

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Смоленский государственный медицинский
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Эффективность применения препарата БактоБЛИС для профилактики заболеваний слизистой оболочки рта

Ковалева Анна Юрьевна студентка 4 курса 402 группы
Эйдельштейн Инна Александровна руководитель лаборатории
молекулярной диагностики НИИ Антибактериальной химиотерапии
Ковалева Наталья Сергеевна ассистент кафедры стоматологии
факультета ДПО

Заболевания полости рта

- Многие заболевания полости рта связаны с дисбалансом микробиоты ротовой полости.
- При нарушении баланса микрофлоры полости рта – риск развития кариеса, пародонтоза и кандидоза.
- Для профилактики этих заболеваний важно сохранять здоровую микробиоту полости рта

Наиболее значимым патогеном полости рта является *Streptococcus pyogenes*, которой и был выбран мною для исследования



В настоящее время микробиота ротовой полости активно изучается, для этого была создана Human oral micribiom database (база данных микробиома ротовой полости), в которой содержится информация о 700 родах прокариот, населяющих ротовую полость



Результатом анализа базы данных явилось пристальное внимание к такому микроорганизму как *Streptococcus salivarius K12*

Streptococcus salivarius K12

Обычно применяемые кишечные пробиотики (лактобактерии и бифидобактерии) **не персистируют** в полости рта и находятся там **транзиторно**. Поэтому они не оказывают никакого действия на микрофлору полости рта



Streptococcus salivarius K12

С этой точки зрения применение *S. salivarius* K12 более обосновано. *Streptococcus salivarius* – это микроорганизм, который одним из первых колонизирует полость рта человека и сохраняется там в качестве доминирующего представителя нормальной микрофлоры ротовой полости на протяжении всей жизни



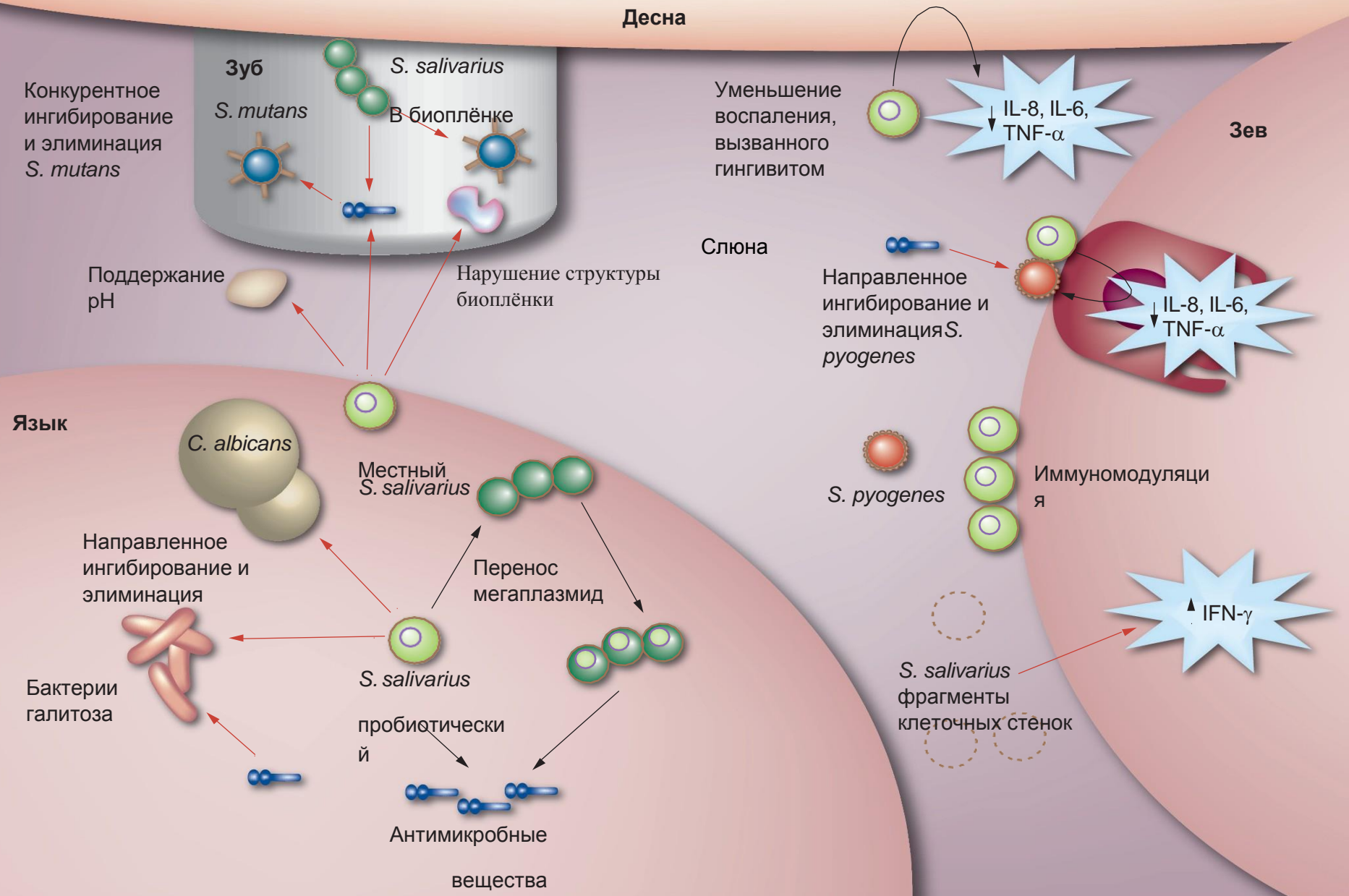
Streptococcus salivarius K12

- Штамм ssk12 вырабатывает саливарцины А и В, которые обладают ингибирующим действием по отношению к *S. pyogenes*.
- Применение *S. salivarius* K12 может рассматриваться также как эффективная мера профилактики развития кандидоза полости рта, в первую очередь после курса антибактериальной терапии.
- SsK12 способен ингибировать рост бактерий, ответственных за возникновение неприятного запаха изо рта (галитоз)



Предполагаемые области применения / нозологические формы	Антибактериальные вещества	Безопасность	Эффективность
<p>Здоровье полости рта</p> <p>Галитоз</p> <p>Острый средний отит Стрептококковый тонзиллофарингит</p> <p>Кандидоз полости рта</p> <p>Противовоспалительные эффекты в профилактике и лечении ИВДП (инфекции верхних дыхательных путей)</p>	<p>Саливарцин А Саливарцин В</p>	<p>Клинические исследования с использованием высоких доз</p> <p>Отсутствие генов вирулентности стрептококка</p> <p>Отсутствие детерминант антибиотикорезистентности</p> <p>Чувствительность к Антибиотикам</p> <p>Низкая мутагенность</p>	<p>Клинические данные:</p> <p>Исследования колонизации у человека Небольшие клинические исследования Острый средний отит Рецидивирующий тонзиллит</p> <p>Галитоз</p> <p>Определение бактериоцинов в полости рта человека Повышенные уровни γ-интерферона в слюне</p> <p><i>In vitro:</i></p> <p>Противовоспалительные эффекты снижающие выраженность воспаления, вызванного различными патогенными Бактериями</p> <p>Исследования активности против <i>Candida</i> Хорошая адгезия к эпителиальным клеткам линий FaDu и HEp-2</p> <p>Ингибирование многих патогенных бактерий, включая <i>S. pneumoniae</i>, <i>M. catarrhalis</i> и <i>S. pyogenes</i></p> <p>Исследования активности против <i>S. pyogenes</i></p>

Схема действия Streptococcus salivarius K12



БактоБЛИС

- На основе этого уникального микроорганизма был создан препарат BactoBLIS (Bacteriocin-like inhibitory substance)
- Во всех странах пробиотик, содержащий штамм *Streptococcus salivarius* K12, продается под разными названиями. В России он известен под названием БактоБЛИС.
- В таблетке содержится не менее 1 млрд КОЕ *Streptococcus salivarius* K12



Цель работы:

- Оценить эффект действия БактоБЛИСа (*Streptococcus salivarius* K12) на примере *Streptococcus pyogenes*;
- Сравнить эффективность применения оросептиков в сравнении с БактоБЛИС микробиологическим методом;
- Дать рекомендации в применении БактоБЛИСа

Материалы:

- Штаммы: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615,
- *Haemophilus influenza* ATCC 49247,
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619,
- *Streptococcus salivarius* клинический штамм;
- *Streptococcus salivarius* Ss K12
- Таблетки БактоБЛИС;
- Пробирки с физиологическим раствором;
- Стандарт по McFarland 0,5
- Оросептики: мирамистин, Listerin и Glister

Методы:

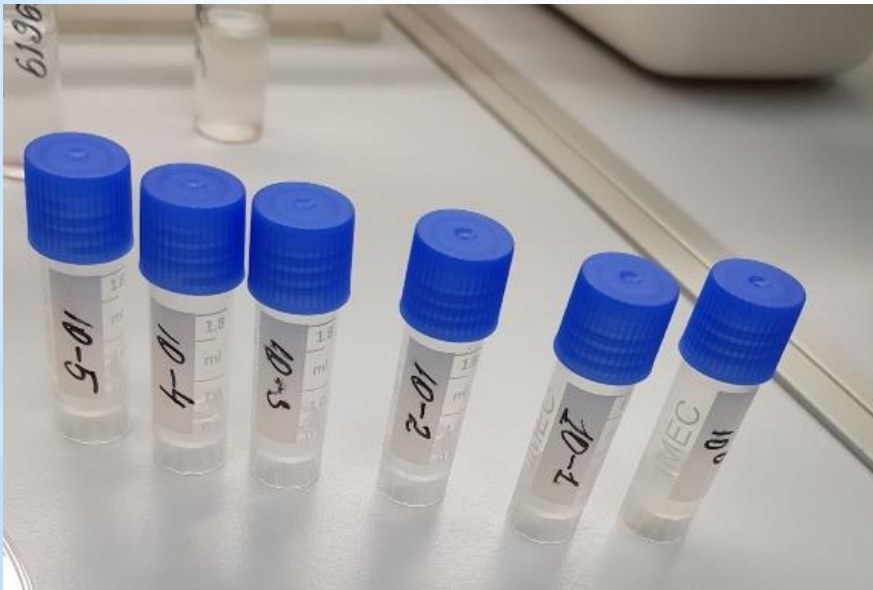
- Метод серийных разведений исследуемого препарата БактоБЛИС
- Выделение чистой культуры Ss K12 из БактоБЛИС и идентификация ее методом MALDI-TOF MS (Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролётной масс-спектрометрией)
- Исследование бактерицидных свойств Ss K12
- Определение чувствительности микроорганизмов к бактериоцинам *Streptococcus salivarius* K12 и антисептикам, входящих в состав ополаскивателей;
- Изучение литературных источников и их анализ

Исследование бактерицидных свойств SsK12

Для оценки приемлемой инокулирующей концентрации было приготовлено 5 разведений.

1 таблетка 10^9 КОЕ - 5 мл физ. раствора 2×10^8 КОЕ/мл.

Делаем серию разведений для оценки применяемой нагрузки

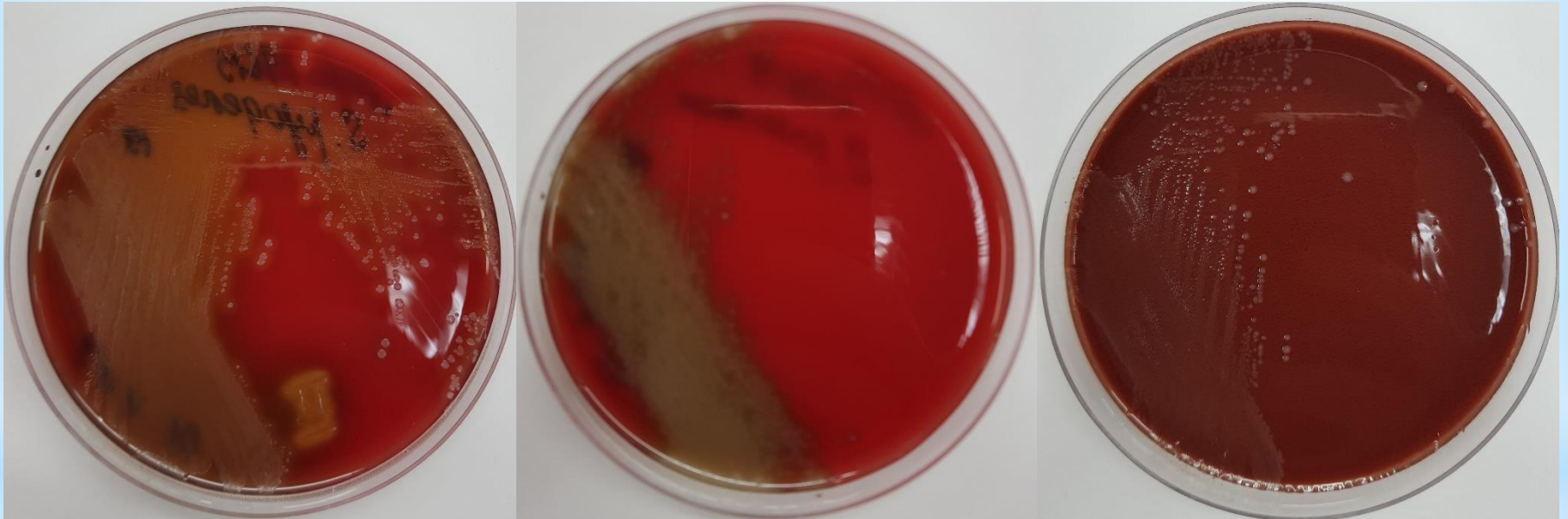


Получаем нагрузку в 50 мкл:

- в $10^0 - 10^7$ КОЕ
- в $10^{-1} - 10^6$ КОЕ
- в $10^{-2} - 10^5$ КОЕ
- в $10^{-3} - 10^4$ КОЕ
- в $10^{-4} - 10^3$ КОЕ
- в $10^{-5} - 10^2$ КОЕ

Исследование бактерицидных свойств SsK12

Для исследования были взяты *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pyogenes* в связи с тем, что они являются классическими комменсалами ротовой полости.



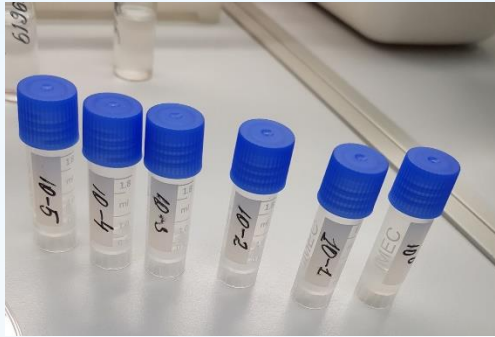
Streptococcus pyogenes
ATCC 19615

Streptococcus pneumoniae
ATCC 49619

Haemophilus influenzae
ATCC 49247

Исследование бактерицидных свойств SsK12

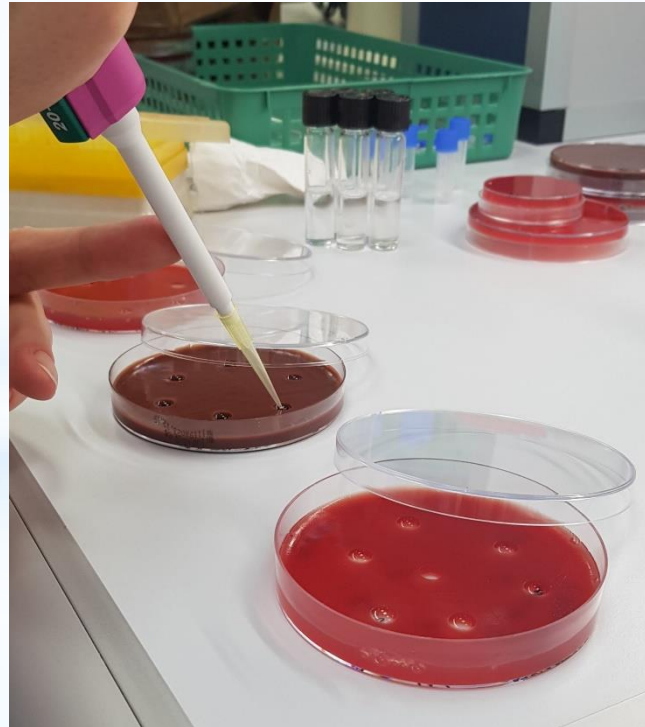
1 день:
приготовление
разведений
препарата



1 день:
посев музейных
культур газоном



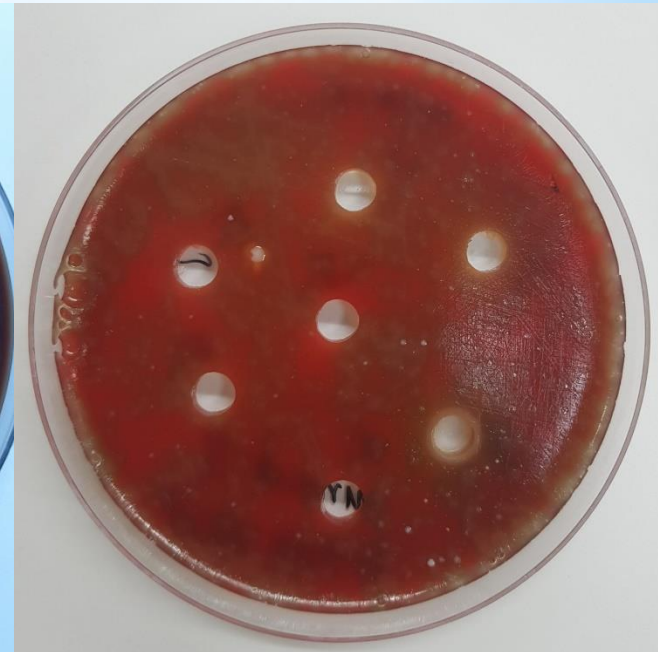
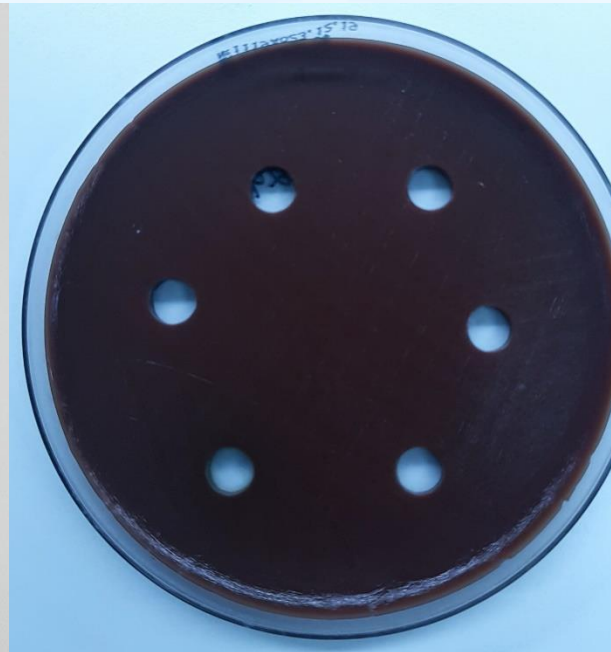
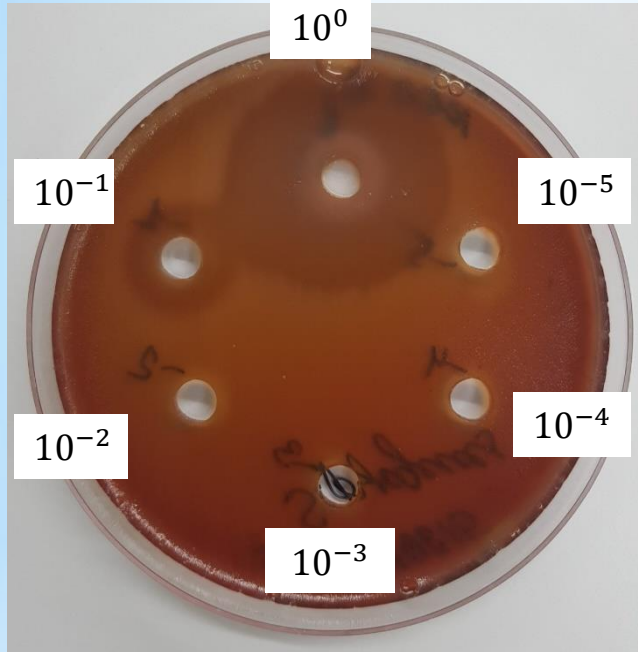
2 день
анализ
полученных
результатов



1 день:
Внесение в лунки
разных
разведений
препарата



Результаты



Streptococcus pyogenes
ATCC 19615

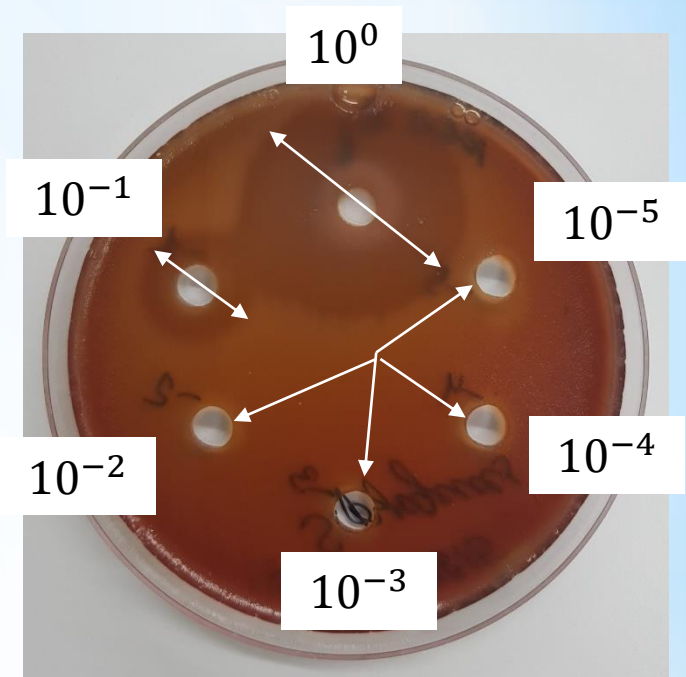
Haemophilus influenzae
ATCC 49247

Streptococcus pneumoniae
ATCC 49619

Для дальнейшего исследования был выбран *Streptococcus pyogenes*, так как *Streptococcus salivarius* K12 проявляет хороший антогонистический эффект в отношении данного микроорганизма

Результаты

- Исследуемый в данном опыте пробиотик активно подавляет *Streptococcus pyogenes*, что можно заметить по зоне подавления роста;
- Зона подавления роста в 0 разведении составляет 3,5 мм
- Зона подавления роста в 1 разведении составляет 1,7 мм
- В последующих разведениях зона подавления роста практически отсутствует
- Исходя из полученных данных для дальнейшего эксперимента было выбрано 0 разведение и объем инокулирования 50 мкл

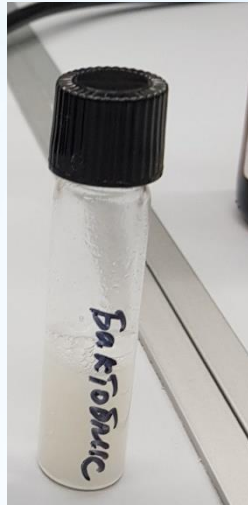


Streptococcus pyogenes
ATCC 19615

Выделение и идентификация чистой культуры

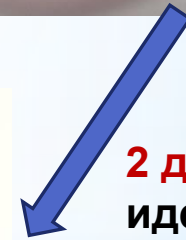
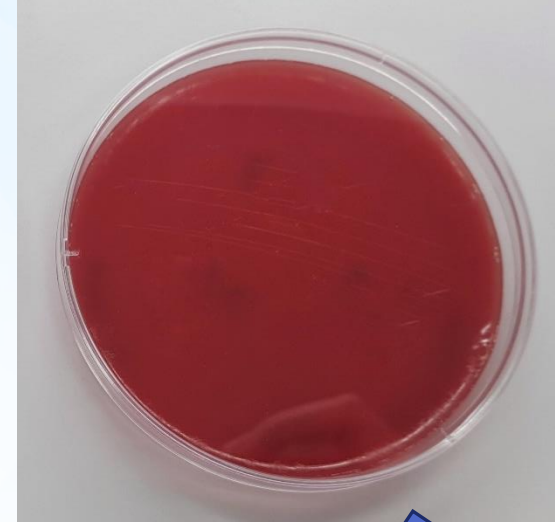
1 день:

Таблетку БактоБЛИСа растворяем в 5мл стерильного физ. раствора

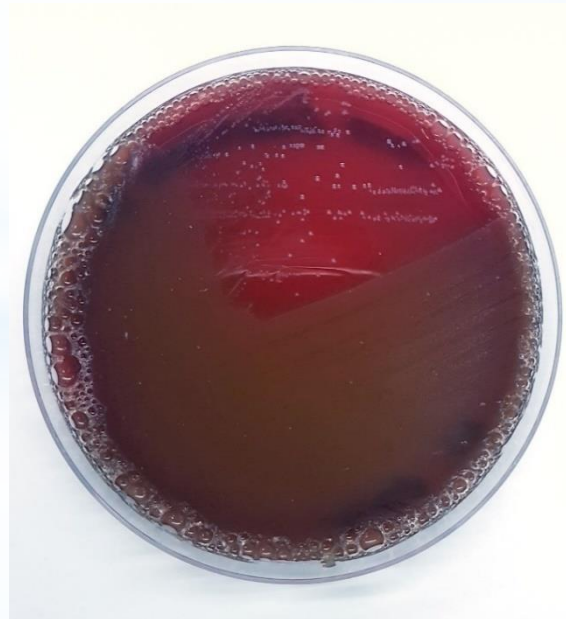


1 день:

Посев до изолированных колоний на кровяной агар и постановка в термостат

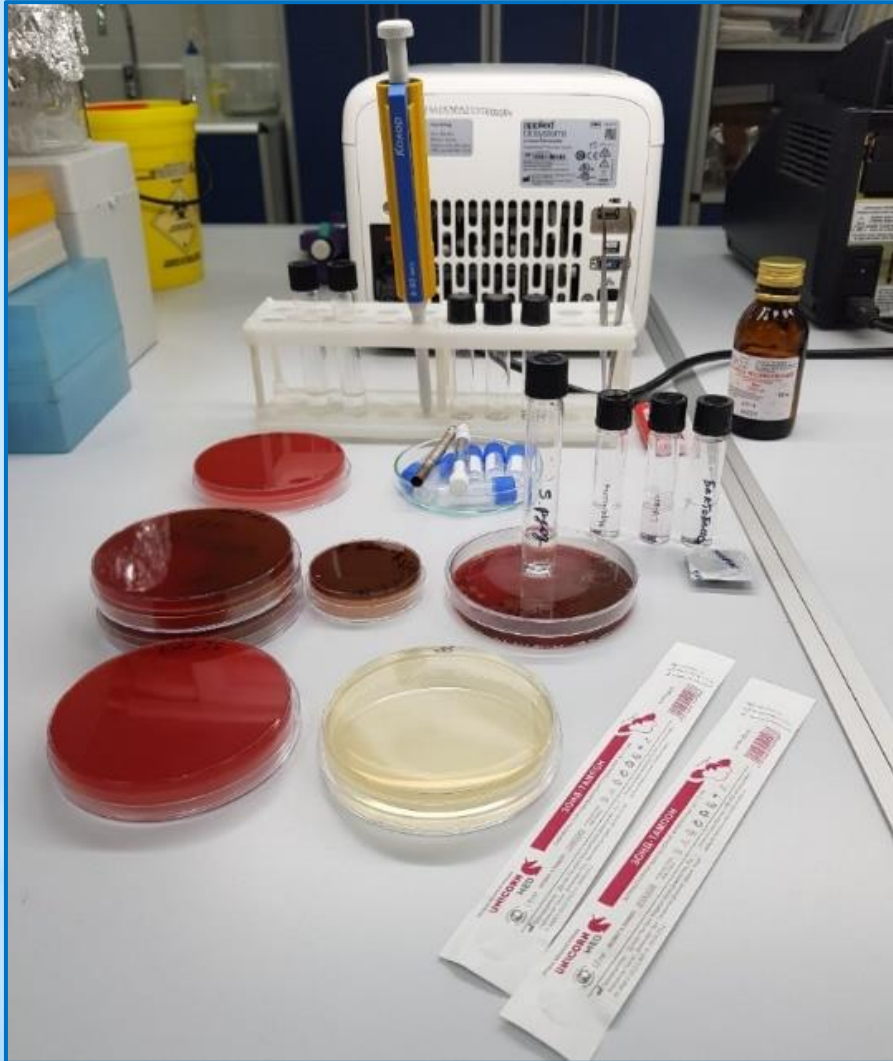


Идентификация культуры проводилась методом MALDI-TOF MS. Анализ показал, что выделенная культура - *Streptococcus salivarius*



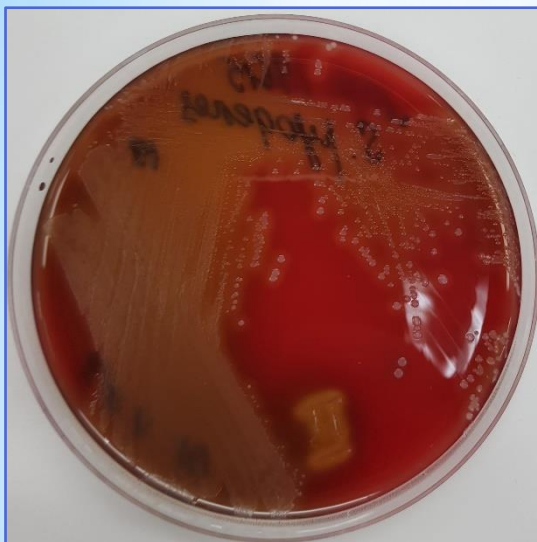
2 день:
идентификация полученной культуры

Сравнение БактоБЛИС с другими оросептиками

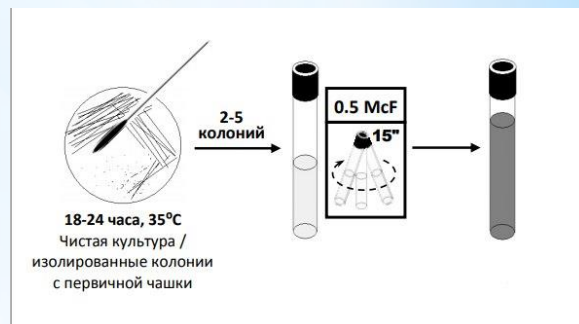


Мы сравнивали БактоБЛИС из таблетки с Мирамистином, Listerin и Glistar. Это одни их наиболее распространенных средств, которые в данный момент используются для профилактики заболеваний полости рта. Так же сравнение пробиотика проводилось со *Streptococcus salivarius* K12 выделенный из пробиотика в предыдущем опыте, *Streptococcus salivarius* (из коллекции культур НИИАХ)

Сравнение БактоБЛИС с другими оросептиками



1 день:
посев «газоном»
Streptococcus pyogenes



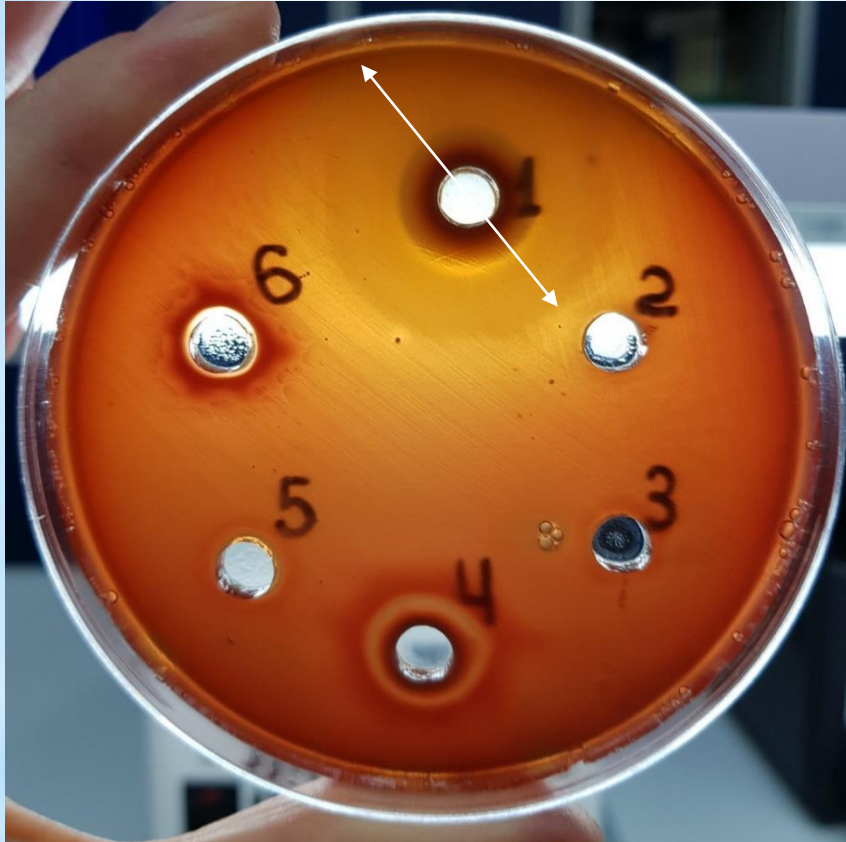
Мирамистин,
Листерин и Глистер
стерилизуем
фильтрованием
через
бактериальный
фильтр



1. БактоБЛИС из таблетки
2. *Streptococcus salivarius* K12 выделенный из пробиотика
3. *Streptococcus salivarius* клинический штамм
4. Listerin
5. Мирамистин
6. Глистер



Результаты



1. БактоБЛИС из таблетки – обширная зона подавления роста (3,5 мм)
2. *Streptococcus salivarius* K12 выделенный из пробиотика – нет зоны подавления роста
3. *Streptococcus Salivarius* клинический 1751
4. Listerin – небольшая зона подавления роста 1,4 мм
5. Мирамистин
6. Глистер

Результаты

Несмотря на отсутствие зон подавления роста вокруг *Streptococcus salivarius* K12 выделенного из бактоблиса, сам препарат обладает потенциально большей активностью в связи с кумулятивным действием культуры и антисептического вещества, добавленного в препарат



Выводы

- Показан явный антагонистический эффект SsK12 в отношении *S. Pyogenes*.
- Продемонстрировано преимущество БактоБЛИСа перед другими оросептиками.
- Концентрация в препарате является терапевтически эффективной, что было доказано микробиологически.
- Продемонстрировано специфические свойства *Streptococcus salivarius* K12 в сравнении с клиническим *Streptococcus salivarius*

Практические рекомендации

- Применение SsK12 может рассматриваться как эффективная мера профилактики заболеваний полости рта
- БактоБЛИС можно применять для восстановления нормальной микрофлоры полости рта после антибиотикотерапии