

Jakub Moroz

***Wpływ płynów do płukania jamy ustnej
na wybrane składniki jej mikrobioty***

***The influence of mouthrinses
on selected components of oral cavity microbiota***

Rozprawa doktorska

z Katedry Biologii i Parazytologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik Katedry i Promotor:
prof. dr hab. n. med. Piotr Kurnatowski

Łódź, 2017

Streszczenie

Stan jakościowy i ilościowy mikrobioty jamy ustnej zmienia się podczas ontogenezy człowieka. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach HMP (Human Microbiome Project) wykazały, że mikrobiom w jamie ustnej jest porównywalny z mikrobiomem jelit, czy skóry. Z danych zawartych w HOMD (the Human Oral Microbiome Database) wynika, że samych tylko bakterii w jamie ustnej jest ponad 700 taksonów (HOMD). Badanie mikrobioty jamy ustnej osób zdrowych przeprowadzone metodami biologii molekularnej wykazało obecność 101 gatunków należących do 85 (75-dających się hodować) rodzajów grzybów, najczęściej reprezentowanych przez *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, a także *Geotrichum*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Malassezia* i *Epicoccum*. W jamie ustnej pasożytować mogą pierwotniaki, takie jak: *Trichomonas tenax*, *Entamoeba gingivalis* i *Leishmania braziliensis*. W etiologii chorób jamy ustnej istotną rolę mogą odgrywać występujące jednocześnie patogeny należące do różnych grup systematycznych.

Dla utrzymania prawidłowej higieny jamy ustnej oprócz szczotkowania zębów, przydatne są szczoteczki i skrobaczki) do języka, jak również różnego typu płukanki, które uzupełniają oczyszczanie zębów, powodują rozluźnienie resztek pokarmowych i niektórych nalotów, a także usunięcie z jamy ustnej części składników mikrobioty. Zgodnie z zaleceniami Amerykańskiego Towarzystwa Stomatologicznego (American Dental Association - ADA) stosowane do jamy ustnej płukanki nie powinny mieć negatywnego wpływu na poszczególne składniki prawidłowej mikrobioty, a jedynie eliminować z niej czynniki patogenne.

Celem niniejszej pracy była ocena działania różnych płynów do płukania jamy ustnej, komercyjnych i recepturowych, na wybrane grzyby i pierwotniaki stanowiące potencjalnie chorobotwórczą mikrobiotę jamy ustnej.

Do badań użyto 108 szczepów grzybów, w tym: 8 - wzorcowych i 100 wyizolowanych od pacjentów, a także 2 szczepy wzorcowe pierwotniaków. Do badań użyto 14 środków używanych jako płukanki do jamy ustnej, w tym 2 związki czyste będące składnikami płukanek, tj. 2% benzokainę i 0.2% chlorheksydynę, a także 12 preparatów dostępnych w sprzedaży, a mianowicie: Azulan, Colgate Plax Complete Care Sensitive, Corsodyl 0.2%, Curasept ADS 205, Dentosept, Dentosept A, Eludril Classic, Listerine Total care, Octenidol, Oral-B Pro-Expert Clinic Line, Sylveco, *Tinctura*

salviae. Wobec stwierdzenia w trakcie przeprowadzanych badań faktu, iż Dentosept A, w przeciwieństwie do Dentoseptu, wykazał działanie przeciwgrzybicze, porównano skład obydwu preparatów i stwierdzono, że różnią się one obecnością benzokainy (anestezyna) w Dentosepcie A. W tej sytuacji zdecydowano o zbadaniu właściwości tej substancji wobec grzybów i pierwotniaków.

Wrażliwości szczepów grzybów na poszczególne płukanki wykonano metodą mikrorozcieńczeń w podłożu płynnym wg EUCAST, dyfuzji w żelu agarowym wg Ka-
dłubowskiego, dyfuzyjno-krażkową, zaś drażliwości pierwotniaków na związki che-
miczne poprzez wyznaczanie CL_{50} i rozcieńczeń wywołujących śmiertelność 50%
osobników. Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej.

Spośród 2 roztworów substancji czystych i 12 zbadanych płukanek dostęp-
nych w gotowych postaciach handlowych wykazały działanie przeciwgrzybicze wo-
bec użytych w niniejszej pracy szczepów grzybów następujące: chlorheksydyna,
benzokaina, Colgate Plax Complete Care Sensitive, Corsodyl 0.2%, Curasept ADS
205, Dentosept A, Octenidol, Oral-B Pro-Expert Clinic Line, Sylveco. Najsilniejsze
działanie na zbadane szczepy wzorcowe uzyskano dla Dentoseptu A i chlorheksydy-
ny (najmniejsze stężenie hamujące 0.082 i MIC - 0.083), zaś najslabsze dla Cura-
septu i Octenidolu (najmniejsze rozcieńczenie hamujące odpowiednio 0.29 i 0.212).
Zbadane płukanki wykazały najsilniejsze działanie na szczep wzorcowy *C.glabrata*
(najmniejsze rozcieńczenie hamujące średnio - 0.612). Najsilniejsze działanie na
zbadane szczepy wyizolowane od pacjentów uzyskano dla Chlorheksydyny (MIC -
0.132), Sylveco i Corsodyl (najmniejsze rozcieńczenia hamujące odpowiednio 0.1519
i 0.1586), zaś najslabsze dla Curaseptu i Octenidolu (najmniejsze rozcieńczenie ha-
mujące odpowiednio 0.2799 i 0.2149). Zbadane płukanki wykazały najsilniejsze dzia-
łanie na szczep wzorcowy *C.parapsilosis* (najmniejsze rozcieńczenie hamujące śred-
nio - 0.0938).

Badanie drażliwości na leki zbadanych szczepów wzorcowych wykazało, że
C.parapsilosis CBS 10947 była drażliwa na 6 (klotrimazol, ekonazol, itrakonazol, ke-
tokonazol, mikonazol, nystatyna), *C.glabrata* CBS 862 i *C.krusei* CBS 573 na 3 (od-
powiednio: amfoterycyna, mikonazol i nystatyna oraz klotrimazol, itrakonazol i miko-
nazol), a *C.albicans* ATCC 24433 na 2 (amfoterycyna, mikonazol) oceniane leki
przeciwgrzybicze. *C.tropicalis* CBS 2424 była oporna 7 z 8 zbadanych tą metodą le-
ków. Porównanie stref zahamowania wzrostu pod wpływem preparatów przeciwgrzy-
biczych i płukanek uzyskane dla szczepów wzorcowych wykazało, że *C.albicans*

ATCC 24433, *C.albicans* L-45 i *C.albicans* CBS 2312 były wrażliwe na chlorheksydyne, Colgate, Corsodyl, Dentosept A i Sylveco, średnio wrażliwe na Octenidol i Oral B, zaś odporne na Curasept; *C.dublinskiensis* CBS 7987 była wrażliwa na nystatynę i chlorheksydyne, Colgate, Corsodyl, Dentosept A, Sylveco, zaś średnio wrażliwa na amfoterycynę B i Octenidol oraz Oral B; *C.glabrata* CBS 862 była wrażliwa na amfoterycynę B, mikonazol, nystatynę i chlorheksydyne, Colgate, Dentosept A, Oral B, Sylveco, zaś średnio wrażliwa na klotrimazol, ekonazol i Octenidol; *C.krusei* CBS 573 była wrażliwa na klotrimazol, itrakonazol, mikonazol, nystatynę i Dentosept A, zaś średnio wrażliwa na ketokonazol i Corsodyl, Curasept, Oral B, Sylveco; *C.parapsilosis* CBS 10947 była wrażliwa na klotrimazol, ekonazol, itrakonazol, ketokonazol, mikonazol, nystatynę i chlorheksydyne, Colgate, Dentosept A, zaś średnio wrażliwa na amfoterycynę B i Corsodyl, Octenidol, Oral B, Sylveco; *C.tropicalis* CBS 2424 była wrażliwa na nystatynę i Dentosept A, zaś średnio wrażliwa na Corsodyl, Curasept, Octenidol, Oral B, Sylveco.

Badając wpływ poszczególnych płukanek użytych w niniejszej pracy na pierwotniaki stwierdzono, że wszystkie one po 10 i 30 min. działają bójczo w postaci nierozcieńczonej zarówno na *Trichomonas tenax*, jak i na *Entamoeba gingivalis*. Nawet w najniższych ocenianych rozcieńczeniach (0.0312) śmiertelność *Trichomonas tenax* wahała się od 2 do 80% po 10 min. i od 10 do 100% po 30 min., zaś śmiertelność *Entamoeba gingivalis* odpowiednio od 1 do 36% i od 5 do 50%. Fakt ten świadczy o wysokiej aktywności pierwotniakobójczej wszystkich zbadanych płukanek.

Jak wynika z przeprowadzonych badań:

1. Niektóre ze stosowanych płukanek do jamy ustnej mają właściwości przeciwgrzybicze, a wszystkie zbadane w niniejszej rozprawie - nieopisywane wcześniej - przeciwpierwotniakowe.
2. Benzokaina, będąca miejscowym środkiem znieczulającym, wykazuje właściwości etiotropowe, które mogą być wykorzystane jako wspomagające w leczeniu przeciwgrzybiczym i przeciwpierwotniakowym.
3. Chlorheksydyna potwierdziła wysoką skuteczność w eradykacji potencjalnie patogennych grzybów i pierwotniaków.
4. Wykazana oporność wszystkich szczepów wzorcowych wobec flukonazolu (lek I rzutu) i niektórych płukanek wskazuje na konieczność oznaczania gatunków wyizolowanych od pacjentów grzybów, z uwagi na występowanie oporności wobec substancji czynnych zawartych w płukankach.

5. Silne działanie pierwotniakobójcze niektórych płukanek zapewnia skuteczną eliminację tych potencjalnie chorobotwórczych drobnoustrojów wchodzących w skład mikrobioty jamy ustnej.
6. Stosowanie płukanek jest istotnym uzupełnieniem zabiegów zapewniających prawidłową higienę jamy ustnej.

Summary

Qualitative and quantitative status of oral cavity microbiota changes during human ontogenesis. Human Microbiome Project (HMP) research has shown that the oral microbiome is comparable to the microbiology of the intestines or the skin. The Human Oral Microbiome Database (HOMD) shows that there are more than 700 taxa (HOMD) in the oral cavity. The study of mycobiota of healthy individuals conducted with molecular biology methods showed the presence of 101 species belonging to 85 (75 cultivable) types of fungi, most commonly represented by *Candida*, *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cryptococcus*, as well as *Geotrichum*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Malassezia* and *Epicoccum*. Protozoa, such as *Trichomonas tenax*, *Entamoeba gingivalis* and *Leishmania braziliensis*, may also be present in the mouth as parasites. Pathogens belonging to different systematic groups may play an important role in the etiology of oral diseases.

In addition to brushing the teeth, the use of tongue brushes and scrapers, as well as various types of mouthrinse plays an important role in maintaining proper oral hygiene; these activities complement dental cleaning, release food residues and some of the raids, and remove some of the microbial components from the oral cavity. As recommended by the American Dental Association (ADA), mouthwashes should not adversely affect the individual components of a normal microbiota, but only eliminate pathogens.

The aim of this study was to evaluate the effect of various oral, commercial and prescription mouthrinses on selected fungi and protozoa, which are potentially pathogenic in oral microbiota.

The study used 108 strains of fungi, including eight standard strains and 100 isolated from patients, as well as two standard strains of protozoa. In addition, 14 agents used as mouthwashes were tested, with two pure compounds acting as mouthrinse ingredients, i.e. 2% benzocaine and 0.2% chlorhexidine, as well as 12 commercially-available formulas: Azulan, Colgate Plax Complete Care Sensitive, Corsodyl 0.2%, Curasept ADS 205, Dentosept, Dentosept A, Eludril Classic, Listerine Total Care, Octenidol, Oral-B Pro-Expert Clinic Line, Sylveco and Tinctura salviae. During the study, Dentosept A was found to demonstrate antifungal activity but not Dentosept; therefore, the compositions of the two formulations were compared and found

to differ with regard to the presence of benzocaine (anestezine) in Dentosept A. The study went on to investigate its anti-fungal and anti-protozoan properties.

The sensitivity of fungal strains to individual rinses was measured by microdilution in liquid media according to EUCAST, agar gel diffusion according to Kadłubowski, and the diffusion-disk method. The sensitivity of protozoa to chemical compounds was evaluated by determination of CL₅₀ and dilutions causing 50% mortality. The obtained results were analyzed statistically.

Of the 2 clean media solutions and 12 rinses tested in ready-to-use commercial formulations, the following demonstrated antifungal activity against the fungal strains: Colgate Plax Complete Care Sensitive, Corsodyl 0.2%, Curasept ADS 205, Dentosept A, Octenidol, Oral-B Pro-Expert Clinic Line and Sylveco. Dentosept A and chlorhexidine were the most potent antifungal agents against standard strains (lowest inhibitory concentration 0.082 and MIC 0.083); in turn, Curasept and Octenidol demonstrated the weakest activity (lowest inhibitory concentrations of 0.29 and 0.212 respectively). The tested mouthrinses were most effective against the *C. glabrata* standard strain (lowest inhibitory concentration on average 0.612).

Regarding the strains isolated from patients, the strongest effects were obtained for chlorhexidine (MIC 0.132), Sylveco and Corsodyl (lowest inhibitory concentrations of 0.1519 and 0.1586 respectively), and the weakest for Curasept and Octenidol (lowest inhibitory concentrations of 0.2799 and 0.2149 respectively). The tested rinses showed the strongest effect on the *C. parapsilosis* strain isolated from patients (lowest inhibitory concentration on average 0.0938).

Drug susceptibility testing of the examined standard strains showed that *C. parapsilosis* CBS 10947 was susceptible to six agents: clotrimazole, econazole, itraconazole, ketoconazole, miconazole and nystatin. *C. glabrata* CBS 862 was susceptible to amphotericin, miconazole and nystatin, *C. krusei* CBS 573 to clotrimazole, itraconazole and miconazole, and *C. albicans* ATCC 24433 to amphotericin and miconazole. *C. tropicalis* CBS 2424 was resistant to seven out of eight drugs tested with this method.

A comparison of growth inhibition zones associated with the antifungal and mouthrinse treatments obtained for reference strains showed that *C. albicans* ATCC 24433, *C. albicans* L-45 and *C. albicans* CBS 2312 were sensitive to chlorhexidine, Colgate, Corsodyl, Dentosept A and Sylveco; they were also medium sensitive to Octenidol and Oral B, and resistant to Curasept. *C. dubliniensis* CBS 7987 was sen-

sitive to nystatin and chlorhexidine, Colgate, Corsodyl, Dentosept A, Sylveco, and medium sensitive to amphotericin B and Octenidol and Oral-B. *C. glabrata* CBS 862 was susceptible to amphotericin B, miconazole, nystatin and chlorhexidine, Colgate, Dentosept A, Oral-B, Sylveco, but moderately sensitive to clotrimazole, econazole and Octenidol. *C. krusei* CBS 573 was sensitive to clotrimazole, itraconazole, miconazole, nystatin and Dentosept A, but moderately sensitive to ketoconazole, Corsodyl, Curasept, Oral-B and Sylveco. *C. parapsilosis* CBS 10947 was susceptible to clotrimazole, econazole, itraconazole, ketoconazole, miconazole, nystatin, chlorhexidine, Colgate and Dentosept A, but moderately susceptible to amphotericin B, Corsodyl, Octenidol, Oral-B and Sylveco. Finally, *C. tropicalis* CBS 2424 was sensitive to nystatin and Dentosept A, but moderately sensitive to Corsodyl, Curasept, Octenidol, Oral-B and Sylveco.

All mouthrinses tested in this work in their undiluted form acted lethally on both *Trichomonas tenax* and *Entamoeba gingivalis* after 10 and 30 minutes, respectively. Even in the lowest dilutions assessed (0.0312), the mortality of *Trichomonas tenax* varied from 2 to 80% after 10 minutes and 10 to 100% after 30 minutes, while *Entamoeba gingivalis* demonstrated 1 to 36% and 5 to 50% mortality, for 10 and 30 minutes, respectively. This confirms the high activity of all tested rinses against protozoa.

According to the research conducted:

1. While some of the oral rinses were found to have antifungal properties, a novel findings was that all of them also have antiprotozoal action.
2. Benzocaine, used as a local anesthetic, has etiotropic properties which can be useful for supporting antifungal and antiprotozoal treatment.
3. Chlorhexidine confirmed its high efficiency in the eradication of potentially pathogenic fungi and protozoa.
4. All fungal standard strains were found to be resistant to fluconazole and some tested mouthrinses, which highlights the need to identify the fungal species present in the oral microbiota and their resistance status.
5. The strong antiprotozoal activity of some mouthrinses inhibit the action of potentially pathogenic microorganisms which form a part of the oral microbiota.
6. Mouthrinse use is an important complement for other procedures intended to maintain correct oral hygiene.