувався біоптат, що зазначено у відповідній графі. Далі йде графа негативного контролю та обстежуваного зразка. В останній графі вказано цифри, з якими ми порівнюємо отриманий результат та виставляємо показники біоплівкоутворюючої здатності висіяних мікроорганізмів.

Приклад іншого подібного дослідження, яке проведено у пацієнта В., 11 років; д-з: Хронічний тонзиліт, наведено в табл. 5.

Кількість досліджених пацієнтів становила 56 осіб. Але у кожного з них було кілька мікроорганізмів, які досліджувалися. У лікуванні цих пацієнтів ми застосовували досліджувані препарати, стан всіх пацієнтів покращувався, але це тема для зовсім іншої роботи. У цій статті представлено лише дослідження біоплівкоутворювальної здатності мікроорганізмів та можливість застосування обраних препаратів у майбутньому. У цій статті ми показуємо, що можна підібрати препарат до кожного конкретного мікроорганізму у кожній конкретній людині.

Далі ми розпочали пошук препаратів, які зменшують оптичну щільність досліджуваного матеріалу і, відповідно, руйнують біоплівки. Ми запропонували низку доступних препаратів, які можна застосовувати на слизову оболонку порожнини носа і глотки. Препарати використовувалися як без розведення, так і у певному розведенні – і знову вимірювалася оптична густина досліджуваного матеріалу. Таким чином ми визначали той препарат, який найбільше впливає на біоплівкоутворювальну здатність мікроорганізмів і який можна застосовувати у конкретного хворого (табл. 6, 7).

Таблиця 1

Бактеріологічне дослідження назофарингеального зішкрибу з АБГ

Мікроорганізм	Результат
1 Enterobacteriaceae Норма: < 10 ⁴ КУО/тамп	не виявлено
2 Haemophilus influenzae Норма: не виявлено	не виявлено
3 Klebsiella pneumoniae Норма: не виявлено	не виявлено
4 Moraxella (Branhamella) catarrhalis Норма: не виявлено	не виявлено
5 Pseudomonas aeruginosa Норма: не виявлено	не виявлено
6 Staphylococcus aureus Норма: < 10 ² КУО/тамп	виявлено 1*10 ² КУО/тамп
7 Staphylococcus epidermidis Норма: < 10 ⁵ КУО/тамп	не виявлено
8 Staphylococcus saprophyticus Норма: < 10 ⁴ КУО/тамп	виявлено 7*10 ¹ КУО/тамп
9 Streptococcus - β-гемолітичний Норма: не виявлено	не виявлено
10 Streptococcus agalactiae	не виявлено
11 Streptococcus pneumoniae Норма: < 10 ² КУО/тамп	не виявлено
12 Streptococcus viridans group Норма: < 10 ³ КУО/тамп	виявлено 1*10 ³ КУО/тамп
13 Гриби роду Candida Норма: не виявлено	не виявлено

Таблиця 2

Чутливість культури *Staphylococcus aureus* до антимікробних препаратів

Антимікробний препарат	Чутливість
Іміпенем 10 мкг	S
Азитроміцин 15 мкг	R
Амоксицилін/клавуланова кислота 30/10 мкг	S
Ампіцилін 10 мкг	R
Ампіцилін/сульбактам 10/10 мкг	R
Амікацин 30 мкг	S
Ванкоміцин 30 мкг	S
Гатифлоксацин 5 мкг	S
Доксициклін 30 мкг	S

Продовження табл. 2

Чутливість культури *Staphylococcus aureus* до антимікробних препаратів

Антимікробний препарат	Чутливість
Еритроміцин 15 мкг	R
Кларитроміцин 15 мкг	S
Кліндаміцин 10 мкг	S
Левоміцетін 30 мкг	S
Левофлоксацин 5 мкг	S
Лінезолід 30 мкг	S
Оксацилін 1 мкг	S
Тетрациклін 30 мкг	S
Тобраміцин 10 мкг	R
Ципрофлоксацин 5 мкг	S

Таблиця 3

Чутливість культури *Streptococcus viridans group* до антимікробних препаратів

Антимікробний препарат	Чутливість
Іміпенем 10 мкг	S
Азитроміцин 15 мкг	S
Амоксицилін/клавуланова кислота 30/10 мкг	S
Ампіцилін 10 мкг	S
Ампіцилін/сульбактам 10/10 мкг	R
Амікацин 30 мкг	I
Ванкоміцин 30 мкг	S
Гатифлоксацин 5 мкг	S
Еритроміцин 15 мкг	S
Кларитроміцин 15 мкг	S
Кліндаміцин 10 мкг	S
Левоміцетін 30 мкг	S
Левофлоксацин 5 мкг	S
Лінезолід 30 мкг	S
Оксацилін 1 мкг	R
Тетрациклін 30 мкг	S
Тобраміцин 10 мкг	R
Ципрофлоксацин 5 мкг	I

Таблиця 4

Визначення ефективності біоплівкоутворення виділеними культурами мікроорганізмів
(метод культивування мікроорганізмів у статичних умовах)

Виділена культура: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Біоматеріал	Змив з зіву	Результат	Референтний інтервал
Оптична густина негативного контролю ODc	0,063	слабка	ODc ≤ ODd ≤ 2*ODc – немає/слабка
Оптична густина дослідного зразка ODd	0,086		2*ODc<ODd ≤ 4*ODc – помірна > 4*ODc - щільна
Біоматеріал	Змив з порожнини носа	помірна	ODc ≤ ODd ≤ 2*ODc – немає/слабка
Оптична густина негативного контролю ODc	0,063		2*ODc<ODd ≤ 4*ODc – помірна
Оптична густина дослідного зразка ODd	0,117		> 4*ODc – щільна
Виділена культура: <i>Klebsiella pneumoniae</i>			
Біоматеріал	Змив з зіву	Результат	Референтний інтервал
Оптична густина негативного контролю ODc	0,065	помірна	ODc ≤ ODd ≤ 2*ODc – немає/слабка
Оптична густина дослідного зразка ODd	0,148		2*ODc<ODd ≤ 4*ODc – помірна > 4*ODc – щільна
Біоматеріал	Змив з порожнини носа	помірна	ODc ≤ ODd ≤ 2*ODc – немає/слабка
Оптична густина негативного контролю ODc	0,065		2*ODc<ODd ≤ 4*ODc – помірна
Оптична густина дослідного зразка ODd	0,126		> 4*ODc – щільна

Таблиця 5

Визначення ефективності біоплівкоутворення виділеними культурами мікроорганізмів
з антагоністичним впливом препаратів (метод культивування мікроорганізмів
у статичних умовах)

Виділена культура: <i>Staphylococcus aureus</i>			
Біоматеріал	Змив з порожнини носа	Результат	Референтний інтервал
Оптична густина негативного контролю ODc	0,17	помірна	ODc ≤ ODd ≤ 2*ODc – немає/слабка 2*ODc<ODd ≤ 4*ODc – помірна > 4*ODc – щільна
Оптична густина дослідного зразка ODd	0,45		
Виділена культура: <i>Staphylococcus saprophyticus</i>			
Біоматеріал	Змив з порожнини носа	Результат	Референтний інтервал
Оптична густина негативного контролю ODc	0,16	Немає/слабка	ODc ≤ ODd ≤ 2*ODc – немає/слабка 2*ODc<ODd ≤ 4*ODc – помірна > 4*ODc – щільна
Оптична густина дослідного зразка ODd	0,30		
Виділена культура: <i>S. viridans</i>			
Біоматеріал	Змив з порожнини носа	Результат	Референтний інтервал
Оптична густина негативного контролю ODc	0,15	Немає/слабка	ODc ≤ ODd ≤ 2*ODc – немає/слабка 2*ODc<ODd ≤ 4*ODc – помірна > 4*ODc – щільна
Оптична густина дослідного зразка ODd	0,49		

Таблиця 6

Пригнічення біоплівкоутворення виділеної культури з порожнини носа:
Staphylococcus aureus

Найменування препаратів	Розведення препаратів				Референтний інтервал
	без розведення	1:10	1:20	1:40	
Повідон-йод, ODb	-	0,22 Пригнічує	0,28 Пригнічує	0,33 Пригнічує	2*ODb<ODd – пригнічує
Колоїдне срібло, ODb	0,30 Пригнічує	0,35 Не пригнічує	0,39 Не пригнічує	0,40 Не пригнічує	
Серратіопептидаза, ODb	0,29 Пригнічує	0,33 Пригнічує	0,39 Не пригнічує	0,45 Не пригнічує	2*ODb ≥ ODd – пригнічує
Пробіотичний препарат <i>Streptococcus salivarius</i> , ODb	0,25 Пригнічує	0,28 Пригнічує	0,33 Пригнічує	0,40 Не пригнічує	
Пробіотичний препарат <i>Bacillus coagulans</i> , ODb	0,32 Пригнічує	0,37 Не пригнічує	0,39 Не пригнічує	0,41 Не пригнічує	
Пробіотичний препарат <i>Bacillus megaterium</i> , ODb	0,28 Пригнічує	0,34 Не пригнічує	0,42 Не пригнічує	0,45 Не пригнічує	

Таблиця 6

Пригнічення біоплівкоутворення виділеної культури з зіву:
Streptococcus viridans

Найменування препаратів	Розведення препаратів				Референтний інтервал
	без розведення	1:10	1:20	1:40	
Лізоцим	0,33 Пригнічує	0,38 Не пригнічує	0,41 Не пригнічує	0,41 Не пригнічує	2*ODb<ODd – пригнічує
Біклотимол	0,32 Пригнічує	0,36 Не пригнічує	0,43 Не пригнічує	0,49 Не пригнічує	
Серратіопептидаза, ODb	0,30 Пригнічує	0,35 Не пригнічує	0,40 Не пригнічує	0,41 Не пригнічує	2*ODb ≥ ODd – пригнічує
Пробіотичний препарат <i>Streptococcus salivarius</i> , ODb	0,25 Пригнічує	0,30 Пригнічує	0,33 Пригнічує	0,39 Не пригнічує	
Пробіотичний препарат <i>Bacillus coagulans</i> , ODb	0,30 Пригнічує	0,34 Не пригнічує	0,40 Не пригнічує	0,43 Не пригнічує	
Пробіотичний препарат <i>Bacillus megaterium</i> , ODb	0,31 Пригнічує	0,33 Не пригнічує	0,39 Не пригнічує	0,4 Не пригнічує	

Нижче представлено узагальнюючу таблицю з мікроорганізмами, їх здатністю до біоплівкоутворення та здатністю певних препаратів до руйнування біоплівок (табл. 8). З даних, представлених в таблиці, видно, що найбільшу біоплівкоутворювальну здатність має *Staphylococcus aureus*. У порожнині носа відмічено 33 випадки біоплівкоутворення помірної оптичної щільності та 3 – високої. У 3 випадках біоплівки не утворюються. Найбільшою руйнівною здатністю

біоплівок володіють такі речовини: колоїдне срібло – у 27 випадках без розведення і у 6 випадках в розведенні 1:10; «Повідон-йод» – у 24 випадках, з них 17 у розведенні 1:10; 6 – у розведенні 1:20 та 1 випадок – у розведенні 1:40; пробіотичний препарат *Bacillus megaterium* – у 18 випадках без розведення, у розведенні 1:10 – у 9 випадках. У зіві в 33 випадках виявлено *Staphylococcus aureus*, з них у 12 випадках біоплівка не утворюється, у 15 випадках утворюється

біоплівка помірної щільності та у 6 випадках – високої щільності. Було досліджено такі лікарські речовини, які пригнічують біоплівкоутворювальну здатність: «Лізоцим» – в 21 випадку без розведення, «Біклотимол» – у 18 випадках без розведення і 9 – у розведенні 1:10; пробіотичний препарат *Streptococcus salivarius* – 24 випадки без розведення, пробіотичний препарат *Bacillus megaterium* – у 12 випадків без розведення.

Наступним за кількістю виявлених мікроорганізмів був *Streptococcus viridans*. У порожнині носа виявлено 4 випадки з низьким ступенем біоплівкоутворення, обстеження за чутливістю до медичних препаратів не проводились. У глотці – 54 випадки, з них у 12 біоплівки не утворювались, у 33 випадках були помірної щільності, у 6 – щільні. За чутливістю до препаратів бачимо такі результати: «Лізоцим» – 24 випадки без розведення, 3 – у розведенні 1:10; «Біклотимол» – 27 без розведення, 12 – у розведенні 1:10, 3 – у розведенні 1:20; пробіотичний препарат *Streptococcus salivarius* – 30 випадків без розведення, 15 випадків – в розведенні 1:10 та 9 – 1:20; *Bacillus coagulans* – 15 без розведення, 3 – у розведенні 1:10, 5 – в розведенні 1:20; пробіотичний препарат *Bacillus megaterium* – 21 випадок без розведення, 6 – у розведенні 1:10.

Решта мікроорганізмів висівалися в незначних кількостях. З них слід виділити найбільш патогенні мікроорганізми, такі як *Pseudomonas aeruginosa*, який висівався в порожнині носа в 3 випадках і утворював щільні біоплівки, чутливі тільки до колоїдного срібла та пробіотичного препарату

Streptococcus salivarius без розведення. Він же в зіві висівався в 4 випадках, утворюючи щільні біоплівки, і був не чутливий до жодного з досліджуваних препаратів. Також у 5 випадках висівався β -гемолітичний стрептокок, але біоплівки не утворював і, відповідно, чутливість до препаратів не визначалася.

Висновки

1. Метод визначення біоплівкоутворювальної здатності мікроорганізмів за оптичною щільністю матеріалу обов'язково потрібно дублювати кількісним посівом на флору та чутливість до антибіотиків для більшої достовірності отриманих даних та можливим застосуванням антибіотиків, відповідно до чутливості при лікуванні.

2. В результаті проведеного нами дослідження було виявлено мікроорганізми з найбільшою здатністю до біоплівкоутворення, а також підбрано спектр медичних препаратів, які доступні і є найбільш дієвими в пригніченні біоплівкоутворювальних здібностей мікроорганізмів, але бажано до кожного пацієнта підходити індивідуально.

3. Визначено низку препаратів, які ефективно руйнують біоплівки, особливо без розведень, але тільки повідон-йод («Бетадин») це робить навіть у значному розведенні (1:40).

4. Використовуючи отримані нами дані щодо препаратів, що пригнічують біоплівкоутворювальну здатність мікроорганізмів, ми вважаємо за необхідне продовження роботи та підтвердження на більшій кількості обстежуваних та пролікованих пацієнтів.

References

1. Haaber J, Leisner JJ, Cohn MT, Catalan-Moreno A, Nielsen JB, Westh H, et al. Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nat Commun*. 2016 Nov 7;7:13333. doi: 10.1038/ncomms13333.
2. Belbase A, Pant ND, Nepal K, Bibhusan Neupane B, Baidhya R, Baidya R, Lekhak B. Antibiotic resistance and biofilm production among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017 Mar 23;16(1):15. doi: 10.1186/s12941-017-0194-0.
3. Melnikov OF, Zabolotna DD, Zabolotny DI. Immunodiagnostics, immunotherapy and immunoprophylaxis in the clinic of otolaryngology. Message 1. Optimal indicators of systemic immunity in assessing the clinical and laboratory status of patients with inflammatory diseases of the upper respiratory tract (analytical generalization). *Otorhinolaryngology*. 2019;2(6):4-11. doi:

- 10.37219/2528-8253-2019-6-04. [Article in Ukrainian].
4. Gloag ES, German GK, Stoodley P, Wozniak DJ. Viscoelastic properties of *Pseudomonas aeruginosa* variant biofilms. *Sci Rep*. 2018 Jun 26;8(1):9691. doi: 10.1038/s41598-018-28009-5.
5. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34(5):877-86. doi: 10.1007/s10096-015-2323-z
6. Bidossi A, De Grandi R, Toscano M, Bottagisio M, De Vecchi E, Gelardi M, Drago L. Probiotics *Streptococcus salivarius* 24SMB and *Streptococcus oralis* 89a interfere with biofilm formation of pathogens of the upper respiratory tract. *BMC Infect Dis*. 2018 Dec 13;18(1):653. doi: 10.1186/s12879-018-3576-9.
7. Vasudevan R. Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. *J Microbiol Exp*. 2014;1(3):84-98. doi: 10.15406/jmen.2014.01.00014.
8. Moo-Young M, editor. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*. Academic Press; 2011. Chapter 1.41 – Biofilms; p. 547-558. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00064-7>.
9. Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, Mark Pasmore M, Post C, Ehrlich G The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003 Nov;112(10):1466-77. doi: 10.1172/JCI20365.
10. Kryvtsova MV. Antimicrobial and antibiofilm-forming effect of substances of plant origin upon opportunistic microorganisms of the oral cavity [dissertation]. Kyiv: O.O. Bohomolets National Medical University; 2021. 45 p.
11. Srivastava S, Bhargava A. Biofilms and human health. *Biotechnol Lett*. 2016 Jan;38(1):1-22. doi: 10.1007/s10529-015-1960-8.
12. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(12):740-55. doi: 10.1038/nrmicro.2017.99
13. Mladina R, Skitarelić N, Musić S, Ristić M. A biofilm exists on healthy mucosa of the paranasal sinuses: a prospectively performed, blinded, scanning electron microscope study. *Clin Otolaryngol*. 2010;35(2):104-10. doi: 10.1111/j.1749-4486.2010.02097.x
14. Subtil J, Bajanca-Lavado MP, Rodrigues JC, Duarte A, Reis L, Nogueira I, Jordao L. Prospective observational study of adenoidal biofilms in a paediatric population and their clinical implications. *Otolaryngol Pol*. 2018 Oct 1;73(1):1-5. doi: 10.5604/01.3001.0012.5278.
15. Bayazian G, Sayyahfar S, Safdarian M, Kalantari F. Is there any association between adenoid biofilm and upper airway infections in pediatric patients? *Turk Pediatri Ars*. 2018;53(2):71-7. doi: 10.5152/TurkPediatriArs.2018.6151.
16. Franca A, Carvalhais V, Vilanova M, Pier GB, Cerca N. Characterization of an in vitro fed-batch model to obtain cells released from *S. epidermidis* biofilms. *AMB Express*. 2016 Mar;6(1):23. doi: 10.1186/s13568-016-0197-9.
17. Imchen M, Anju VT, Busi S, Mohan MS, Subhaswaraj P, Dyavaiah M, Kumavath R. Metagenomic insights into taxonomic, functional diversity and inhibitors of microbial biofilms. *Microbiol Res*. 2022;265:127207. doi: 10.1016/j.micres.2022.127207.
18. Mlynek KD, Callahan MT, Shimkevitch AV, Farmer JT, Endres JL, Marchand M, et al. Effects of LowDose Amoxicillin on *Staphylococcus aureus* USA300 Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60 (5):2639-51. doi: 10.1128/AAC.02070-15.
19. Lin C-D, Tsai M-H, Lin C-W, Ho M-W, Wang C-Y, Tsou Y-A, et al. Association of adenoid hyperplasia and bacterial biofilm formation in children with adenoiditis in Taiwan. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2012 Feb;269(2):503-11. doi: 10.1007/s00405-011-1704-x.
20. Torretta S, Drago L, Marchisio P, Gaffuri M, Clemente IA, Pignataro L. Topographic distribution of biofilm-producing bacteria in adenoid sub-sites of children with chronic or recurrent middle ear infections. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2013; 122(2):109-13. doi: 10.1177/000348941312200206.
21. Ungkanont K, Jootakarn S, Leelaporn A, Kijsinthopchai U, Tanphaichitr A, Vathanophas V, Komoltri C. Association between adenoid bacteriology and clinical characteristics of adenoid-related diseases in children. *SAGE Open Med*. 2021 Apr 2;9:20503121211006005. doi: 10.1177/20503121211006005.
22. Hamilos DL. Biofilm Formations in Pediatric Respiratory Tract Infection Part 2: Mucosal Biofilm Formation by Respiratory Pathogens and Current and Future Therapeutic Strategies to Inhibit Biofilm Formation or Eradicate Established Biofilm. *Curr Infect Dis Rep*. 2019 Mar 2;21(2):8. doi: 10.1007/s11908-019-0657-x.
23. Nistico L, Kreft R, Gieseke A, Cotichia JM, Burrows A, Khampang P, et al. Adenoid Reservoir for Pathogenic Biofilm. *J Clin Microbiol*. 2011 Apr; 49(4):1411-20. doi: 10.1128/JCM.00756-10.
24. Schilcher K, Horswill AR. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2020 Aug 12;84(3):e00026-19. doi: 10.1128/MMBR.00026-19.
25. Hamilos DL. Biofilm Formations in Pediatric Respiratory Tract Infection Part 2: Mucosal Biofilm Formation by Respiratory Pathogens and Current and Future Therapeutic Strategies to Inhibit Biofilm Formation or Eradicate Established Bio-

- film. Curr Infect Dis Rep. 2019 Mar 2;21(2):8. doi: 10.1007/s11908-019-0657-x.
26. Iovino F, ed. Streptococcus pneumoniae. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Humana Press; 2019. Chao Y, Bergenfelz C, Hakansson AP. Growing and Characterizing Biofilms Formed by Streptococcus pneumoniae; p. 147-71. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9199-0_13
27. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. Nat Rev Microbiol. 2017;15(12):740-55. doi: 10.1038/nrmicro.2017.99
28. Lyakh KV, Lugovsky SP, Kosakovsky AL, Shkorbotun YV, Skoryk MA. [Clinico-morphological characteristics and evaluation of tubular rolls in children with hypertrophy of the pharyngeal tonsil]. Clinical and preventive medicine. 2023;(8):6-14. <https://doi.org/10.31612/2616-4868.8.2023.01>. [Article in Ukrainian].

Надійшла до редакції 26.06.2024

© С.М. Пухлік, А.П. Щелкунов, О.А. Щелкунов, 2024

РОЛЬ МІКРООРГАНІЗМІВ, УТВОРЮЮЧИХ БІОПЛІВКИ, У ВИНИКНЕННІ ПАТОЛОГІЇ НОСА ТА ЛІМФО-ГЛОТКОВОГО КІЛЬЦЯ ТА ШЛЯХИ КОРЕКЦІЇ БІОЦЕНОЗУ

Пухлік СМ, Щелкунов АП, Щелкунов ОА
Одеський національний медичний університет
Email: lor@te.net.ua

А н о т а ц і я

Актуальність: Однією з причин формування хронічних рецидивуючих запальних процесів є здатність бактерій утворювати біоплівку – складно організоване угруповання, що має місце як у навколишньому середовищі, так і в організмі людини. Співіснування патогенної та умовно патогенної мікрофлори в формі біоплівки створює умови для розвитку хронічного гнійного запального процесу. Така форма існування забезпечує вищу резистентність та толерантність до антибіотиків, ніж у планктонних форм, знижуючи їх чутливість у 1000 разів.

Метою дослідження є поліпшити якість лікування хворих, страждаючих на хронічну патологію носа та лімфоглоточного кільця, використовуючи дані кількісного та якісного визначення флори в осередку запалення та здатність даних мікроорганізмів утворювати біоплівки, здійснити пошук найбільш оптимальних препаратів, що руйнують біоплівки.

Концепція роботи

У роботі з біоплівками використовувався метод визначення оптичної щільності біоплівки і, відповідно, чим щільність вище тим більша здатність мікроорганізмів до біоплівкоутворення. Потім на виявлені мікроорганізми, що знаходяться в біоплівці, наносили випробувані речовини в різному розведенні, їх переважну здатність визначали знову по оптичній щільності біоплівки після впливу випробуваними речовинами, потім проводили лікування досліджуваними препаратами.

Було обстежено 56 осіб з різною патологією ЛОР-органів. Отримані результати показали, що найбільшу біоплівкоутворювальну здатність має *Staphylococcus aureus*. При дослідженні біоматеріалу з порожнини носа відмічено 33 випадки біоплівкоутворення помірної оптичної щільності та 3 – високої. У 3 випадках біоплівки не утворювались. Показано, що найбільшою здатністю до руйнування біоплівок мають такі речовини – колоїдне срібло у 27 випадках без розведення і у 6 випадках – в розведенні 1:10; «Повідон-йод» – у 24 випадках, з них 17 – у розведенні 1:10, 6 – у розведенні 1:20 та 1 випадок – у розведенні 1:40; пробіотичний препарат *Bacillus megaterium* – у 18 випадках, у розведенні 1:10 – у 9 випадках. При дослідженні біоматеріалу з глотки в 33 випадках виявлено *Staphylococcus aureus*, з них у 12 випадках біоплівка не утворювалась, у 15 випадках виявлено біоплівку помірної щільності, у 6 – високої щільності. Було досліджено такі лікарські речовини, які пригнічують біоплівкоутворювальну здатність: «Лізоцим» – в 21 випадку без розведення, «Біклотимол» – у 18 випадках без розведення і 9 – у розведенні 1:10; пробіотичний препарат *Streptococcus salivarius* – у 24 випадках без розведення; пробіотичний препарат *Bacillus megaterium* – у 12 випадках без розведення.

Наступним за кількістю виявлення був *Streptococcus viridans*. У порожнині носа виявлено 4 випадки з низьким ступенем біоплівкоутворення, обстеження за чутливістю до медичних препаратів не проводились. У глотці виявлено 54 випадки, з них у 12 біоплівки не утворювались, у 33 випадках біоплівки були помірної щільності, у 6 – щільні. За чутливістю до препаратів розподіл був таким: «Лізоцим» – 24 випадки без розведення, 3 – у розведенні 1:10; «Біклотимол» – 27 без розведення, 12 – у розведенні 1:10, 3 – у розведенні 1:20; пробіотичний препарат *Streptococcus salivarius* – 30 випадків без розведення, 15 випадків в розведенні 1:10 та 9 – 1:20; *Coagulans* – 15 без розведення, 3 – у розведенні 1:10, 5 – в розведенні 1:20; пробіотичний препарат *Bacillus megaterium* – у 21 випадку без розведення, в 6 – у розведенні 1:10. Решта мікроорганізмів висівалися в незначних кількостях.

Висновки

1. Метод визначення біоплівкоутворювальної здатності мікроорганізмів за оптичною щільністю матеріалу обов'язково потрібно дублювати кількісним посівом на флору та чутливість до антибіотиків для більшої достовірності отриманих даних та можливим застосуванням антибіотиків, відповідно до чутливості при лікуванні.

2. В результаті проведеного нами дослідження було виявлено мікроорганізми з найбільшою здатністю до біоплівкоутворення, а також підібрано спектр медичних препаратів, які доступні і є найбільш дієвими в пригніченні біоплівкоутворювальних здібностей мікроорганізмів, але бажано до кожного пацієнта підходити індивідуально.

3. Визначено низку препаратів, які ефективно руйнують біоплівки, особливо без розведень, але тільки повідон-йод («Бетадин») це робить навіть у значному розведенні (1:40).

4. Використовуючи отримані нами дані щодо препаратів, що пригнічують біоплівкоутворювальну здатність мікроорганізмів, ми вважаємо за необхідне продовження роботи та підтвердження на більшій кількості обстежуваних та пролікованих пацієнтів.

Ключові слова: мікроорганізми, запальні захворювання носа та глотки, біоплівки, лікарські засоби, що руйнують біоплівки, біль в глотці.

THE ROLE OF MICROORGANISMS THAT ARE FORMING BIOFILMS IN THE DEVELOPMENT OF NOSE PATHOLOGY AND LYPHOPHARYNGEAL RING PATHOLOGY AND WAYS OF CORRECTING THE BIOCECENOSIS

Pukhlik SM, Shchelkunov AP, Shchelkunov OA

Odessa National Medical University

Email: lor@te.net.ua

Abstract

Topicality: One of the reasons of chronic recurrent inflammatory processes is the ability of bacteria to form a biofilm – a complex grouping that occurs both in the environment and in the human body. The coexistence of pathogenic and conditionally pathogenic microflora in the form of a biofilm creates conditions for the development of a chronic purulent inflammatory process. This form of existence provides a higher resistance and tolerance to antibiotics than planktonic forms, reducing their sensitivity by 1000 times.

The purpose of the study is to improve the quality of treatment of patients suffering from chronic pathology of the nose and lymphopharyngeal ring, using data from the quantitative and qualitative determination of flora in the centre of inflammation and the ability of these microorganisms to form biofilms, to search for the most optimal drugs that destroy biofilms.

Concept of work

In the work with biofilms, the method of determining the optical density of the biofilm was used and, accordingly, the higher the density, the greater the ability of microorganisms to form biofilms. Then, the tested substances were applied in different dilutions to the identified microorganisms in the biofilm, and their predominant ability was determined again by the optical density of the biofilm after exposure to the tested substances, and treatment was carried out with the studied drugs.

56 people with various pathologies of the ENT organs were examined. We can see that *St. Aureus* has the greatest biofilm-forming ability. In the nose, 33 cases of biofilm formation of moderate optical density and 3 cases of high optical density were noted. In 3 cases, biofilms are not formed. The substances with the greatest destructive ability of biofilms are colloidal silver in 27 cases without dilution and in 6 cases in 1:10 dilution, Povidone-iodine in 24 cases, of which 17 in 1:10 dilution, 6 in 1:20 dilution and 1 case in 1:40 dilution; probiotic drug *Bacillus megaterium* - in 18 cases, in 1:10 dilution in 9 cases. In the throat, 33 cases of detection of *St. Aureus*, of which no biofilm is formed in 12 cases, moderate density is formed in 15 cases, and high density in 6 cases. Me-

dicinal substances under study that suppress biofilm-forming ability are the following - Lysozyme – 21 without dilution, Biclotymolum 18 without dilution and 9 in a 1:10 dilution, probiotic drug *Streptococcus salivarius* 24 cases without dilution, probiotic drug *Bacillus megaterium* in 12 cases without breeding.

Streptococcus viridans is the next in number of detected microorganisms. In the nose, 4 cases with a low degree of biofilm formation were found, the examination for sensitivity to medical drugs was not carried out. In the pharynx – 54 cases, of which biofilms are not formed in 12 cases, in 33 cases they are moderate, in 6 cases they are dense. In terms of sensitivity to drugs, we can see the following – Lysozyme 24 without dilution, 3 in a 1:10 dilution; Biclotymolum 27 without dilution, 12 in 1:10 dilution, 3 in 1:20 dilution; probiotic preparation *Streptococcus salivarius* 30 cases without dilution, 15 cases in dilution 1:10 and 9 – 1:20; *Coagulans* – 15 without dilution, 3 in 1:10 dilution, 5 in 1:20 dilution; probiotic drug *Bacillus megaterium* in 21 cases without dilution, 6 in 1:10 dilution. The remaining microorganisms were seeded in small quantities.

Conclusions

1. The method of determining the biofilm-forming ability of microorganisms based on the optical density of the material must be duplicated by quantitative sowing of flora and sensitivity to antibiotics for greater reliability of the data obtained and the possible use of antibiotics, according to the sensitivity during treatment.

2. As a result of our research, microorganisms with the greatest ability to form biofilms were identified, as well as a selected range of medical drugs that are available and most effective in suppressing the biofilm-forming abilities of microorganisms, but it is desirable to approach each patient individually.

3. A number of drugs have been identified that effectively destroy biofilms, especially without dilutions, but only Povidone-iodine does this even at a significant dilution (1:40).

4. Using the data we received regarding drugs that suppress the biofilm-forming ability of microorganisms, we consider it necessary to continue the work and confirm it on a larger number of examined and treated patients.

Key words: microorganisms, inflammatory diseases of the nose and pharynx, biofilms, drugs that destroy biofilms, pain in the pharynx.