

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Годовалов А. П., Задорина И. И., Быкова Л. П., Пастухов Д. М., Яковлев М. В.

СПОСОБ ЭКСПРЕСС-ДЕТЕКЦИИ *ESCHERICHIA COLI* И БАКТЕРИЙ ГРУППЫ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ В РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава РФ, 614990, Пермь, Россия

В последнее время при диагностике заболеваний решающее место отводится лабораторным методам исследования, которые должны быть информативными, относительно простыми в исполнении и быстрыми. Описана апробация метода экспресс-детекции Escherichia coli и бактерий группы кишечной палочки (БГКП) в ротовой полости. В исследовании участвовали 44 добровольца, у которых проводили забор материала из ротовой полости с последующей инкубацией в питательной среде Кода. В исследовании использовали ротовую (n=11) и десневую жидкости (n=11); мазки-отпечатки со слизистой оболочки полости рта (n=11); зубную биоплёнку (n=11). Через 24 часа оценивали изменение цвета и прозрачности среды. Сохранение средой исходного зелёного цвета и прозрачности означало отсутствие в пробе E. coli и БГКП. Изменение цвета среды на жёлтый, мутность и/или образование пузырьков означало присутствие E. coli и БГКП. Параллельно осуществляли посев материала на среду Эндо с последующей идентификацией штаммов до вида. Показано полное совпадение результатов бактериологического метода и способа с применением среды Кода. В последнем случае существенным преимуществом является быстрота получения результата (18-20 ч), в отличие от классического метода, интерпретация результатов которого доступна только спустя 72 ч и более, что соответствует современному положению клинической микробиологии и быстрой диагностике по принципу «у постели больного / в кабинете врача». Представленный способ может быть успешно применён в клинической практике для топической диагностики микроорганизмов E. coli и БГКП в ротовой полости.

Ключевые слова: экспресс-диагностика; *Escherichia coli*; бактерий группы кишечной палочки (БГКП); микробиота полости рта.

Для цитирования: Годовалов А.П., Задорина И.И., Быкова Л.П., Пастухов Д.М., Яковлев М.В. Способ экспресс-детекции *Escherichia coli* и бактерий группы кишечной палочки в ротовой полости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (3): 177-179. DOI: <https://dx.doi.org/10.15620/0869-2084-2022-67-3-177-179>

Для корреспонденции: Годовалов Анатолий Петрович, канд. мед. наук, вед. науч. сотр., доц., e-mail: AGodvalov@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 24.06.2021

Принята к печати 22.12.2021

Опубликовано 25.03.2022

Godvalov A. P., Zadorina I. I., Bykova L. P., Pastukhov D. M., Yakovlev M. V.

EXPRESS DETECTION OF *ESCHERICHIA COLI* AND BACTERIA OF *ESCHERICHIA COLI* GROUP AT THE ORAL CAVITY

E.A. Vagner Perm State Medical University, Russian Federation

Currently, in the diagnosis of diseases, a decisive place is given to laboratory methods, which should be informative, relatively simple to perform and rapid. The article describes the approbation of a method for rapid detection of Escherichia coli and bacteria of Escherichia coli group in the oral cavity. Research involved 44 volunteers, who were sampled from the oral cavity, followed by incubation in Koda's medium. The study used oral (n=11) and gingival fluids (n=11); smears-prints from the oral mucosa (n=11); dental biofilm (n=11). After 24 hours, the change in color and transparency of the medium was assessed. The preservation of the initial green color and transparency by the medium meant the absence of E. coli and bacteria of Escherichia coli group in the sample. A change in the color of the medium to yellow, turbidity and / or the formation of bubbles indicated the presence of E. coli and bacteria of Escherichia coli group. In parallel, the material was inoculated onto Endo agar, followed by identification of strains to species. As a result of the study, a complete coincidence of the results of the classical bacteriological method and the method using Koda medium was shown. In the latter case, a significant advantage is the speed of obtaining the result (18-20 hours), in contrast to the classical method, the interpretation of the results of which is available only after 72 hours or more. All of this is in line with the state of the art in clinical microbiology and rapid diagnosis based on «point-of-care testing / doctor's office» diagnostic principle. The presented method can be successfully applied in clinical practice for topical diagnosis of microorganisms E. coli and bacteria of Escherichia coli group in the oral cavity.

Key words: microbiological rapid diagnostics; *Escherichia coli*; bacteria of the *E. coli* group; oral microbiota.

For citation: Godvalov A.P., Zadorina I.I., Bykova L.P., Pastukhov D.M., Yakovlev M.V. Express detection of *Escherichia coli* and bacteria of the *Escherichia coli* group at the oral cavity. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (3): 177-179 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.15620/0869-2084-2022-67-3-177-179>

For correspondence: Godvalov A.P.; e-mail: AGodvalov@gmail.com

Information about authors:

Godovalov A. P., <https://orcid.org/0000-0002-5112-2003>;
Zadorina I.I., <https://orcid.org/0000-0002-1819-4793>;
Bykova L.P., <https://orcid.org/0000-0002-4235-7302>;
Pastukhov D. M., <https://orcid.org/0000-0002-7363-5774>;
Yakovlev M.V., <https://orcid.org/0000-0002-2895-387X>.

Conflict of interest. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 24.06.2021

Accepted 22.12.2021

Published 25.03.2022

Введение. Микробиоценоз полости рта представлен более чем 700 видами различных микроорганизмов, среди которых весомую часть составляют резидентные таксоны [1]. К факторам, влияющим на резидентную микрофлору полости рта, относят: плохую гигиену, иммунодефицитные состояния, изменение микробиоты другой близлежащей области (носоглотки, пищеварительного тракта и др.). В биотопах полости рта здоровых людей постоянно не встречаются грамотрицательные энтеробактерии и присутствие *Escherichia coli* и бактерий группы кишечной палочки (БГКП; микроорганизмы родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*) ассоциируется с развитием как дисбиотических состояний [2, 3], так и ряда воспалительных заболеваний [4].

В клинической практике достаточно часто встречаются ситуации, когда при смешанной (нетипичной) клинической симптоматике затруднена постановка диагноза. В таких случаях решающее место отводится дополнительным методам исследования, в том числе лабораторным, которые должны быть информативными, относительно простыми в исполнении и быстрыми [5].

Из существующих лабораторных микробиологических тестов представляет интерес метод газовой хроматографии – масс-спектрометрии, который основан на методике извлечения из биологических проб (выдыхаемый воздух) маркерных веществ микроорганизмов (жирных кислот, альдегидов, спиртов, стеринов) [6, 7]. Однако такой метод отличается высокой стоимостью, необходимостью специального оборудования (газовый хроматограф масс-спектрометр) и специально обученного персонала, обладающего навыками работы. Не описана корреляция детектируемых метаболитов с конкретным видом микроорганизмов ротовой полости, что определяет невозможность топической диагностики [8].

В санитарной микробиологии внедрены тесты ускоренной детекции отдельных групп микроорганизмов, основанные на изменении цвета среды [9, 10]. Применение таких питательных сред в клинической практике будет перспективным, в связи с чем предлагается применение селективной питательной среды Кода для детекции в биоматериалах ротовой полости *E. coli* и БГКП, без выделения чистой культуры и идентификации микроорганизмов.

Цель исследования – апробировать способ экспресс-детекции *Escherichia coli* и бактерий группы кишечной палочки в различных биотопах ротовой полости.

Материал и методы. У 44 добровольцев проведено исследование биологического материала различных биотопов полости рта: забор ротовой жидкости ($n=11$) и десневой жидкости ($n=11$) осуществляли с помощью микропипетки; со слизистой оболочки полости рта ($n=11$) брали мазок-отпечаток с помощью стерильного

ватного тампона; зубную биоплёнку ($n=11$) – с помощью экскаватора № 3 (Экрадент, Россия). Биоматериалы помещали в питательную среду Кода, разлитую по микропробиркам типа Эппендорф, в объеме 1,8 мл, инкубировали в термостате в течение 24 ч при температуре 37° С, после чего оценивали изменение цвета и мутности питательной среды. Сохранение средой исходного зелёного цвета и прозрачности означало отсутствие в пробе *E. coli* и БГКП. Изменение цвета среды на жёлтый, мутность и (или) образование пузырьков означало присутствие *E. coli* и БГКП [11].

Одновременно все пробы подвергали культуральному исследованию с использованием агара Эндо для селективного выделения представителей семейства *Enterobacteriaceae*. Все выросшие штаммы идентифицировали до вида.

От всех добровольцев, участвовавших в исследовании, получено добровольное, информированное согласие. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера» Минздрава России.

Результаты и обсуждение. Установлено полное совпадение полученных результатов при культивировании биологических материалов в среде Кода и на среде Эндо. В случае помутнения и изменения цвета среды Кода на интенсивный жёлтый, на среде Эндо наблюдали рост красных колоний с металлическим блеском, которые впоследствии идентифицированы как *E. coli*. В случае, когда цвет среды Кода не менялся, на среде Эндо отсутствовал рост бактерий. При использовании среды Кода можно получить результаты через 18-20 ч, а при проведении культурального метода – через 72 ч и более.

Предлагаемый подход может быть успешно применён для определения биотопов полости рта, колонизированных *E. coli* и БГКП. Установлено присутствие *E. coli* в ротовой и десневой жидкостях у 25% обследованных. При этом во всех случаях наблюдалась локализация *E. coli* и БГКП в зубной биоплёнке.

Микрофлора полости рта отличается рядом особенностей и представляет уникальную сложно организованную структуру, состоящую из большого числа микроорганизмов. В такой ситуации точная идентификация того или иного вида микроорганизмов в биотопах ротовой полости имеет существенное значение для диагностики воспалительных заболеваний слизистой оболочки полости рта и тканей пародонта, приобретает принципиальную важность при коррекции или разработке схемы лечения. В клинической микробиологии в последнее время ведущим направлением является разработка ускоренных тестов, позволяющих проводить диагностику «у постели больного / в

кабинете врача» [12]. Предлагаемый способ детекции *E. coli* и БГКП предполагает использование селективной питательной среды и существенно сокращает сроки получения результата исследования. Среда Кода за счёт наличия сульфанола (алкиларилсульфонат) обеспечивает преимущественный рост таких грамотрицательных энтеробактерий, как *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* [13]. Указанные микроорганизмы обладают широким спектром факторов патогенности и способны вызывать гнойно-воспалительные заболевания в биотопах, нетипичных для их обитания, которым является ротовая полость [14].

Заключение. Предлагаемый способ экспресс-детекции позволяет своевременно и в короткие сроки провести топическую детекцию *E. coli* и БГКП в полости рта, что является ключевым маркером в диагностике дисбиоза полости рта. Полученные результаты исследования могут быть использованы для коррекции или разработки плана медикаментозной терапии и последующей оценки эффективности лечения.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3-5, 7, 8, 12, 14 см. REFERENCES)

2. Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Гуров А.В., Изотова Г.Н., Старостина А.Е., Лапченко А.С. Клинико-микробиологическая характеристика дисбиотических изменений слизистой оболочки полости рта и ротоглотки. *Медицинский совет*. 2016; 6: 32-5.
6. Сурдина Э.Д., Родионов Г.Г., Силин А.В., Плавинский С.Л., Каспина А.И., Болотова М.Е., Ворошилова Т.М. Оценка микробиоты полости рта, тонкой и толстой кишки у больных красным плоским лишаем слизистой оболочки рта. *Пародонтология*. 2017; 2 (83): 47-52.
9. Зайнуллина А.Р., Халиуллин Э.М., Яковлева Г.Ю., Петухова Е.В. Разработка микробиологических тестов для анализа качества пищевых продуктов. *Вестник Технологического университета*. 2018; 21(2): 233-6.
10. Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Марговецкий М.Н., Храмов М.В. Разработка и использование новой питательной среды для выявления и идентификации санитарно-показательных микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2008; 6: 70-2.
11. Годовалов А.П., Быкова Л.П., Задорина И.И., Яковлев М.В., Пастухов Д.М. Способ экспресс-диагностики *Escherichia coli* и бактерий группы кишечной палочки в ротовой полости. Патент РФ № RU 2732412 C1; 2020.
13. Шепелин А.П., Дятлов И.А. Питательные среды для энтеробактерий. Оболensk; 2017.

REFERENCES

1. Sharma N., Bhatia S., Sodhi A.S., Batra N. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol.* 2018; 4(1): 42-66.
2. Kryukov A.I., Kunel'skaya N.L., Gurov A.V., Izotova G.N., Starostina A.E., Lapchenko A.S. Clinical and microbiological characteristics of dysbiotic changes in the mucous membrane of the oral cavity and oropharynx. *Meditsinskiy sovet*. 2016; 6: 32-5. (in Russian)
3. Gavriush T.V. Dysbioses of the oral cavity and intestines and immune reactivity in of adolescent bronchial asthma patients. *Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*. 2001; 6: 74-7.
4. He X., Tian Y., Guo L., Lux R., Zusman D.R., Shi W. Oral-derived bacterial flora defends its domain by recognizing and killing intruders – a molecular analysis using *Escherichia coli* as a model intestinal bacterium. *Microb. Ecol.* 2010; 60(3): 655-64.
5. Lagier J.C., Edouard S., Pagnier I., Mediannikov O., Drancourt M., Raoult D. Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2015; 28(1): 208-36.
6. Surдина Ye.D., Родионов G.G., Силин A.V., Плавинский S.L., Каспина A.I., Болотова M.E., Ворошилова T.M. Evaluation of the microbiota of the oral cavity, small and large intestine in patients with lichen planus of the oral mucosa. *Parodontologiya*. 2017; 2 (83): 47-52. (in Russian)
7. Smith M.L., Miguez A.M., Styczynski M.P. Gas chromatography-mass spectrometry microbial metabolomics for applications in strain optimization. *Methods Mol. Biol.* 2019; 1927: 179-89.
8. Ozeki M., Nozaki T., Aoki J., Bamba T., Jensen K.R., Murakami S., Toyoda M. Metabolomic analysis of gingival crevicular fluid using gas chromatography/mass spectrometry. *Mass. Spectrom. (Tokyo)*. 2016; 5(1): A0047.
9. Zaynullina A.R., Haliullin Ye.M., Jakovleva G.Yu., Petuhova E.V. Development of microbiological tests for the analysis of food quality. *Vestnik Tehnologicheskogo universiteta*. 2018; 21(2): 233-6. (in Russian)
10. Polosenko O.V., Marchihina I.I., Sholokhova L.P., Martoveckiy M.N., Khramov M.V. Development and use of a new culture medium for the detection and identification of sanitary-indicative microorganisms. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2008; 6: 70-2. (in Russian)
11. Godovalov A.P., Bykova L.P., Zadorina I.I., Jakovlev M.V., Pastuhov D.M. A method for express diagnostics of *Escherichia coli* and bacteria of the *Escherichia coli* group in the oral cavity. Patent RF № RU 2732412 C1; 2020. (in Russian)
12. Kozel T.R., Burnham-Marusch A.R. Point-of-care testing for infectious diseases: past, present, and future. *J. Clin. Microbiol.* 2017; 55(8): 2313-20.
13. Shepelin A.P., Dyatlov I.A. Culture media for enterobacteriaceae. Obolensk; 2017. (in Russian)
14. van Winkelhoff A.J., Rurenga P., Wekema-Mulder G.J., Singadji Z.M., Rams T.E. Non-oral gram-negative facultative rods in chronic periodontitis microbiota. *Microb. Pathog.* 2016; 94: 117-22.