

**Шибалева А.В.^{1,2}, Айвазова Р.А.³, Ребриков Д.В.^{4,5}, Трубникова Е.В.^{6,7}, Кудыкина Ю.К.²,
Белякова А.В.², Заринова Р.С.⁸, Шевелев А.Б.²**

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБИОМА ПАРОДОНТА У ПАЦИЕНТОВ С СОЧЕТАННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ ГАСТРОДУОДЕНАЛЬНОЙ ЗОНЫ И ХРОНИЧЕСКИМ ПАРОДОНТИТОМ

¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, РФ, 119334, Москва; ²ФГБУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН, РФ, 142782, Москва; ³Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, РФ, 127006, Москва; ⁴ЗАО «НПФ ДНК-Технология», РФ, 115478, Москва; ⁵ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, РФ, 119991, Москва; ⁶ФГБОУ ВПО Курский государственный университет, РФ, 305000, Курск; ⁷Курский государственный медицинский университет, РФ, 305041, Курск; ⁸ФГБОУ ВПО Набережночелнинский институт социально-педагогических технологий и ресурсов, РФ, 125993, Набережные Челны

С применением метода ПЦР в реальном времени (набор Дентофлор) проанализирована выборка из 54 пациентов с различной степенью выраженности хронического пародонтита, включающая 38 больных хроническим гастритом. Впервые показано, что пародонт мужчин как в норме, так и при хроническом пародонтите существенно более колонизирован *Treponema denticola*, чем пародонт женщин. Показано, что на пародонте больных хроническим гастритом обнаруживается существенно больше геномной ДНК человека, чем у лиц без гастрита. Методами непараметрической статистики показана высокая ассоциация колонизации пародонта бактериями *T. forsythensis* и *T. denticola*, но не *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia* с развитием хронического пародонтита.

Ключевые слова: микробиом; пародонт; гастрит; ПЦР-РВ; Дентофлор; *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Porphyromonas gingivalis*; *Prevotella intermedia*; *Tanarella forsythensis*; *Treponema denticola*.

DOI 10.18821/0208-0613-2016-34-1-26-30

Пародонтит наравне с другими широко распространенными заболеваниями относят к комплексным мультифакторным заболеваниям. Хронический пародонтит представляет собой медленно прогрессирующий процесс, в конечном итоге приводящий к утрате зубодесневого прикрепления. Возникновение и скорость прогрессии пародонтита являются следствием сочетания трех факторов: состояния пародонтопатогенной микрофлоры, факторов окружающей среды [1] и индивидуального генетического профиля [2, 3].

Роль генетического компонента в развитии хронического пародонтита установлена путем исследования близнецов в работах Б. Михаловича и соавт., которые оценили ряд параметров, связанных с пародонтитом (глубину десневых карманов, десневой индекс и индекс зубного налета) у 110 взрослых близнецов и пришли к выводу, что от 38 до 82% популяционной изменчивости данных параметров являются генетически обусловленными [2]. Роль состава микробиома пародонта и факторов среды также исследованы во многих работах [4, 5]. Однако механизм взаимного влияния всех трех факторов остается неясным и редко служит предметом экспериментального исследования.

Современные высокопроизводительные методы молекулярного анализа – метагеномное секвенирование, гибридизация на микрочипах высокой плотности и ПЦР в реальном времени – позволяют в короткий срок получать большие объемы количественных данных о составе микробиома пародонта, пригодные для статистической обработки. Исключительная сложность состава микро-

биома пародонта в сочетании с необходимостью учета временной динамики развития болезни при диагностике пародонтита затрудняют формирование релевантных выборок больных. Это затруднение в первую очередь касается точной дифференциации больных агрессивным и хроническим пародонтитом при первичном стоматологическом осмотре. Однако не исключено, что решение этой проблемы могло бы привести к выделению нескольких нозологических форм хронического пародонтита, каждая из которых характеризуется своим набором этиологических факторов. Решение этой задачи является насущным, потому что практически все население Земли за небольшим исключением к определенному возрасту приобретает поражения пародонта. Изучение генетических факторов предрасположенности к хроническому пародонтиту в целом, без разделения его на подтипы, оказывается технически невозможным по причине отсутствия адекватной группы сравнения. В то же время наблюдаемое положение отнюдь не позволяет сделать вывод об отсутствии генетической предрасположенности к хроническому пародонтиту.

В настоящее время исследователям доступен набор Дентофлор (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), позволяющий получать количественные данные о представленности на пародонте 5 видов бактерий, известных как компоненты «оранжевого» и «красного» комплекса пародонтопатогенов по Сокранскому [6].

Целью настоящей работы являлось изучение характера зависимости клинических характеристик больных хроническим генерализованным пародонтитом с сочетанной патологией гастродуоденальной зоны от состава микробиома их пародонта. Полученные данные предназначены, в первую очередь, для выработки подходов к формированию выборок пациентов с различными нозоформами пародонтита. Решение этой задачи в будущем должно позволить выявить новые факторы, определяющие риск развития пародонтита.

Поскольку многие переменные генетические факторы человека способны оказывать влияние на его устойчивость/чувствительность к различным заболеваниям, особенно многофакторным, в исследование были включены больные пародонтитом, у части которых имелась еще и хронический гастрит. В развитии хронического гастрита существенный вклад вносит инфекция бактерией *Helicobacter pylori*. Кроме того, как пародонтит, так и хронический гастрит, поражая морфологически не связанные органы, оказывают непосредственное влияние на работу желудочно-кишечного тракта. Таким образом, исследуя факторы, одновременно влияющие на развитие пародонтита и хронического гастрита, мы облегчаем наблюдение за системными эффектами, за-

трагивающими работу всего организма. Этот подход может оказаться полезным для формирования выборок по новым принципам, позволяющим ускорить выявления новых генетических факторов предрасположенности к хроническому пародонтиту.

Материалы и методы

Клинический материал был собран на базе МГМСУ им. А.И. Евдокимова. Было обследовано 54 пациента из Москвы и Московской области в возрасте от 22 до 81 года без тяжелой соматической патологии. Для 28 пациентов были дополнительно исследованы повторно взятые образцы, в результате чего общее число образцов составило 78.

Основным критерием для постановки диагноза хронический генерализованный пародонтит (ХГП) являлось отсутствие зубодесневого прикрепления. Степень тяжести устанавливали на основании глубины пародонтальных карманов и степени деструкции костной ткани.

Так, для легкой степени ХГП глубина пародонтальных карманов составляла до 3 мм, а рентгенологическая картина подтверждала признаки начальной деструкции межзубных перегородок.

При средней степени ХГП глубина пародонтальных карманов варьировала от 3 до 6 мм, а при обследовании зачастую выявляли патологическую подвижность зубов 1–2-й степени. Деструкция кортикальной пластинки и костной ткани межзубных перегородок при рентгенологическом исследовании составляла до ½ длины корня.

Тяжелая степень ХГП характеризовалась наличием пародонтальных карманов более 6 мм, патологической подвижностью зубов 2–3-й степени, а при рентгенологическом исследовании выявляли деструкцию кортикальной пластинки и костной ткани на протяжении 50–70% длины корня. Клинические данные о состоянии пародонта пациентов выражали в баллах, как описано в работе [7]: степень заболевания (от 1 до 5), глубина пародонтального кармана (от 0 до 4), гноетечение (от 0 до 2), подвижность (от 0 до 3), кровоточивость (от 0 до 3). Возраст пациентов учитывался путем включения их в одну из групп: 20–30, 30–40, 40–50, 50–60, 60–70 или 70–80 лет.

В исследуемой выборке находилось 38 пациентов с диагнозом «хронический гастрит» и 16 пациентов без заболеваний ЖКТ.

Смывы из пародонтальных карманов исследовали, отбирая содержимое из наиболее глубоких участков с помощью стерильных бумажных эндодонтических штифтов (размер №25), которые затем помещали в пробирку с реактивом «Проба-Рапид» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) объемом 0,5 мл и транспортировали в лабораторию в охлажденном состоянии, в течение 6 ч. Забор проводили в двух повторностях от каждого пациента, на стадии выделения ДНК и проведения ПЦР-анализа каждая повторность обрабатывалась отдельно.

Суммарную ДНК пародонтального смыва пациентов выделяли при помощи набора реагентов «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) в соответствии с инструкцией к набору реагентов. Препарат ДНК, соответствующий 1/10 объема одного смыва (50 мкл), растворяли в 50 мкл элюирующего раствора (комплектация «Проба-ГС»). В качестве матрицы для проведения одной ПЦР-реакции использовали 5 мкл полученного препарата.

Для количественного определения соотношения пародонтопатогенных бактерий полости рта служил метод полимеразной цепной реакции «в реальном времени» (ПЦР-РВ). В работе использовали коммерчески доступный набор реагентов Дентофлор (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), включающий специфичные праймеры и специфичные флуоресцентно меченые разрушаемые зонды (типа TaqMan) к (1) последовательностям консервативных участков гена 16S рДНК («общая бактериальная масса»); (2) уникальным геномным последовательностям пяти пародонтопатогенных бактерий: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) и *Treponema denticola*; (3) хромосомной ДНК человека (ВКМ). ПЦР-РВ проводили с помощью детектирующего амплификатора «ДТ-322» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Учет резуль-

татов реакции в виде параметра Ct («пороговый цикл») проводили с помощью программного обеспечения детектирующего амплификатора «ДТ-322». Каждое определение проводили для двух независимо полученных препаратов ДНК от одного пациента, результаты усредняли при условии разброса значений Ct в пределах серии не более чем на один цикл.

С целью нормировки сигнала (учета разброса в количестве взятого биоматериала и эффективности экстракции ДНК) для каждого образца определяли величину «относительного Ct». Для этого из величины абсолютного Ct для специфического набора праймеров и зонда, усредненного по двум образцам одной серии, вычитали усредненную величину Ct общей бактериальной массы для тех же двух образцов серии. Статистической обработке подвергали данные, выраженные в форме относительного Ct.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Statistica 8,0 для Windows, по стандартным методикам вариационной статистики. В случае нормального распределения величин в выборках сравнение проводили путем анализа значений *t*-критерия Стьюдента и F-критерия Фишера. В случае нарушения нормальности распределения величин внутри выборок использовали непараметрические критерии Краскала–Уоллиса и Манна–Уитни. При анализе взаимосвязей внутри пары количественных или порядковых качественных признаков использовали корреляционный анализ по методу Спирмана. Во всех случаях уровень статистической значимости принимали за 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

Результаты проведенного исследования представлены в табл. 1.

Неожиданным результатом, полученным при использовании непараметрического критерия Манна–Уитни, стало наблюдение, что пародонт мужчин (средняя величина Ct = 6,5) содержит приблизительно в 60 раз больше *T. denticola*, чем пародонт женщин (средняя величина Ct = 12,1). Высокая статистическая достоверность этого вывода подтверждается малой величиной $p = 0,0069$ (при используемом $p \leq 0,05$).

Еще одним практически важным выводом, непосредственно затрагивающим цель работы, является наблюдение, что на пародонте пациентов с хроническим гастритом содержится в среднем в 30 раз большее количество собственной ДНК человека (средняя величина Ct = 11,8), чем на пародонте лиц без гастрита (средняя величина Ct = 16,9), статистическая достоверность этого вывода подтверждается величиной $p = 0,02$.

Прочие исследованные параметры не давали настолько ярких различий, поэтому для них было проведено перекрестное изучение взаимосвязей для всех подвыборок с применением как параметрических, так и непараметрических методов анализа. С учетом существенного отклонения большинства распределений от нормального, вызванного преобладанием в выборках лиц старшего возраста, наилучшее разрешение было получено с применением непараметрических методов анализа. Обобщенные данные этого анализа представлены в виде корреляционной матрицы, рассчитанной по методу Спирмана (табл. 2).

Данные табл. 2 в совокупности с вышеуказанными данными позволяют сделать ряд выводов и предположений:

1) Наиболее значимую корреляцию со степенью выраженности хронического пародонтита показывают виды *T. forsythensis* и *T. denticola*. Можно предполагать, что именно они вносят основной вклад в развитие болезни у исследованной выборки пациентов. Эти данные соответствуют выводам опубликованных работ [8, 9]. Интересно, что, согласно результатам этих работ, данные виды не являются доминирующими в развитии агрессивного пародонтита.

2) При использовании в качестве маркера заболева-

Данные клинического и молекулярного анализа больных

Инд. номер пациента	Клинические данные								Результаты RT-PCR (относительные Ct)						
	Пол	Возраст, лет	Степень заболевания	Хронический гастрит	Глубина кармана	Гноеечение	Подвижность	Кровоточивость	Общая бакт. масса	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Tannerella forsythensis</i>	<i>Treponema denticola</i>	ДНК человека
1	м	27	2	+	2	0	0	3	21,6	7,5	5,9	8,9	7,7	9,2	6,0
2	м	61	4		2	2	0	3	22,0	н.о.	2,3	6,1	4,1	3,1	н.о.
4	м	58	2	+	1	0	0	1	22,1	н.о.	2,0	н.о.	4,6	5,5	7,6
6	м	30	1	+	1	0	0	1	24,3	7,0	10,9	13,3	10,9	4,7	5,9
7	м	43	4	+	2	0	1	1	23,8	н.о.	7,2	4,7	9,7	4,2	13,1
8	м	55	4		2	0	0	0	21,4	6,4	н.о.	20,8	13,9	4,7	7,5
9	ж	49	4	+	2	0	2	1	23,1	н.о.	2,9	7,3	6,9	6,6	12,7
10	ж	52	3		2	0	0	2	23,1	н.о.	н.о.	н.о.	3,9	н.о.	8,6
11	ж	55	4	+	2	0	0	0	23,2	1,9	2,1	15,8	5,1	4,4	6,3
12	м	57	4		2	0	2	1	24,3	16,4	н.о.	н.о.	3,7	4,6	н.о.
13	ж	62	3	+	2	0	1	0	21,3	н.о.	13,2	14,6	13,8	13,8	7,9
15	ж	58	4	+	2	2	0	3	22,5	9,2	0,3	8,1	2,8	2,5	15,6
16	ж	62	4	+	2	1	3	3	20,5	7,6	1,1	11,8	3,6	4,2	14,7
17	м	22	1	+	0	0	0	2	28,9	н.о.	8,0	10,5	н.о.	н.о.	0
19	м	-	1	+					23,1	0	15,1	н.о.	12,9	11,8	2,8
20	м	60	3	+	2	0	0	2	23,3	н.о.	15,1	10,9	8,6	6,3	7,1
21	м	50	2	+	1	0	0	1	26,4	н.о.	н.о.	н.о.	3,8	6,2	6,5
22	ж	56	2	+	1	0	0	1	27,2	н.о.	13,8	н.о.	8,6	12,7	4,5
23	ж	58	3	+	2	0	1	2	22,8	н.о.	9,4	н.о.	6,8	7,5	6,6
24	ж	52	3		2	0	3	2	23,1	н.о.	0,0	10,4	3,1	8,1	8,4
25	м	55	2		2	0	0	2	26	н.о.	0,6	7,9	4,3	4,3	6,2
28	ж	37							24,1	н.о.	н.о.	7,7	5,5	н.о.	10,7
29	м	60	3	+	1	0	0	1	24,8	н.о.	9,5	5,7	4,5	4,1	н.о.
31	м	80	4	+	2	0	2	3	20,9	н.о.	1,2	7,5	6,5	3,2	14,4
33	м	57	4	+	2	1	2	3	20,8	н.о.	0	10,9	2,8	7,2	8,0
34	м	25	2	+	2	0	0	3	24,5	н.о.	н.о.	17,2	3,8	6,3	8,1
37	ж	73	4	+	2	0	2	3	24,6	6,4	0,6	5,0	3,2	2,4	12,9
40	м	23	4		2	0	2	1	21,5	9,5	1,8	4,5	2,8	4,2	14,7
41	ж	29	4	+	3	0	3	3	24,8	11,4	0,0	н.о.	1,0	7,8	9,1
42	ж	44	4	+	2	0	3	3	24,8	н.о.	н.о.	н.о.	5,1	2,3	н.о.
43	ж	81	4	+	1	0	1	2	26,4	н.о.	н.о.	н.о.	4,9	н.о.	н.о.
44	м	46	4	+	2	1	3	3	21,9	н.о.	4,7	н.о.	3,4	3,2	15,5
45	м	60	4	+	3	0	2	3	22,7	н.о.	0,5	4,3	4,2	2,0	12,5
46	ж	44	2	+	1	0	0	2	22,4	н.о.	н.о.	н.о.	9,2	н.о.	н.о.
48	ж	51	4		2	0	3	3	21,7	н.о.	13,7	3,7	14,1	10,0	н.о.
49	ж	43	3		2	0	3	1	25,8	н.о.	7,0	н.о.	0,5	н.о.	н.о.
50	м	61	4		2	0	3	2	23,5	н.о.	0,4	н.о.	1,6	1,4	н.о.
52	ж	31	3	+	1	0	0	3	22,8	н.о.	н.о.	н.о.	11,1	12,8	7,6
53	м	34	4	+	2	2	2	3	21,9	н.о.	0,3	9,9	2,9	8,4	3,9
54	ж	33	1	+		0	0	0	23,7	н.о.	5,8	4,4	7,5	8,1	4,0
55	ж	48	3		2	0	0	1	23,9	7,5	10,2	6,7	4,2	7,6	13,8
56	ж	32	2		1	1	0	3	26,6	2,5	н.о.	6,5	3,2	4,6	н.о.
59	м	44	4	+	2	0	3	3	22,1	н.о.	1,4	7,4	2,5	2,7	16,0
62	м	36	3	+	2	0	0	1	22,9	н.о.	н.о.	н.о.	9,5	12,0	13,5
65	м	56	4		2	2	3	3	21,3	н.о.	н.о.	н.о.	10,3	9,5	16,7
67	м	36	5	+	2	0	2	3	22,3	н.о.	1,7	6,2	0,7	4,8	н.о.
68	м	54	4	+	2	1	0	3	23,3	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.	10,3	н.о.
69	ж	34	2	+	1	0	0	1	21	н.о.	3,5	4,8	4,2	5,2	19,8
70	м	55	4	+	1	2	3	3	24,8	н.о.	0	8,8	1,8	5,0	15,5
71	ж	36	3	+	2	0	2	1	24,1	н.о.	н.о.	н.о.	17,6	н.о.	12,1
72	ж								24	3,2	3,1	8,6	4,1	10,9	14,6
74	м	46	5		2	0	0	0	25,6	н.о.	н.о.	12,1	3,6	4,2	н.о.
76	ж	55	3	+	2	0	2	1	29,1	н.о.	н.о.	н.о.	9,8	н.о.	2
78	ж	46	4	+	1	0	2	2	22,7	н.о.	н.о.	13,9	4,6	8,7	11,3

Таблица 2

Корреляционная матрица параметров для всей группы больных, рассчитанная по методу Спирмана (указаны значения коэффициентов корреляции и в скобках уровень статистической значимости для них)

	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>T. forsythensis</i>	<i>T. denticola</i>	ДНК человека
Возраст, годы	-0,03 (0,85)	-0,18 (0,21)	0,07 (0,60)	-0,04 (0,80)	-0,28 (0,05)	0,16 (0,25)
Степень заболевания	-0,22 (0,13)	<u>-0,26 (0,06)</u>	-0,12 (0,4)	<u>-0,34 (0,01)</u>	<u>-0,42 (0,001)</u>	0,47 (0,001)
Хронический гастрит	-0,18 (0,42)	0,01 (0,96)	-0,06 (0,78)	<u>-0,38 (0,08)</u>	-0,24 (0,28)	0,54 (0,01)
Глубина пародонтального кармана	-0,23 (0,11)	<u>-0,30 (0,03)</u>	-0,09 (0,52)	-0,21 (0,14)	<u>-0,25 (0,08)</u>	0,03 (0,84)
Гноетечение	<u>-0,24 (0,09)</u>	<u>-0,24 (0,09)</u>	-0,11 (0,45)	<u>-0,25 (0,08)</u>	-0,15 (0,29)	0,21 (0,15)
Подвижность	-0,03 (0,83)	<u>-0,36 (0,01)</u>	0,04 (0,78)	<u>-0,38 (0,01)</u>	-0,14 (0,33)	0,29 (0,04)
Кровоточивость	-0,19 (0,18)	<u>-0,30 (0,03)</u>	-0,16 (0,27)	<u>-0,30 (0,03)</u>	-0,20 (0,15)	0,22 (0,12)
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,00	0,31 (0,02)	0,29 (0,03)	0,10 (0,48)	0,27 (0,05)	-0,01 (0,96)
<i>P. gingivalis</i>	-	0,00	0,46 (0,001)	0,50 (0,001)	0,43 (0,001)	0,08 (0,55)
<i>P. intermedia</i>	-	-	0,00	0,15 (0,27)	0,42 (0,001)	-0,11 (0,43)
<i>T. forsythensis</i>	-	-	-	0,00	0,47 (0,001)	-0,37 (0,01)
<i>T. denticola</i>	-	-	-	-	0,00	-0,32 (0,02)
ДНК человека	-	-	-	-	-	0,00

Примечание. Взаимосвязи между признаками признаются статистически значимыми при $p \leq 0,05$; соответствующие этому критерию ячейки таблицы закрашены серым. Приближающиеся к этому значению величины в диапазоне от 0,05 до 0,1 выделены курсивом и подчеркнуты.

ния *T. denticola* необходимо отдельно анализировать выборки мужчин и женщин, так как в норме представленность этого вида на пародонте существенно зависит от пола.

3) Один из массовых обитателей пародонта человека *P. gingivalis*, включенный в «оранжевый комплекс» по Сокранскому, по-видимому, не является существенным этиологическим фактором хронического пародонтита, а лишь эффективно использует для своего размножения полости пародонтальных карманов. На это указывает отсутствие корреляции его численности с клиническими параметрами «степень заболевания», «гноетечение» и «кровоточивость» при наличии корреляции с подвижностью зубов, глубиной карманов и наличием на пародонте опасного патогена *A. actinomycetemcomitans*.

4) Представленность на пародонте *P. intermedia* по результатам исследования не коррелирует с развитием хронического пародонтита, хотя, по данным работ [8, 9], является значимым фактором развития агрессивного пародонтита.

5) Повышение количества собственной геномной ДНК человека на пародонте, безусловно, является негативным признаком, свидетельствующим об ухудшении состояния как пародонта, так и состояния здоровья пациента в целом. Удивительно, что повышение количества ДНК в пародонтальном смыве не коррелирует с гноетечением, несмотря на высокое удельное содержание ДНК в нейтрофилах и легкость их попадания в смыв по сравнению с эпителиальными клетками. Таким образом, происхождение геномной ДНК человека, попадающей в смывы, остается не вполне ясным. Не исключено, что она представляет собой продукт апоптоза клеток пародонта, индуцированного специфическими клеточными реакциями, протекающими в ходе развития заболевания.

Работа выполнена при частичной поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (ГК 12188р/23099) и Министерства образования и науки РФ (государственное задание № 19.1724.2014/К в сфере научной деятельности).

ЛИТЕРАТУРА

- Borrell L.N., Papapanou P.N. Analytical epidemiology of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2005; 32 (Suppl. 6): 132–58.
- Michalowicz B.S., Aeppli D., Virag J.G., Klamp D.G., Hinrichs J.E. et al. Periodontal findings in adult twins. *J. Periodontol.* 1991; 62 (5): 293–9.
- Michalowicz B.S., Diehl S.R., Gunsolley J.C. et al. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J. Periodontol.* 2005; 71 (11): 1699–707.
- Colombo A.P., Bennet S., Cotton S.L., Goodson J.M., Kent R. et al. Impact of periodontal therapy on the subgingival microbiota of severe periodontitis: comparison between good responders and individuals with refractory periodontitis using the human oral microbe identification microarray. *J. Periodontol.* 2012; 83: 1279–87.
- Lazarevic V., Whiteson K., Huse S., Hernandez D., Farinelli L. et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J. Microbiol. Meth.* 2009; 79 (3): 266–71.
- Ximénez-Fyvie L.A., Haffajee A.D., Socransky S.S. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2000; 27 (9): 648–57.
- Armitage G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.* 1999; 4: 1–6.
- Heller D., Silva-Boghossian C.M., do Souto R.M., Colombo. Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. *Arch. Oral Biol.* 2012; 57: 973–80.
- Oettinger-Barak O., Sela M.N., Sprecher H., Machtei E.E. Clinical and microbiological characterization of localized aggressive periodontitis: a cohort study. *Austral. Dent. J.* 2014; 59 (2): 165–71.

Поступила 25.08.14

USE OF THE REAL-TIME PCR FOR STUDY OF THE PERIODONTAL MICROBIOME IN PATIENTS WITH COMBINED PATHOLOGY OF GASTRODUODENAL ZONE AND CHRONIC PERIODONTITIS

^{1,2} Shibaeva A. V., ³ Ayvazova R. A., ^{4,5} Rebrikov D. V., ^{6,7} Trubnikova E. V., ³ Kudykina Yu. K., ³ Belyakova A. V., ⁸ Zaripova R. S., ³ Shevelev A. B.

¹Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ²Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia; ³Evdokimov Moscow State Medico-Stomatological University, Moscow, Russia; ⁴DNA-Technology LLC, Moscow, Russia; ⁵Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ⁶Kursk State University, Kursk, Russia; ⁷Kursk State Medical University, Kursk, Russia; ⁸Naberezhnye Chelny Institute of Social Pedagogical Technologies and Resources, Naberezhnye Chelny, Russia

The total of 54 patients with chronic periodontitis of different severity was tested using real-time PCR (Dentoflor kit). The group included 38 patients with chronic gastritis. For the first time, a higher prevalence of *Treponema denticola* in periodontium of males in comparison with females was demonstrated. The patients with chronic gastritis had more human genome DNA at their periodontium than healthy individuals. Non-parametric statistical analysis demonstrated high association of periodontium colonization with *T. forsythensis* and *T. denticola* (but not

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia*) with the severity of the chronic periodontitis.

Key words: *microbiome, periodontium, gastritis, real-time PCR, dentoflor, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Tannerella forsythensis, Treponema denticola*

DOI 10.18821/0208-0613-2016-34-1-26-30

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 579.873.21:579.253]:577.21.083

Вязовая А.А.¹, Мокроусов И.В.¹, Журавлев В.Ю.², Соловьева Н.С.², Оттен Т.Ф.², Маничева О.А.², Вишневский Б.И.², Нарвская О.В.^{1,2}

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ РОССИИ

¹ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, 197101, Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУ НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, 191036, Санкт-Петербург, Россия

Целью исследования являлось получение генотипической характеристики мультирезистентных (т. е. устойчивых, по крайней мере, к рифампицину и изониазиду) штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, выделенных в 2011–2012 гг. от больных туберкулезом на северо-западе России. Споллиготипирование 195 штаммов *M. tuberculosis* выявило их принадлежность к генетическим семействам Beijing ($n = 162$), LAM ($n = 15$), H3/URAL ($n = 14$), а также T, Haarlem и X. Среди 14 споллиготипов преобладали SIT1 (Beijing), SIT42 (LAM) и SIT262 (H3/URAL). Независимо от генотипа все изученные штаммы *M. tuberculosis* были устойчивы к стрептомицину. Мультирезистентность включала устойчивость к этионамиду (56%), амикацину (31%), канамицину (40%) и капреомицину (33%). Доля устойчивых к этамбутолу штаммов Beijing и non-Beijing составляла 71% ($n = 115$) и 42% ($n = 14$) ($p < 0,05$) соответственно. Среди мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis* на северо-западе России продолжают доминировать представители генетического семейства Beijing (83%).

Ключевые слова: *M. tuberculosis*; мультирезистентность; споллиготипирование; генотип Beijing.

DOI 10.18821/0208-0613-2016-34-1-30-33

Одной из причин неблагоприятной глобальной эпидемической ситуации по туберкулезу является распространение так называемых мультирезистентных (англ. multidrug-resistant, MDR) штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), которая характеризуется наличием одновременной устойчивости к наиболее эффективным противотуберкулезным препаратам (ПТП) первого ряда – изониазиду и рифампицину. В 2013 г. в мире было выявлено около 480 000 случаев туберкулеза с МЛУ возбудителя [1]. По оценкам ВОЗ, примерно у 9% этих пациентов был диагностирован туберкулез с широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ), т. е. МЛУ в сочетании с устойчивостью к фторхинолонам и одному из инъекционных препаратов второго ряда (канамицин, амикацин, капреомицин).

Несмотря на снижение заболеваемости туберкулезом в Северо-Западном Федеральном Округе (СЗФО) Российской Федерации (РФ) с 57,5 в 2010 г. до 52,2 на 100 тыс. населения в 2012 г., каждый четвертый новый случай был обусловлен МЛУ-штаммом возбудителя [2]. Так, в 2012 г. распространенность туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя

составила 21,2 на 100 тыс. населения (РФ – 24,3), в том числе среди впервые зарегистрированных больных – 4,4 (РФ – 4,0) (mednet.ru).

Использование молекулярно-генетических методов позволяет оценить частоту определенных генотипов в структуре популяции *M. tuberculosis*, в частности среди МЛУ штаммов.

Цель исследования состояла в получении генотипической характеристики мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis*, выделенных в 2011–2012 гг. от больных туберкулезом на северо-западе России.

Материалы и методы

Изучены штаммы *M. tuberculosis*, выделенные от больных легочным ($n = 142$) и внелегочным ($n = 53$) туберкулезом в Санкт-Петербурге и Ленинградской области в 2011–2012 гг. Культивирование микобактерий на среде Левенштейна–Йенсена и определение лекарственной устойчивости изолятов к ПТП осуществляли стандартным непрямым методом абсолютных концентраций в соответствии с Инструкцией по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза [Приказ Министерства здравоохранения РФ № 109 от 21 марта 2003 г.] и с помощью автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960. Хромосомную ДНК выделяли из чистых культур *M. tuberculosis* [3]. Генотипирование изолятов *M. tuberculosis* осуществляли методом споллиготипирования (spoligotyping – spacer oligotyping) [4]. Метод основан на анализе полиморфизма 43 нуклеотидных последовательностей (спейсеров), разделяющих прямые повторы (Direct Repeats, DR), линейно расположенные в DR области хромосомы *M. tuberculosis*. Амплификацию DR-области ДНК возбудителя, контрольных штаммов *M. tuberculosis* H37Rv и *M. bovis* BCG P3 проводили со специфическими праймерами Dra ($5'$ -биотин GGTTTTG-GGTCTGACGAC) и Drb (CCGAGAGGGGACGGAAAC) (Синтол, Москва) [4]. Для постановки ПЦР в режиме: 96°C – 3 мин, 20 циклов: 96°C – 1 мин, 55°C – 1 мин, 72°C – 30 с; 72°C – 30 с использовали реагенты (Силекс, Москва) и 1,0 мкл ДНК. Продукты ПЦР-амплификации DR области хромосомы изолятов, меченные биотином, в соответствии с указаниями производителя гибридизовали с 43 спейсерными последовательностями ДНК, нанесенными на мембрану (Isogen Bioscience BV, Belgium), которую затем экспонировали на светочувствительной пленке Huperfilm ECL (GE Healthcare). Результаты споллиготипирования оценивали визуально, отмечая наличие (в виде темных пятен на пленке) каждого из 43 спейсеров, и представляли с помощью бинарного кода: 1 (наличие спейсера) и 0 (отсутствие спейсера) в формате Excel. Для классификации полученных профилей споллиготипирования использовали международную компьютерную базу данных SITVITWEB (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr:8081/>

Для корреспонденции: Вязовая Анна Александровна, annavyazovaya@gmail.com