

Э. Р. Тамарова, Н. Р. Масагутова

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОФЛОРЫ ПОЛОСТИ РТА ПРИ ПАРОДОНТИТЕ

Изучен видовой состав основных пародонтопатогенных бактерий (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. macacae*) с использованием метода полимеразной цепной реакции. Показано, что проведение молекулярно-генетических исследований у больных пародонтитом позволяет обосновать этиологический диагноз заболевания, назначить адекватную антибактериальную терапию.

Ключевые слова: пародонтопатогенная микрофлора, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Введение. Современный уровень научных знаний об этиопатогенезе пародонтита определяет пародонтальную микрофлору в качестве доминирующего фактора. Среди них наиболее часто встречаются *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius* и *Streptococcus macacae*, которые считаются «маркерными» микроорганизмами пародонтита. Особенности их метаболизма и патогенность могут оказывать влияние на течение воспалительного процесса [1; 2].

В последние годы в клиническую диагностику микрофлоры полости рта внедрён ряд высокоспецифичных и высокочувствительных методов, среди которых наиболее широкое распространение получила полимеразная цепная реакция (ПЦР). Однако в отечественной научной литературе исследования, в которых этот метод применялся для диагностики микрофлоры при пародонтите, немногочисленны [3–5].

Цель. Детекция патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, ассоциированных с пародонтитом, методом ПЦР.

Материал и методы. Обследованы 60 пациентов (26 мужчин и 34 женщины) в возрасте от 18 до 72 лет с пародонтитом средней степени тяжести, не имевшие тяжёлой фоновой патологии внутренних органов и систем, которая могла бы оказать заметное влияние на течение патологического процесса в пародонте. Из них 41 (68,3 %) человек обратился за помощью впервые, а остальные 19 (31,7 %) человек ранее лечились, за помощью обращались 1 раз в год.

Исследовались материалы кармана, которые отбирали из наиболее глубоких участков с помощью стерильных бумажных эндодонтических штифтов (размер № 25) и затем помещали в пробирку с физиологическим раствором.

Одновременно в другую пробирку собирали слюну. Полученные образцы транспортировали в лабораторию в охлаждённом состоянии.

ДНК основных представителей пародонтопатогенной микрофлоры выявляли методом ПЦР. ДНК выделяли с использованием реагента «Челикс» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) согласно прилагаемой инструкции. Амплификацию ДНК пародонтопатогенных микробов (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. macacae*) проводили в термоциклере Терцик МС-2 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с использованием реагентов ООО «НПО ДНК-Технология» (Россия) согласно инструкции производителя. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в 2,0 %-ном горизонтальном агарозном геле, окрашивали бромидом этидия и визуализировали при освещении ультрафиолетом в фотодокументационной системе.

Результаты и обсуждение. Для достижения поставленной цели был произведён подбор олигонуклеотидных праймеров к специфическим консервативным последовательностям ДНК основных бактерий, ассоциированных с пародонтитом,— генам 16S рРНК, а также генам антибиотикоустойчивости, депонированных в международном банке нуклеотидных последовательностей GenBank. Сравнительный множественный анализ найденных последовательностей проводили с помощью программы MegAlign. При подборе праймеров использовали программу PrimerSelect из пакета программ Lasergene (DNASar, США).

В содержимом пародонтального кармана при пародонтите обнаружены все исследованные микроорганизмы. Наиболее распространены были бактерии *Streptococcus mutans*, которые были выявлены у 48 (80,0 %) из 60 обследованных больных. Следует отметить высокую представлен-

ность *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus oralis*, частота которых превысила 50 %: 53,3 и 51,7 % соответственно. Остальные микроорганизмы встречались заметно реже. Так, *Porphyromonas gingivalis* наблюдалась в 21 (35,0 %) случае, *Treponema denticola* — в 15 (25,0 %) случаях, *Streptococcus sobrinus* — в 13 (21,7 %) случаях, а частота *Streptococcus salivarius* и *Streptococcus macacae* была равна 15,0 % (9 больных).

В образцах слюны больных пародонтитом сохранялась подобная тенденция по содержанию микроорганизмов. Как и в содержимом пародонтального кармана, максимальная представленность обнаружена для *Streptococcus mutans* (51 человек, 85,0 %). Доля больных с *Streptococcus sanguis* и *Streptococcus oralis* составила 39 (65,0 %) человек и 37 (61,7 %) человек соответственно. Обращает на себя внимание статистически недостоверное увеличение частоты встречаемости в слюне бактерий *Streptococcus salivarius* и *Streptococcus sobrinus* по сравнению с материалом пародонтального кармана зубов — соответственно 28 (46,7 %) и 25 (41,7 %).

У пациентов с пародонтитом средней степени тяжести в исследованных биотопах полости рта наблюдались сочетания нескольких видов бактерий. Наиболее часто встречающийся состав сообщества включал *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. oralis* — у 10 (16,7 %) человек. Второе место (9 человек, 15,0 %) разделили два сообщества, в состав которых входили: 1) *P. gingivalis*, *T. denticola*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. oralis* и 2) *P. gingivalis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. sobrinus*. Сочетание бактерий *T. denticola*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. sobrinus* установлено у 7 (11,7 %) пациентов, тогда как частота других сообществ микроорганизмов не превышала 5 %.

При анализе антибиотикоустойчивости бактерий, ассоциированных с пародонтитом, получены следующие результаты. Среди больных (21 человек), у которых был выявлен *P. gingivalis*, устойчивость к бацитрацину была обнаружена в 3 (14,3 %) случаях, к нитромидазолу — в 12 (57,1 %) случаях, к ванкомицину — в 11 (52,4 %) случаях. У 51 больного с *S. mutans* данный микроорганизм оказался устойчив к линкомицину

в 6 (11,8 %) случаях, к β -лактамам — в 7 (13,7 %) случаях. Устойчивость *S. sanguis* к блеомицину установлена у 10 из 39 больных (25,6 %), *S. salivarius* к линкомицину — у 7 из 39 (17,9 %) больных, к ванкомицину — у 8 (28,6 %) больных. Устойчивость *S. oralis* к тетрациклину наблюдалась в 12 (32,4 %) из 37 случаев выявления данного микроорганизма при пародонтите.

Выводы и заключение. Таким образом, исследование ДНК микроорганизмов, колонизирующих экосистему при пародонтите (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus sobrinus*), выделенной из образцов клинического материала, показало, что подобранные нами праймеры высокоспецифичны и чувствительны, что является важным фактором при лабораторной диагностике пародонтита. Проведение молекулярно-генетических исследований у больных пародонтитом позволяет обосновать этиологический диагноз заболевания, назначить адекватную антибактериальную терапию, направленную на освобождение пациента от возбудителей.

Список литературы

1. Грудянов, А. И. Профилактика воспалительных заболеваний пародонта / А. И. Грудянов, В. В. Овчинникова. М. : МИА, 2007. 80 с.
2. Николаева, Е. Н. Применение новой тест-системы, основанной на полимеразной цепной реакции, в пародонтологии / Е. Н. Николаева, В. Н. Царёв, С. Н. Щербо [и др.] // Клинич. стоматология. 2004. Т. 63, № 4. С. 63–67.
3. Царёв, В. Н. Антимикробная терапия в стоматологии / В. Н. Царёв, Р. В. Ушаков М. : Мед. информ. агентство, 2004. 143 с.
4. Albander, J. M. Serum Ig G level to *P. Gingivalis* in healthy and early-onset periodontitis individuals / J. M. Albander, E. De Nardin // J. Dent. Res. 1999. Vol. 78. P. 250–255.
5. Haffajee, A. D. Microbiological etiological agents of destructive periodontal diseases / A. D. Haffajee, S. S. Socransky // Periodontology. 2000. 1994. Vol. 5, № 1. P. 78–111.