

*Bacterial Systematics* / Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. New York: Wiley; 1991: 115—47.

17. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Otten T., Jiao W.W., Gomes L.L. et al. Russian «successful» clone B0/W148 of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multiplex PCR assay for rapid detection and global screening. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(11): 3757—9.
18. Callow R.K., Glover R.E., Hart P.D., Hills G.M. Licheniformin, an antibiotic substance from bacillus licheniformis, active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1947; 28(6): 418—40.
19. Han J., Sanad Y.M., Deck J., Sutherland J.B., Li Z., Walters M.J. et al. Bacterial populations associated with smokeless tobacco products. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(20): 6273—83.

Ogarkov O.B.<sup>1,2,3</sup>, Badleeva M.V.<sup>4</sup>, Belkova N.L.<sup>1,5</sup>, Adelshin R.V.<sup>6</sup>, Tsyrenova T.A.<sup>7</sup>, Khromova P.A.<sup>1</sup>, Sinkov V.V.<sup>1,8</sup>, Kostjunin K.Yu.<sup>8</sup>, Dashatsyrenova S.B.<sup>9</sup>, Koshcheyev M.E.<sup>7</sup>, Zarbuev A.N.<sup>9</sup>, Zhdanova S.N.<sup>1</sup>

### THE PHENOMENON OF BIOFILM FORMATION BY *BREVIBACILLUS SPP.* AND *BACILLUS SPP.* WITH THE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* CLINICAL ISOLATES PRESENCE

<sup>1</sup>Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, 664003, Irkutsk, Russia;

<sup>2</sup>Irkutsk State University, 664003 Irkutsk, Russia;

<sup>3</sup>Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, 664079, Irkutsk, Russia;

<sup>4</sup>Buryat State University, 670000, Ulan-Ude, Russia;

<sup>5</sup>Limnological institute, 664033, Irkutsk, Russia;

<sup>6</sup>Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, 664047, Irkutsk, Russia;

<sup>7</sup>Irkutsk Clinical Tuberculosis Hospital, 664039, Irkutsk, Russia;

<sup>8</sup>Irkutsk Diagnostic Center, 66047, Irkutsk, Russia;

<sup>9</sup>Buryat Republican Clinical Tuberculosis Dispensary, 670004, Ulan-Ude, Russia.

Biofilms formation by *M. tuberculosis* on the synthetic Shkolnikova's medium (analog of Sauton's medium) was studied. One hundred fifty clinical and twenty reference laboratory strains of *M. tuberculosis* were investigated. None of the 150 isolates from people produced biofilms (pellicle), but showed abundant planktonic growth. All of 20 reference strains of *M. tuberculosis* produced both pellicle and

planktonic growth. The phenomenon of the pellicle formation by the mixed cultures from sputum treated with NALC-NaOH was found. Sixty three mixed pellicles were retrieved. Biofilms contained DNA of *M. tuberculosis* made up 30.2% of total number (19/63). Six samples with the highest concentration of mycobacterial DNA were revealed by the RT-PCR method. A molecular cloning and sequencing of 16S rDNA fragment of one pellicle was done. The nucleotide sequences showed 99% identity with *Bacillus thermoamylovorans*. Three strains of spore-forming bacilli were isolated from these mixed biofilms. Strains were identified by Sanger sequencing of 16S rDNA, one as *Bacillus licheniformis* and two others as *Brevibacillus spp.* Susceptibility of these bacilli to 12 first- and second-line antituberculosis drugs was studied. All three strains were resistant to the maximum concentrations of isoniazid, streptomycin, ethambutol, and ethionamide. Strains of *Brevibacillus spp.* were additionally resistant to kanamycin and PAS. The possibility of combined growth of clinical strains of *M. tuberculosis* and *B. licheniformis* in long-term co-incubation in a Shkolnikova's medium was shown *in vitro* model. *B. licheniformis* produced a pellicle in the first few days of growth, which remained stable during the whole observation period — 45 days. Hypothesis was postulated on the possibility of short-term persistence of some species of «saprophytic» bacilli in lung during later stages of pulmonary tuberculosis within caseous necrosis.

**Key words:** *M. tuberculosis*; *Brevibacillus spp.*; *Bacillus spp.*; pellicle formation

**For citation:** Ogarkov O.B., Badleeva M.V., Belkova N.L., Adelshin R.V., Tsyrenova T.A., Khromova P.A., Sinkov V.V., Kostjunin K.Yu., Dashatsyrenova S.B., Koshcheyev M.E., Zarbuev A.N., Zhdanova S.N. The phenomenon of biofilm formation by *Brevibacillus spp.* and *Bacillus spp.* with the *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates presence. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)* 2017; 35(3): 98-103 (Russian). DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-3-98-103.

**For correspondence:** Oleg B. Ogarkov. E-mail: obogarkov@gmail.com

**Acknowledgments.** This work was supported by the Russian Science Foundation (16-04-00160 A.).

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 09.02.17

Accepted 27.05.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.314.17-002-08-07:616.316-008.87:577.21.08

Баймиев Ал.Х.<sup>1,2</sup>, Швец К.Ю.<sup>1</sup>, Мавзютов А.Р.<sup>1</sup>, Тамарова Э.Р.<sup>1</sup>, Булгакова А.И.<sup>1</sup>

### КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБИОТЫ ПАРОДОНТАЛЬНЫХ КАРМАНОВ И СЛЮНЫ МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ПАРОДОНТИТА

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, Уфа, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУН Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, 450054, Уфа, Россия.

**Резюме.** Проведена работа по стандартизации выявления и количественного определения пародонтопатогенных микроорганизмов в клиническом материале (содержимое пародонтального кармана, слюна) методом ПЦР в режиме реального времени. Для оптимизации условий проведения анализа разработан способ получения клинических образцов известного объема, а также сконструирован калибровочный образец для получения достоверных результатов при диагностике пародонтита.

**Ключевые слова:** пародонтит, ПЦР в режиме реального времени, ранняя диагностика, оценка эффективности лечения.

**Для цитирования:** Баймиев Ал.Х., Швец К.Ю., Мавзютов А.Р., Тамарова Э.Р., Булгакова А.И. Количественный анализ микробиоты пародонтальных карманов и слюны методом ПЦР в режи-

ме реального времени до и после лечения пародонтита. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология* 2017;35(3):103-108. DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-3-103-108.

Воспалительные заболевания пародонта имеют высокую распространённость среди населения и представляют серьёзную проблему, особенно среди взрослых, где отмечается тенденция к росту заболеваемости, достигающей 98% случаев [2, 4]. Важнейшим пусковым фактором в инициации деструктивного процесса в тканях пародонта является формирование зубной бляшки как многослойной микробной биоплёнки с участием пародонтопатогенных микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola*, а также представительной резидентной микрофлоры полости рта *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus*

**Для корреспонденции:** Баймиев Алексей Ханифович (Baymiev Aleksey Hanifovich), baymiev@mail.ru;

*sanguis* [14, 15]. Жизнедеятельность данных микроорганизмов способствует запуску инфекционного процесса, характеризующегося потерей волокон коллагена и их связи с цементом зуба, миграцией апикального эпителия, углублением пародонтальных карманов и резорбцией альвеолярной кости [6, 9, 12, 13].

В настоящее время в научных и практических исследованиях в области диагностики инфекционных заболеваний широкое распространение получил метод ПЦР в режиме реального времени. Использование данного метода позволяет точно анализировать качественный и количественный состав микробиоты пародонтальных карманов, выявляя ДНК искомым микроорганизмов в сложной смеси нуклеиновых кислот. Количественная оценка соотношения пародонтопатогенов в исследуемом материале является важным диагностическим инструментом, так как при развитии заболевания соотношение патогенных и условно-патогенных представителей микробиоценоза суббиотопов полости рта существенно меняется. В настоящее время точные данные о соотношении микроорганизмов полости рта при пародонтите отсутствуют, что связано со сложностью идентификации и количественной оценки анаэробной и факультативно-анаэробной микробиоты. Решение данной проблемы является актуальным, поскольку полученные количественные данные позволят проводить динамическое наблюдение за состоянием больного, подбирать наиболее подходящую этиотропную терапию и в дальнейшем оценивать ее эффективность.

*Цель исследования* — оценка изменения качественного и количественного состава микробиоты пародонтальных карманов и слюны у больных хроническим генерализованным пародонтитом методом ПЦР в режиме реального времени.

#### Материал и методы

*Клинические образцы.* В исследование были включены 173 пациента (62 мужчины и 111 женщин) в возрасте от 29 до 74 лет, которые составили группу наблюдения. Из них 98 (56,6%) обратились за помощью впервые, 75 (43,4%) человек ранее лечились и посещали стоматологический кабинет не менее 1 раза в год. По данным анамнеза продолжительность заболевания составляла от нескольких месяцев до 15 лет. По степени тяжести у 137 (79,2%) пациентов диагностирован пародонтит средней степени тяжести, у 36 (20,8%) пациентов — пародонтит тяжелой степени.

Пациентам был проведен стандартный стоматологический осмотр с определением формы и степени поражения тканей пародонта, после чего назначалась одна из схем лечения: 1) ежедневное однократное введение антибиотика; 2) однократное терапевтическое воздействие ультразвуком при помощи прибора «Vector» («Durg Dental», Германия) на поверхности зубодесневых карманов и корня; 3) комплексная терапия, включающая ультразвуковое воздействие и антибиотикотерапию. Лечение проводилось в течение 10 дней.

Группу сравнения составили 65 практически здоровых пациентов (25 мужчин и 40 женщин) без сопутствующей патологии, после профилактической санации полости рта.

Материал для молекулярно-генетического исследования — содержимое пародонтальных карманов зубов и ротовая жидкость. Содержимое пародонтального кармана отбирали стерильным бумажным эндодонтическим штифтом (размер №25), который вводили пинцетом в пародонтальный карман в наиболее глубокие участки на 10 с и затем помещали в стерильную пла-

стиковую пробирку типа Eppendorf (1,5 мл), содержащую 1 мл физиологического раствора. Забор проводили в двух повторностях для каждого пациента. Хранили и транспортировали образцы в лабораторию при +4°C в течение 2 ч. Транспортировку партий проб в лабораторию осуществляли в термоконтейнерах с хладагентом. Молекулярно-генетическое исследование у пациентов проводили дважды — до и через 10 дней лечения по описанной схеме.

*Положительные контрольные образцы.* Положительные контрольные образцы получали встраиванием участков генов *16S rPHK* пародонтопатогенных микроорганизмов *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* в вектор pAL-TA («Евроген», Москва) с последующей трансформацией и наработкой плазмиды в клетках *E.coli* XL1—Blue.

*Определение концентрации ДНК.* Концентрацию нуклеиновых кислот в контрольных материалах определяли спектрофотометрически на флуориметре QUBIT («Invitrogen», США) с использованием коммерческого набора реагентов Quant-iT DNA HS («Invitrogen», США).

*Конструирование калибровочного образца.* Калибровочный образец конструировали с использованием в качестве ДНК-матрицы плазмиды pAL-TA (3,0 т.п.н.) со вставкой участка гена *16S rPHK Streptococcus sobrinus* (235 п.н.), в результате чего была получена плазмида pAL-TAstrSob16S. Клонирование проводили по Маниати Т. и соавт. [5]. Чистоту и концентрацию препарата ДНК определяли спектрофотометрически на флуориметре QUBIT. Концентрация двухцепочной ДНК составила 2,48 мкг/мл ( $7,08 \times 10^{11}$  копий ДНК/мл).

*Экстракция бактериальной ДНК.* ДНК бактерий выделяли из 50 мкл клинического материала (содержимое пародонтального кармана и ротовая жидкость) с использованием ионообменной смолы Chelex100.

*ПЦР-амплификация.* Для постановки ПЦР в режиме реального времени использовали подобранные и апробированные пары видоспецифичных праймеров к участкам ДНК *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus* [7] и реакционную смесь ПЦР-Микс SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»). ПЦР проводили с помощью детектирующего амплификатора CFX96 Touch «REAL TIME» («Bio-Rad», США). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager. Прибор калибровали тремя разведениями калибровочных образцов, приготовленных путем серийного разведения образца с плазмидой pAL-TAstrSob16S известной концентрации. Реакцию амплификации проводили в 25 мкл смеси, содержащей 10 мкл 2,5х реакционной смеси ПЦР-Микс SYBR Green I, 9 мкл ddH<sub>2</sub>O, 2 мкл каждого из пары праймеров и 2 мкл тотальной ДНК. Режим амплификации: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин; 35 циклов, включая денатурацию при 95°C — 10 с, отжиг праймеров при 59°C — 25 с, элонгацию при 72°C — 30 с; терминальная элонгация 72°C — 30 с. Дополнительно проводили электрофорез продуктов ПЦР в 1,7% агарозном геле в присутствии бромистого этидия.

#### Результаты и обсуждение.

*Определение объема жидкости, впитываемой бумажным эндодонтическим штифтом (размер №25).* Забор содержимого пародонтальных карманов с помощью стерильных бумажных эндодонтических штифтов (размер №25) является наиболее оптимальным способом

Таблица 1

**Объём жидкости, впитываемой эндодонтическим бумажным штифтом (размер №25) в зависимости от экспозиции (мкл)**

Тип жидкости	Дистиллированная вода			0,9% водный NaCl			Ротовая жидкость		
	1-я группа $M \pm \sigma$ (n = 20)	2-я группа $M \pm \sigma$ (n = 20)	3-я группа $M \pm \sigma$ (n = 20)	1-я группа $M \pm \sigma$ (n = 20)	2-я группа $M \pm \sigma$ (n = 20)	3-я группа $M \pm \sigma$ (n = 20)	1-я группа $M \pm \sigma$ (n = 20)	2-я группа $M \pm \sigma$ (n = 20)	3-я группа $M \pm \sigma$ (n = 20)
Время экспозиции (сек)	5	10	15	5	10	15	5	10	15
Средний объём жидкости (мкл)	0,50 ± 0,11	1,045 ± 0,171*,**	1,145 ± 0,089	0,495 ± 0,116	1,065 ± 0,162**,*	1,165 ± 0,085	0,52 ± 0,132	1,05 ± 0,175*,**	1,175 ± 0,088

Примечание. М — среднее значение, σ — стандартное отклонение; \* — различие со значением в первой группе достоверно (p < 0,01); \*\* — различие со значением в третьей группе достоверно (p < 0,01).

взятия материала для молекулярно-генетического исследования у больных пародонтитом, благодаря отличной абсорбирующей способности штифтов, возможности забора клинического материала определённого объёма и исключения травматизации тканей пародонта.

Количественную оценку впитывающей способности стерильного эндодонтического штифта проводили путём измерения сорбции дистиллированной воды, 0,9% водного раствора хлорида натрия (NaCl) и ротовой жидкости при трёх различных экспозициях: 5 с, 10 с и 15 с. Для этого при использовании стеклянного градуированного капилляра (до 100 мкл) и секундомера измеряли объём воды, поглощаемой штифтом, погруженным в воду на 5, 10 или 15 с. Бумажный штифт помещался на сухое плоское основание испытываемой стороной к капилляру, содержащему 100 мкл дистиллированной воды, который затем устанавливали нижним концом на испытуемый конец штифта, плотно прижав, для исключения просачивания жидкости. Эксперимент повторяли в трёх сериях и в 20 повторах — для каждой экспозиции в отдельности. По истечении времени экспозиции определяли объём поглощенной жидкости по уменьшению объёма воды в капилляре.

Средний объём впитываемой штифтом дистиллированной воды (1,045 ± 0,171 мкл), 0,9% водного раствора NaCl (1,065 ± 0,162 мкл), ротовой жидкости (1,05 ± 0,175 мкл) оказался практически одинаковым (табл. 1). Полученные при разной экспозиции объёмы свидетельствуют, что за 10 с штифт впитывает 1 мкл жидкого содержимого пародонтального кармана. Данного объёма клинического материала вполне достаточно для проведения ПЦР-анализа.

*Качественная оценка содержания пародонтопатогенных микроорганизмов в клинических образцах.* При исследовании содержимого пародонтальных карманов у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом методом ПЦР наблюдали высокую частоту встречаемости всех пародонтопатогенов, особенно видов *Streptococcus sobrinus* (72,3%), *Porphyromonas gingivalis* (47,9%) и *Streptococcus sanguis* (46,8%) (табл. 2). По сравнению с группой сравнения частота встречаемости указанных бактерий в содержимом пародонтальных карманов у больных пародонтитом была достоверно выше у видов *S. sobrinus* (на 27,7%,  $\chi^2 = 20,05$ , p < 0,001), *Porphyromonas gingivalis* (на 20,2%,  $\chi^2 = 16,08$ , p < 0,001) и *T. denticola* (на 14,1%,  $\chi^2 = 7,01$ , p < 0,001).

Относительно близкие данные по содержанию указанных микроорганизмов были получены при молекулярно-генетическом исследовании образцов слюны.

Наиболее часто обнаруживались *Streptococcus sobrinus* (61,3%), *Streptococcus sanguis* (30,1%) и *Porphyromonas gingivalis* (39,3%). Однако встречаемость пародонтопатогенных бактерий в слюне пациентов группы наблюдения была достоверно выше, нежели в группе сравнения, только для *S. sobrinus* (на 19,8%,  $\chi^2 = 17,3$ , p < 0,001) и *T. denticola* (на 14,3%,  $\chi^2 = 24,9$ , p < 0,001).

*Количественная оценка содержания пародонтопатогенных микроорганизмов в клинических образцах.* Исследования количественного содержания бактерий в выравненных по объёму клинических образцах определяли методом ПЦР в режиме реального времени в приборе, откалиброванном тремя разведениями рекомбинантной плазмиды pAL-TAStSob16S известной концентрации, что позволяло определять абсолютное количество генэквивалента ДНК возбудителя в образце (ГЭ/образец). По мере утяжеления клинических признаков заболевания наблюдалась тенденция к увеличению видового состава и количественного содержания бактерий в содержимом пародонтальных карманов и слюне. Количественная оценка содержания пародонтопатогенных микроорганизмов в группах больных хроническим генерализованным пародонтитом с разными схемами лечения позволила установить связь между нарушением баланса пародонтопатогенной и условно-патогенной микрофлоры полости рта и прогрессированием инфекционно-воспалительных процессов в тканях пародонта.

Таблица 2

**Частота выявления методом ПЦР пародонтопатогенных и условно-патогенных бактерий в содержимом пародонтального кармана и слюне у пациентов до лечения**

Виды бактерий	Группа наблюдения (n = 173)		Группа сравнения (n = 65)	
	СПК	Слюна	СПК	Слюна
	абс (%)	абс (%)	абс (%)	абс (%)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	83 (47,9)*	68 (39,3)	18 (27,7)	17 (26,2)
<i>Treponema denticola</i>	67 (38,7)*	54 (31,2)*	16 (24,6)	11 (16,9)
<i>Streptococcus oralis</i>	47 (27,2)	36 (20,8)	27 (41,5)	23 (35,4)
<i>Streptococcus sanguis</i>	81 (46,8)	104 (60,1)	31 (47,7)	26 (40,0)
<i>Streptococcus sobrinus</i>	125 (72,3)*	106 (61,3)*	29 (44,6)	27 (41,5)

Примечание. \* — различие со значениями в группе сравнения достоверно (p < 0,001)

Таблица 3

**Абсолютное количество патогенных и условно-патогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов и слюне у больных хроническим генерализованным пародонтитом после проведения системной антибиотикотерапии (ГЭ/образец), N = 55**

Бактерии	Содержимое пародонтальных карманов		Слюна	
	до лечения	ч/з 10 дней	до лечения	ч/з 10 дней
	Me (P <sub>0,05</sub> ; P <sub>0,95</sub> ), Lg ГЭ/образец			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	7,13 (4,05; 10,27)	3,36 (4,08; 8,46)*	9,05 (4,92; 14,3)	4,36 (2,54; 6,78)*
<i>Treponema denticola</i>	6,48 (3,11; 12,3)	4,71 (2,01; 8,16)*	9,26 (3,14; 13,47)	5,73 (3,47; 7,89)
<i>Streptococcus oralis</i>	9,84 (2,82; 12,13)	7,91 (2,56; 10,32)	9,81 (5,1; 14,01)	7,89 (4,12; 11,04)
<i>Streptococcus sanguis</i>	9,43 (3,57; 14,8)	7,11 (3,11; 8,67)	9,51 (4,72; 11,23)	7,03 (3,14; 10,3)
<i>Streptococcus sobrinus</i>	11,14 (4,18; 14,7)	7,53 (3,03; 9,52)	11,28 (4,67; 15,3)	7,41 (3,47; 10,27)

Примечание. Me — медиана, P<sub>0,05</sub>; P<sub>0,95</sub> — интерквартильный размах (5-95-й процентиля), \* — достоверность различий показателей в процессе лечения (p < 0,001)

Таблица 4

**Абсолютное количество патогенных и условно-патогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов и слюне у больных хроническим генерализованным пародонтитом после лечения прибором «Vector» (ГЭ/образец), N = 47**

Бактерии	Содержимое пародонтальных карманов		Слюна	
	до лечения	ч/з 10 дней	до лечения	ч/з 10 дней
	Me (P <sub>0,05</sub> ; P <sub>0,95</sub> ), Lg ГЭ/образец			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	9,2 (4,45; 13,04)	2,04 (1,82; 6,47)*	9,73 (5,12; 14,1)	2,15 (1,47; 5,78)*
<i>Treponema denticola</i>	10,89 (5,23; 12,81)	3,46 (2,57; 6,14)*	10,83 (5,14; 14,32)	3,59 (1,98; 8,47)*
<i>Streptococcus oralis</i>	9,94 (7,44; 15,86)	6,97 (4,7; 10,21)*	10,85 (7,41; 15,89)	7,83 (3,45; 9,04)*
<i>Streptococcus sanguis</i>	9,83 (6,57; 16,32)	7,52 (4,65; 9,74)	9,74 (7,47; 14,58)	7,62 (4,21; 9,86)*
<i>Streptococcus sobrinus</i>	10,18 (8,56; 15,32)	7,26 (4,36; 9,87)*	10,37 (7,69; 16,02)	8,18 (4,32; 10,5)

Примечание: Me — медиана, P<sub>0,05</sub>; P<sub>0,95</sub> — интерквартильный размах (5-95-й процентиля), \* — достоверность различий показателей в процессе лечения (p < 0,001)

Таблица 5

**Абсолютное количество патогенных и условно-патогенных бактерий в содержимом пародонтальных карманов и слюне у больных хроническим генерализованным пародонтитом после применения комбинированного лечения «Vector + антибиотикотерапия» (ГЭ/образец), N = 71**

Бактерии	Содержимое пародонтальных карманов		Слюна	
	до лечения	ч/з 10 дней	до лечения	ч/з 10 дней
	Me (P <sub>0,05</sub> ; P <sub>0,95</sub> ), Lg ГЭ/образец			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	9,02 (4,23; 15,02)	4,76 (2,14; 7,47)*	9,03 (7,45; 14,63)	4,0 (2,31; 7,04)*
<i>Treponema denticola</i>	10,4 (5,47; 14,29)	4,68 (3,04; 8,14)*	10,62 (5,13; 15,21)	4,92 (2,65; 8,01)
<i>Streptococcus oralis</i>	13,15 (8,1; 16,48)	7,99 (5,47; 9,64)*	13,38 (7,45; 15,68)	7,23 (3,54; 8,67)*
<i>Streptococcus sanguis</i>	14,92 (8,64; 17,01)	6,46 (3,78; 8,48)*	14,15 (8,09; 15,64)	6,63 (4,15; 8,57)*
<i>Streptococcus sobrinus</i>	13,92 (7,12; 17,14)	5,45 (2,31; 7,08)*	13,18 (7,35; 16,45)	5,64 (3,56; 8,45)

Примечание: Me — медиана, P<sub>0,05</sub>; P<sub>0,95</sub> — интерквартильный размах (5-95-й процентиля), \* — достоверность различий показателей в процессе лечения (p < 0,001)

В группе больных, проходивших курс системной антибиотикотерапии, наблюдалось статистически значимое снижение концентрации пародонтопатогенов *Porphyromonas gingivalis* в содержимом пародонтальных карманов (медиана — 10<sup>3,36</sup> ГЭ/образец) и в слюне (10<sup>4,36</sup> ГЭ/образец), а также *Treponema denticola* (10<sup>4,71</sup> ГЭ/образец) в содержимом пародонтальных карманов (табл. 3). По литературным данным, данные виды пародонтопатогенных микроорганизмов оказывают наиболее выраженное повреждающее действие на ткани пародонта. Установлено, что повышенная концентрация пародонтопатогена *Porphyromonas gingivalis* в микробиоценозах пародонтальных карманов коррелирует со степенью тяжести заболевания вследствие повышенных адгезивных, инвазивных и токсических свойств микроорганизма [3, 8, 9, 11].

Изучение микробиоценоза пародонтальных карманов и слюны в группе больных, протеченных ультразвуком при использовании прибора «Vector», показало существенное снижение абсолютного количества сразу нескольких пародонтопатогенов — *Porphyromonas gingivalis* как в содержимом пародонтальных карманов (медиана — 10<sup>2,04</sup> ГЭ/образец), так и в слюне (10<sup>2,15</sup> ГЭ/образец), *Treponema denticola* в содержимом пародонтальных карманов (10<sup>3,46</sup> ГЭ/образец) и слюне (10<sup>3,59</sup> ГЭ/образец), *Streptococcus oralis* в содержимом пародонтальных карманов (10<sup>6,97</sup> ГЭ/образец) и слюне (10<sup>7,83</sup> ГЭ/образец), *Streptococcus sanguis* только в слюне (10<sup>7,62</sup> ГЭ/образец) и *Streptococcus sobrinus* только в содержимом пародонтальных карманов (10<sup>7,26</sup> ГЭ/образец) (табл. 4). Проведённый анализ клинической эффективности применения прибора «Vector» показал, что по окончании терапии у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом наблюдалось улучшение состояния тканей пародонта, характеризующееся отсутствием таких симптомов, как болезненность и кровоточивость десен, отделяемое пародонтальных карманов. Полученные данные согласуются с рядом исследований, показывающих высокую клиническую эффективность использования прибора «Vector» в лечении пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта [1, 7, 10].

Включение в ультразвуковое лечение больных хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжёлой степени тяжести антибиотикотерапии позволило не только существенно снизить общую бактериальную нагрузку на ткани пародонта, но и значительно уменьшить частоту выявления

и количественное содержание в составе пародонтальных карманов и слюны всех исследованных пародонтопатогенов (табл. 5).

По окончании терапии отмечалось сокращение сроков купирования воспалительных процессов в десне и достижение стабильной ремиссии. Следовательно, терапевтическое воздействие ультразвуком при помощи прибора «Vector» на поверхности корня и зубодесневых карманов в сочетании с антибиотикотерапией приводит к эрадикации или к достоверному снижению абсолютного количества пародонтопатогенных микроорганизмов, а также восстановлению физиологической функции пародонта.

Таким образом, нами проведена работа по стандартизации выявления и количественного определения пародонтопатогенных микроорганизмов в клиническом материале (содержимое пародонтального кармана, слюны) методом ПЦР в режиме реального времени. Для оптимизации условий проведения анализа разработан способ получения клинических образцов известного объема, а также сконструирован калибровочный образец для получения достоверных результатов при диагностике пародонтита. В дальнейшем данный способ позволит проводить диагностику заболевания на ранних стадиях, а также оценивать в динамике развитие инфекционного процесса в тканях пародонта.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Вострикова С.А., Лепилин А.В., Карабушина Я.Г., Маклецова Е.К. Применение ультразвуковой системы «Vector» в лечении пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2008; 20(2): 132—6.
2. Грудянов А.И., Фоменко Е.Ф. *Этиология и патогенез воспалительных заболеваний пародонта*. М.: МИА; 2010.
3. Зорина О.А., Беркутова И.С., Рехвиашвили Б.А., Аймадинова Н.К. Сравнительная характеристика микробиоценозов пародонтальных карманов при хроническом генерализованном и агрессивном пародонтите до и после комплексного лечения. *Рос. стоматол. журн.* 2013; (1): 27—31.
4. Луцкая И.К. *Болезни пародонта*. М.: Медицинская литература; 2010.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование*. Пер. с англ. яз. под ред. А.А. Баева, К.Г. Скрыбина. М.: Мир, 1984.
6. Тмарова Э.Р., Баймиев А.Х., Швец К.Ю., Мавзютов А.Р. Молекулярно-генетическая характеристика видового состава микробиоты слюны и десневых карманов при пародонтите. *Клин. лаб. диагн.* 2015; 60(12): 56—9.
7. Тмарова Э.Р., Масагутова Н.Р. Молекулярно-генетическая характеристика микрофлоры полости рта при пародонтите. *Вестник Челябинского государственного университета*. 2013; 298(7): 70—1.
8. Braun A., Krause F., Hartschen V., Wolfgang F., Søren J. Efficiency of the Vector-system compared with conventional subgingival debridement in vitro and in vivo. *J. Clin. Periodontol.* 2006; 33: 568—14.
9. Conrads G., de Soet J.J., Song L., Henne K., Sztajer H., Wagner-Dobler I. et al. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *J. Oral. Microbiol.* 2014; 6: 1—3.
10. Corraini P., Baelum V., Pannuti C.M., Romito G.A., Aquino D.R., Cortelli S.C. et al. Subgingival microbial profiles as diagnostic markers of destructive periodontal diseases: A clinical epidemiology study. *Acta Odontol. Scand.* 2012; @3-56.
11. Hahn R. Therapy and prevention of periodontitis using the Vector-method. *Dtsch. Zahnarztl.* 2000; 109: 642—5.
12. Kneist S., Nietzsche S., Küpper H., Raser G., Willershausen B., Callaway A. Penetration of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus sanguinis* into dental enamel. *Anaerobe.* 2015; 35: 54—9.
13. Saraithong P., Pattanaporn K., Chen Z., Khongkhunthian S., Laohapensang P., Chhun N. et al. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* colonization and caries experience in 3- and 5-year-old Thai children. *Clin. Oral Invest.* 2015; 19(8): 1955.
14. Taba M., Kinney J., Kim A.S., Giannobile W.V. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent. Clin. N. Am.* 2005; 49(3): 551—71.
15. Thiha K., Takeuchi Y., Umeda M., Huang Y., Ohnishi M., Ishikawa I. Identification periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral. Microbiol. Immunol.* 2007; 22(3): 201—7.

1. Laohapensang P., Chhun N. et al. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* colonization and caries experience in 3- and 5-year-old Thai children. *Clin. Oral Invest.* 2015; 19(8): 1955.
14. Taba M., Kinney J., Kim A.S., Giannobile W.V. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent. Clin. N. Am.* 2005; 49(3): 551—71.
15. Thiha K., Takeuchi Y., Umeda M., Huang Y., Ohnishi M., Ishikawa I. Identification periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral. Microbiol. Immunol.* 2007; 22(3): 201—7.

#### REFERENCES

1. Vostrikova S.A., Lepilin A.V., Karabushina Y.G., Makletsova E.K. Use of an ultrasound system «Vector» in the treatment of patients with chronic generalized periodontitis. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2008; 20(2): 132—6. (in Russian)
2. Grudyanov A.I., Fomenko E.F. *Etiology and pathogenesis of inflammatory periodontal diseases*. Moscow: MIA; 2010. (in Russian)
3. Zorina O.A., Berkutova I.S., Rekhviashvili B.A., Aymadinova N.K. Comparative characteristics microbiocenoses periodontal pockets in chronic generalized aggressive periodontitis, and before and after the combined treatment. *Ros. stomatol. zhurn.* 2013; (1): 27—31. (in Russian)
4. Lutskaya I.K. *Periodontal Disease*. Moscow: Meditsinskaya literatura; 2010. (in Russian)
5. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning*. Transl. from Engl., edited by Baev A.A., Scriabin K.G. Moscow: Mir; 1984. (in Russian)
6. Tamarova E.R., Baymiev A.Kh., Shvets K.Yu., Mavzyutov A.R. Molecular genetic characteristics of the species composition of microbiota in saliva and gingival pockets in periodontitis. *Klin. lab. diagn.* 2015; 60(12): 56—9. (in Russian)
7. Tamarova E.R., Masagutova N.R. Molecular genetic characterization of oral microflora in periodontitis. *Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2013; 298(7): 70—1. (in Russian)
8. Braun A., Krause F., Hartschen V., Wolfgang F., Søren J. Efficiency of the Vector-system compared with conventional subgingival debridement in vitro and in vivo. *J. Clin. Periodontol.* 2006; 33: 568—14.
9. Conrads G., de Soet J.J., Song L., Henne K., Sztajer H., Wagner-Dobler I. et al. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *J. Oral. Microbiol.* 2014; 6: 1—3.
10. Corraini P., Baelum V., Pannuti C.M., Romito G.A., Aquino D.R., Cortelli S.C. et al. Subgingival microbial profiles as diagnostic markers of destructive periodontal diseases: A clinical epidemiology study. *Acta Odontol. Scand.* 2012; 3-56.
11. Hahn R. Therapy and prevention of periodontitis using the Vector-method. *Dtsch. Zahnarztl.* 2000; 109: 642—5.
12. Kneist S., Nietzsche S., Küpper H., Raser G., Willershausen B., Callaway A. Penetration of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus sanguinis* into dental enamel. *Anaerobe.* 2015; 35: 54—9.
13. Saraithong P., Pattanaporn K., Chen Z., Khongkhunthian S., Laohapensang P., Chhun N. et al. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* colonization and caries experience in 3- and 5-year-old Thai children. *Clin. Oral Invest.* 2015; 19(8): 1955.
14. Taba M., Kinney J., Kim A.S., Giannobile W.V. Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent. Clin. N. Am.* 2005; 49(3): 551—71.
15. Thiha K., Takeuchi Y., Umeda M., Huang Y., Ohnishi M., Ishikawa I. Identification periodontopathic bacteria in gingival tissue of Japanese periodontitis patients. *Oral. Microbiol. Immunol.* 2007; 22(3): 201—7.

Поступила 14.11.16,

Принята к печати 28.08.17

Bajmiev A.I.<sup>1,2</sup>, Shvec K.Yu.<sup>1</sup>, Mavzyutov A.R.<sup>1</sup>, Tamarova Je.R.<sup>1</sup>, Bulgakova A.I.<sup>1</sup>

#### QUANTITATIVE ANALYSIS OF THE MICROBIOTA OF PERIODONTAL POCKETS AND SALIVA BY PCR IN REAL TIME BEFORE AND AFTER TREATMENT OF PERIODONTITIS

<sup>1</sup>The Bashkir State Medical University of Minzdrav of Russia, 450008, Ufa, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center RAS, 450054, Ufa, Russia

Standardized detection and quantification of parodontopathogenic microorganisms in the clinical material (the contents of the periodontal pocket, saliva) using Real-Time PCR. To optimize the conditions for the analysis, a method for obtaining clinical samples of a known volume was developed, and a calibration sample was developed to obtain reliable results in the diagnosis of periodontitis.

**Key words:** *Periodontitis, Real-Time PCR, early diagnosis, evaluation of treatment effectiveness.*

**Для цитирования:** Баймиев Ал.Х., Швец К.Ю., Мавзютов А.Р., Тамарова Э.Р., Булгакова А.И. Количественный анализ микро-

биоты пародонтальных карманов и слюны методом ПЦР в режиме реального времени до и после лечения пародонтита. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология* 2017;35(3):103-108. DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-3-103-108.

**For correspondence:** *Aleksey H. Baymiev; Ph.D, Head of Laboratory, baymiev@mail.ru*

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 14.11.16

Accepted 28.08.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 578.832.1:578.53].083.33

*Петухова Г.Д., Лосев И.В., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г.*

## ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ, КОДИРУЮЩИХ ВНУТРЕННИЕ БЕЛКИ ВИРУСА ГРИППА А, НА ФОРМИРОВАНИЕ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У МЫШЕЙ

ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины», Санкт-Петербург, 197376, ул. Академика Павлова, д. 1; Россия

Данное исследование касается актуальной проблемы вакцинопрофилактики — разработки подходов к повышению иммуногенности гриппозных вакцин, и направлено на изучение влияния мутаций, ответственных за степень аттенуации вирусов гриппа, на формирование иммунного ответа. Проведён анализ гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей при введении штаммов вируса гриппа А, содержащих по одной и в комбинациях точечные мутации, характерные для донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), используемого в настоящее время для приготовления отечественной живой гриппозной вакцины. В ходе исследования 13 мутантных штаммов сравнивали с донором аттенуации (содержащим все эти мутации) и его «диким» предшественником (без мутаций).

Было показано, что присутствие во внутренних генах «дикого» вируса некоторых единичных мутаций, характерных для донора аттенуации, а также их комбинаций может влиять не только на количественные показатели гуморального иммунного ответа, но и на скорость накопления специфических к вирусу сывороточных и секреторных антител. Группа вирусов с мутациями в M1 гене выделялась по способности стимулировать Т-клеточный ответ. Перспективным подходом в отношении разработки способов повышения иммуногенных свойств живых гриппозных вакцин является дальнейший поиск сбалансированной комбинации мутаций в генах M1 и NS2, усиливающих стимуляцию большинства изученных факторов иммунного ответа, с мутациями в генах полимеразного комплекса, придающими штаммам аттенуирующие свойства.

**Ключевые слова:** *грипп, живая гриппозная вакцина, аттенуация, иммунитет*

**Для цитирования:** Петухова Г.Д., Лосев И.В., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г. Влияние отдельных мутаций в генах, кодирующих внутренние белки вируса гриппа А, на формирование гуморального и клеточного иммунного ответа у мышей. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология* 2017;35(3):108-114. DOI 10.18821/0208-0613-2017-35-3-108-114.

Грипп остается одной из центральных проблем современной вирусологии. Ежегодно от этой инфекции умирают до полумиллиона человек по всему миру [1]. На сегодняшний день наиболее эффективным методом борьбы с гриппозной инфекцией признана вакцино-

профилактика [2]. Основной целью любой вакцинации является формирование иммунологической памяти, обеспечивающей быстрый и эффективный иммунный ответ при последующем контакте организма с циркулирующим вирусом. В случае гриппозной инфекции особенно актуальна стимуляция иммунного ответа в верхних отделах дыхательного тракта, так как именно слизистые оболочки верхних дыхательных путей являются первым и наиболее значимым барьером на пути проникновения респираторных инфекций [3]. В отношении индукции локального иммунитета наибольшей эффективностью обладают интраназальные живые гриппозные вакцины [4], в состав которых входят штаммы вирусов гриппа, аттенуированные (ослабленные) путем генетической реассортации актуальных циркулирующих вирусов с холодоадаптированным донором аттенуации. Однако аттенуация вирусов гриппа, происходящая в результате появления различных мутаций в его внутренних генах, может приводить к снижению их иммуногенности [5].

Наши предыдущие исследования показали, что процесс аттенуации вирусов гриппа методом генетической реассортации приводит к снижению некоторых параметров первичного и вторичного системного иммунного ответа у мышей [6]. Однако общие показатели локального иммунного ответа в НАЛТ (назоассоциированной лимфоидной ткани) на аттенуированный вирус остаются на том же уровне, что и при введении патогенного штамма [7]. В ходе дальнейшего экспериментального исследования индукции у мышей специфических к вирусу гриппа А (H1N1) CD8+CD44hi Т-лимфоцитов памяти, нами была доказана способность аттенуированного реассортантного вируса увеличивать уровни Т-клеток памяти в НАЛТ мышей, однако в меньшей степени, чем патогенный вирус [8].

Отечественный донор аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) отличается от своего «дикого» предшественника рядом мутаций в генах, кодирующих внутренние белки. Процедура аттенуации штаммов вируса гриппа неизбежно сопровождается изменением качественных и количественных характеристик их иммуногенности по сравнению с естественной инфекцией. Молекулярные механизмы аттенуации вирусов гриппа для производства живых гриппозных вакцин активно изуча-

**Для корреспонденции:** Петухова Галина Дмитриевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» (197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, д. 12) e-mail: gala\_iem@gmail.com