

## АНАЛИЗ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СТАТУСА ПАРОДОНТАЛЬНЫХ КАРМАНОВ У ПАЦИЕНТОВ С АГРЕССИВНЫМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ ПО ДАННЫМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Традиционное бактериологическое исследование в пародонтологии (культивирование микроорганизмов) дает возможность выявить присутствующие в биопленке бактерии, их чувствительность к антибиотикам, но имеет недостатки в связи с трудностью транспортировки анаэробов, сложностью состава питательных сред; кроме того, некоторые специфические пародонтопатогены не поддаются культивированию. В диагностике и количественной оценке этих микроорганизмов большую роль играют современные методы: полимеразная цепная реакция, оценка ферментативной активности, ферментно-иммунные тесты и др. [1].

Суть метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) заключается в многократном копировании (амплификации) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК, что значительно упрощает дальнейший анализ [2]. Широкое внедрение в область практического здравоохранения этого метода обусловлено простотой его выполнения, низкой себестоимостью и надежностью (рис. 1).

Одним из наиболее современных методов детекции многократно размноженной ДНК микроорганизмов сегодня является ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR). Сущность метода заключается в исследовании накопления продуктов амплификации с помощью специального прибора без последующего электрофореза (А.И. Грудянов, 2009). Отличительными чертами данного метода, в отличие от классической ПЦР, является возможность количественного определения ДНК и РНК инфекционных агентов в исследуемом материале,



**Закиров Т.В.**

к.м.н., ассистент кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии ГБОУ ВПО УГМА, kdvo@inbox.ru



**Ворошилина Е.С.**

к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО УГМА, kdvo@inbox.ru



**Бимбас Е.С.,**

д.м.н., профессор, зав. кафедрой стоматологии детского возраста и ортодонтии ГБОУ ВПО УГМА, kdvo@inbox.ru



**Стати Т.Н.**

к.м.н., доцент кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии ГБОУ ВПО УГМА, kdvo@inbox.ru



**Брусницына Е.В.**

к.м.н., врач-стоматолог многопрофильной стоматологической поликлиники ГБОУ ВПО УГМА, kdvo@inbox.ru



**Рис. 1. Тест системы для количественной ПЦР диагностики основных пародонтопатогенов**

### Резюме

Целью исследования было изучить содержание пяти наиболее патогенных микроорганизмов у пациентов с агрессивным генерализованным пародонтитом тяжелой степени до лечения. Всего в исследование было включено 86 соматически сохранных пациентов от 11 до 35 лет. Для детекции пародонтопатогенов использовали метод ПЦР в реальном времени. Качественное и количественное содержание *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* и *Treponema denticola* у больных агрессивным пародонтитом было статистически значимо больше, чем у пациентов с хроническим пародонтитом.

*Ключевые слова:* агрессивный пародонтит, пародонтопатогенные бактерии, ПЦР в реальном времени.

### THE ANALYSIS OF MICROBIOLOGICAL STATUS OF PERIODONTAL POCKETS OF PATIENTS WITH GENERALIZED AGGRESSIVE SEVERE PERIODONTITIS ACCORDING TO REAL TIME PCR

Zakirov T.V., Voroshilina E.S., Bimbas E.S., Stati T.N., Brusnitsyna E.V.

### The summary

The aim of the study was to investigate the presence of the five most aggressive periopathogens in patients with generalized aggressive severe periodontitis before treatment. A total of 86 systemic healthy people, from 11 to 35 years old, were included in the study. The real time Polymerase Chain Reaction (PCR) method was used for detection of periopathogens. The qualitative and quantitative content of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola* of patients with aggressive periodontitis was significantly more than patients with chronic periodontitis.

*Keywords:* aggressive periodontitis, periopathogens, real time PCR.

отсутствие стадии электрофореза, менее строгие требования к организации ПЦР-лаборатории и автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Отсутствие стадии электрофореза позволяет минимизировать риск контаминации продуктами ПЦР и таким образом резко уменьшить число ложноположительных результатов [1, 4, 6]. Для постановки ПЦР в реальном времени необходим специальный амплификатор, отличительной особенностью которого является возможность возбуждать и детектировать флуоресценцию, отражающую накопление ампликонов, на каждом цикле амплификации (рис. 2).

Трудно переоценить значение метода в диагностике и лечении агрессивного пародонтита как одного из наиболее сложно поддающихся терапии заболеваний в практике врача-стоматолога. Для врачей наиболее важной является возможность определять количество основных бактериальных пародонтопатогенов. Это позволяет правильно выбрать антибактериальный препарат или их комбинацию, а также получать информацию об эффективности проводимой терапии, помогает предсказывать периоды обострения заболевания и предупреждать их развитие при регулярном проведении микробиологического мониторинга во время поддерживающей терапии [3].

Однако особенности патогенеза генерализованного агрессивного пародонтита изучены недостаточно и требуют дальнейшего уточнения, что связано с разнородностью клинических проявлений, большим влиянием индивидуальных и локальных средовых факторов на развитие заболевания, а также противоречивыми данными исследований [2, 5].

### Цель исследования

Изучить микробный биоценоз пародонтальных карманов методом ПЦР в реальном времени у пациентов с агрессивным генерализованным пародонтитом тяжелой степени в стадии обострения.

### Материал и методы исследования

В обследование были включены 86 пациентов: 32 (37,2%) мужчины и 54 (62,8%) женщины, обратившихся в многопрофильную стоматологическую поликлинику УГМА с сентября 2010 по июнь 2011 года, которым был поставлен диагноз генерализованный агрессивный пародонтит тяжелой степени в стадии обострения. Критериями включения были возраст до 35 лет, характерная клиническая картина, семейный анамнез заболевания, потеря прикрепления более 2 мм за 1 год или до наступления 18 лет, рентгенологически определяемая резорбция костной ткани альвеолярного отростка более 1/2



**Рис. 2.** Аппаратура с современным амплификатором для проведения ПЦР диагностики в реальном времени

длины корней зубов, отсутствие ранее проводимого комплексного пародонтологического лечения (рис. 3, 4). Исключались пациенты, принимавшие антибиотики в течение 1 месяца до момента обследования. Возраст пациентов варьировал от 11 до 35 лет и в среднем составил  $22,6 \pm 7,02$  года.

В группе сравнения были обследованы 40 пациентов (12 мужчин и 28 женщин) с диагнозом обострение хронического генерализованного пародонтита тяжелой степени. Возраст больных в этой группе варьировал от 42 до 68 лет и в среднем был равным  $57 \pm 9,04$  годам.

Решение о месте забора материала принимали на основании совокупной характеристики жалоб пациента и клинической картины. Зуб изолировали ватными шариками, высушивали стерильными тампонами. Стерильные абсорбенты (бумажные штифты) погружали в наиболее активный пародонтальный карман на 1-2 секунды на стандартную глубину 3 мм. При извлечении абсорбента полностью исключали его касание к слизистой оболочке полости рта. Биоматериал помещали в пробирку 1,0 мл «эппендорф» с транспортной средой (физиологический раствор).



**Рис. 3.** Полость рта пациентки с агрессивным пародонтитом при первичном обращении (15 лет)



**Рис. 4.** Рентгенологически выявлена максимальная резорбция костной ткани в области первых моляров и резцов

Взятый биологический материал был промаркирован. В сопроводительном документе – направлении указывали Ф.И.О. и возраст пациента, материал, предполагаемый диагноз, показания к обследованию, дату взятия пробы, наименование учреждения. Если время транспортировки биологического материала с момента взятия до момента его доставки в лабораторию было не более суток, то пробирку с биоматериалом хранили и доставляли в лабораторию при температуре бытового холодильника ( $+4 - 10^{\circ}\text{C}$ ), не замораживая. В случае невозможности доставки образца в лабораторию в течение суток проводили однократное замораживание и хранение образца биоматериала при минус  $20^{\circ}\text{C}$  до 1-го месяца.

Выявление пяти пародонтопатогенных микроорганизмов: *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Tannerella forsythensis* (T.f.) и *Treponema denticola* (T.d.) производили методом количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. ДНК микроорганизмов выделяли при помощи набора реагентов «Проба-ГС» (производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) согласно прилагаемой инструкции производителя. Методика выделения основана на сорбции ДНК на органическом носителе, отмывке примесей с последующей элюцией нуклеиновых кислот с сорбента.

После прохождения амплификации по показателю индикаторного цикла (Cp) рассчитывали количество ДНК исследуемого инфекционного агента в исходном материале. Учет результатов вели с помощью программного обеспечения, прилагающегося к детектирующему амплификатору «ДТ-96».

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного пакета SPSS Statistics версии 17.0. В качестве меры центральной тенденции количественных признаков была выбрана медиана, а в качестве интервальной оценки – верхний и нижний квартили, т.к. исследуемая выборка не подчиняется закону нормального распределения.

## Результаты и обсуждение

Анализ результатов исследования показал, что основные пародонтопатогенные микроорганизмы в зубодесневых карманах у пациентов с агрессивным генерализованным пародонтитом тяжелой степени представлены неоднородно (табл.1). Меньше всего определялся *Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans*. Статистически значимые различия в выявлении этого микроорганизма

между группами отсутствовали (36% в основной и 35% в группе сравнения).

Бактерии красного комплекса (P.g., T.f. и T.d.) были обнаружены у подавляющего большинства пациентов (рис. 5). При этом частота встречаемости *Tannerella forsythensis* у больных обеих групп была практически эквивалентна (98,8% и 100% соответственно), тогда как в содержании других микроорганизмов этого комплекса мы наблюдали статистически значимые различия. Так, частота выявления *Porphyromonas gingivalis* и *Treponema denticola* составила 100% и 91,86% в группе пациентов с агрессивным пародонитом и по 80% случаев в группе пациентов с хроническим пародонитом ( $p < 0,05$ ). Также статистически значимые различия выявлены по содержанию *Prevotella intermedia* ( $p < 0,005$ ).

При определении частоты встречаемости пародонтопатогенов в количестве, превышающем  $10^5$ , у больных агрессивным и хроническим генерализованным пародонитом тяжелой степени значимых отличий в содержании A.a. обнаружено не было. Клинически значимые количества бактерий красного комплекса обнаруживали значительно чаще в основной группе. Так, статистически значимые отличия между группами ( $p < 0,005$ ) были выявлены в содержании *Porphyromonas gingivalis* (55,8% и 45%), *Tannerella forsythensis* (70,9% и 55%), *Treponema denticola* (62,7% и 45%), а также в содержании бактерии оранжевой

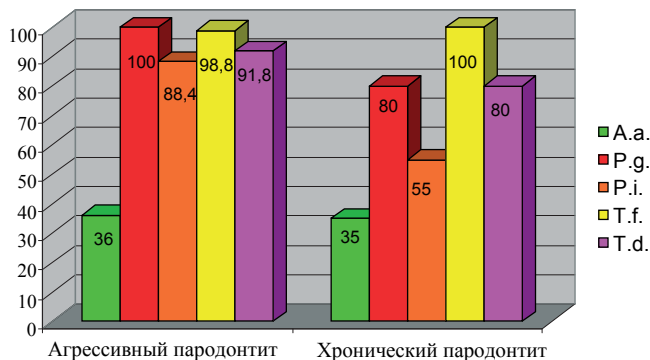


Рис. 5. Сравнительная частота встречаемости основных пародонтопатогенов у больных агрессивным и хроническим генерализованным пародонитом тяжелой степени по данным ПЦР в реальном времени

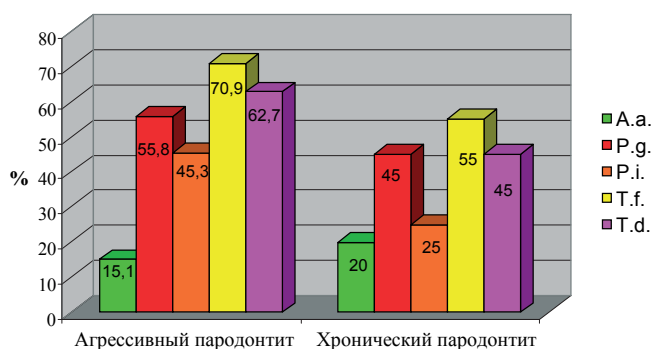


Рис. 5. Частота встречаемости пародонтопатогенов в количестве, превышающем  $10^5$ , у больных агрессивным и хроническим генерализованным пародонитом тяжелой степени по данным ПЦР в реальном времени

Таблица 1

Частота встречаемости основных патогенных микроорганизмов у больных агрессивным пародонитом тяжелой степени

Показатель  Микроорганизм	Пациенты с обострением агрессивного генерализованного пародонита тяжелой степени (n=86)				Пациенты с обострением хронического генерализованного пародонита тяжелой степени (n=40)			
	Выявление основных пародонтопатогенов		Выявление основных пародонтопатогенов в количестве, превышающем $10^5$		Выявление основных пародонтопатогенов		Выявление основных пародонтопатогенов в количестве, превышающем $10^5$	
	Число больных	%	Число больных	%	Число больных	%	Число больных	%
Actinobacillus Actinomycetem comitans	31	36	13	15,1	14	35	8	20
Porphyromonas gingivalis	86	100*	48	55,8*	32	80	18	45
Prevotella intermedia	76	88,4*	39	45,3*	22	55	10	25
Tannerella forsythensis	85	98,8	61	70,9*	40	100	22	55
Treponema denticola	79	91,86*	54	62,7*	32	80	18	45

\* – статистически значимые различия между группами пациентов с хроническим и агрессивным пародонитом.

Таблица 2

**Сравнительная количественная оценка содержания основных патогенных микроорганизмов у больных агрессивным и хроническим пародонтитом тяжелой степени**

Показатель Микроорганизм	Пациенты с агрессивным пародонтитом тяжелой степени (n=86)			Пациенты с хроническим пародонтитом тяжелой степени (n=40)		
	Медиана, Lg ГЭ	25 – 75 процентиль	5 – 95 процентиль	Медиана, Lg ГЭ	25 – 75 процентиль	5 – 95 процентиль
Actinobacillus Actinomycetem comitans	0	0 – 3,1	0 – 6,97	0	0 – 3,9	0 – 6,3
Porphyromonas gingivalis	6	4,2 – 8,3	2,92 – 9,35	3,2	0 – 4,4	0 – 6,3
Prevotella intermedia	4,3*	3,1 – 6,97	0 – 8,07	0	0 – 4,2	0 – 7,4
Tannerella forsythensis	7,5*	4,8 – 8,1	3,5 – 8,9	4,8	4,4 – 6,6	4,1 – 7,5
Treponema denticola	6,3*	3,8 – 7,37	0 – 8,27	2,7	0 – 3,6	0 – 6,8

\* – статистически значимые различия между группами пациентов с хроническим и агрессивным пародонтитом.

группы Prevotella intermedia (45,3% и 25% соответственно).

Анализ количественного состава биоценоза пародонтальных карманов показал, что в группе больных с агрессивным пародонтитом содержание бактерий красного комплекса статистически значимо выше, чем у пациентов с хроническим пародонтитом ( $p < 0,001$ ) при практически одинаковом количестве Actinobacillus actinomycetem-comitans (табл. 2). При этом в среднем количество пародонтопатогенов красного комплекса в группе пациентов, страдающих агрессивной формой пародонтита, превышало аналогичные показатели в группе сравнения на 3 и более порядков (медианы содержания P.g. –  $10^6$  и  $10^{3,2}$ ; T.f. –  $10^{7,5}$  и  $10^{4,8}$ ; T.d. –  $10^{6,3}$  и  $10^{2,7}$  соответственно).

Полученные результаты согласуются с данными литературы о большей частоте обнаружения Porphyromonas gingivalis в глубоких карманах при различных формах пародонтита. Однако именно у пациентов с агрессивным пародонтитом выявление данного микроорганизма в больших количествах коррелирует со снижением содержания и активности антител сыворотки против P.g. и подавлением антибактериальной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов. В конечном итоге это свидетельствует о невозможности организма больных агрессивным генерализованным пародонтитом справиться с инвазией данного микроорганизма [5, 7].

**Выводы**

1. Количественный и качественный состав биоценоза пародонтальных карманов у пациентов с агрессивным генерализованным пародонтитом тяжелой степени имеет статистически значимые отличия от такового у больных хроническим генерализованным пародонтитом тяжелой степени.

2. Отмечена значительная роль микроорганизмов красного комплекса в прогрессировании агрессивного пародонтита.

3. Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythensis и Treponema denticola в количестве более  $10^5$  ГЭ /мл присутствовали у 55,8%, 70,9% и 62,7% больных агрессивным генерализованным пародонтитом тяжелой степени соответственно.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Грудянов А.И. Заболевания пародонта. – М.: Издательство «Медицинское информационное агентство», 2009. – 336 с: ил.
2. Микробиология и иммунология для стоматологов: [пер. с англ.] / Под ред. Р.Дж. Ламонта, Р.А. Берне, Д.Дж. Лебланка; пер. с англ. Под ред. В.К. Леонтьева. – М.: Практическая медицина, 2010. – С. 210-212.
3. Пародонтология / Герберт Ф. Вольф, Эдит М. Ратейцхак, Клаус Ратейцхак. Пер. с нем.; Под ред. проф. Г.М.Барера. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 548 с.: ил.
4. ПЦР «в реальном времени» / Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др.; под ред. д.б.н. Д.В. Ребрикова; 2-е изд., испр. и доп. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
5. Heid C.A. Real-time quantitative PCR. // Genome Res. – 1996. – № 6. – P.986-994.
6. Lindhe J. Clinical periodontology and implant dentistry [Text] / J. Lindhe, T. Karring, N.P. Lang, – 4 ed., 2003.