

Закиров Т.В., Ворошилина Е.С., Брусницына Е.В., Иощенко Е.С.,
Канторович А.Я., Савченко Г.Д.

Диагностика основных пародонтопатогенных бактерий при гингивите у детей в период раннего сменного прикуса

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Екатеринбург

Zakirov T.V., Voroshilina E.S., Brusnitsyna E.V., Ioshchenko E.S., Kantorovich A.Y.,
Savchenko G.D.

Diagnostics of the main periodontopathogenic bacteria in gingivitis in children in the period of early mixed dentition

Резюме

Цель. Сравнительная количественная оценка содержания пародонтопатогенов в десневой борозде детей с катаральным гингивитом в период раннего сменного прикуса. Материалы и методы. Были исследованы дети 7-8 лет с катаральным гингивитом. Выявление пяти пародонтопатогенных микроорганизмов (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola*) и количественная оценка содержания гриба *Candida albicans* производились методом количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Проводилась оценка частоты встречаемости, количественных показателей, а также соотносились количественный объем каждого патогена с общей бактериальной массой пробы. Результаты. В группе детей с гингивитом наиболее распространены *Tannerella forsythia* (60%), *Treponema denticola* (48%) и *Porphyromonas gingivalis* (32%). Подтверждено, что *Tannerella denticola* часто образует ассоциации с *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia*. В контрольной группе наиболее часто выявляли *Prevotella intermedia* (20%) и *Porphyromonas gingivalis* (24%). Среди детей со здоровым пародонтом ни в одном случае не был обнаружен *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, тогда как в группе детей с гингивитом этот микроорганизм выявляли в 16% случаев. В основной группе наименее распространенным оказался *Candida albicans* – 8%, который встречался и у детей контрольной группы в 4% случаев. Выводы. Распространенность бактерий «красного пародонтального комплекса» выше в группе детей с катаральным гингивитом. *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* и *Porphyromonas gingivalis* выявлены в 60%, 48% и 32% случаев у детей с гингивитом соответственно. Среднее количественное значение пародонтопатогенных микроорганизмов среди детей-носителей не достигало клинически значимых величин (>105 IgГЭ/мл). В бактериальной массе десневой борозды у детей с гингивитом нет преобладания какого-то определенного патогена из числа исследованных.

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени; дети; пародонтопатогены; гингивит; ранний сменный прикус

Summary

The aim. Comparative quantitative assessment of the content of periodontopathogenic microorganisms in the gingival sulcus of children with catarrhal gingivitis in the early period of the mixed occlusion. Materials and methods. Children 7-8 years old with catarrhal gingivitis were examined. The detection of five periodontal pathogens (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola*) and quantitative assessment of the content of *Candida albicans* were performed by quantitative PCR with real-time detection of results. The frequency of occurrence and quantitative parameters were evaluated, and the quantitative volume of each pathogen was correlated with the total bacterial mass of the sample. Results. In the group of children with gingivitis, the most common are *Tannerella forsythia* (60%), *Treponema denticola* (48%) and *Porphyromonas gingivalis* (32%). It is confirmed that *Treponema denticola* often forms associations with *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia*. In the control group *Prevotella intermedia* (20%) and *Porphyromonas gingivalis* (24%) were most frequently detected. Among children with healthy periodontal disease *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was not detected in any case, while in the group of children with gingivitis this microorganism was detected in 16% of cases. In the main group the least common organism was *Candida albicans* – 8%, which was also found in

children of the control group in 4% of cases. Summary. The prevalence of "red periodontal complex" bacteria is higher in the group of children with gingivitis. *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* were detected in 60%, 48% and 32% of cases in children with gingivitis, respectively. The average quantitative value of periopathogens among children-carriers did not reach clinically significant values (> 105 IgGE/ml). In the bacterial mass of the gingival groove in children with gingivitis, there is no prevalence of any particular pathogen.

Key words: real-time PCR, children, periopathogens, gingivitis, early mixed dentition

Введение

Распространенность воспалительных заболеваний пародонта в сменном прикусе варьирует от 58,7% до 74,30% (Русакова И.В., 2008). Заболеваемость гингивитом возрастает, начиная с пятилетнего возраста и достигает пика в период полового созревания (Артюшкевич А.С., 2006; Бекетова Е.Н., 2007). Высокая распространенность, склонность к прогрессированию, недостаточная эффективность лечения и профилактики воспалительных заболеваний пародонта определяют значимость этой проблемы в современной стоматологии (Безрукова Н.В., 2005; Грудянов А.И., 2008; Павлов А.А., с соавт., 2012).

Основные этиологические факторы развития воспалительных заболеваний пародонта хорошо изучены – это микробный фактор, нарушения трофики тканей различной природы, снижение иммунологических механизмов защиты. Действие этих причин обусловлено влиянием большого числа факторов риска развития гингивита и пародонтита – это структурные особенности тканей, генетический полиморфизм, особенности микробиоты полости рта, поведенческие факторы (неудовлетворительная гигиена, особенности диеты), метаболические нарушения при соматических заболеваниях и др. [1,2,3].

У детей на фоне физиологической нестабильности растущего организма этиопатогенетический механизм развития пародонтита более сложен, чем у взрослых. Выявление пародонтопатогенов в десневой борозде детей младшего возраста имеет большое значение для ранней диагностики и профилактики развития пародонтита в будущем. В настоящее время остается открытым вопрос о сроках развития этого заболевания - имеется ли патогенная микрофлора десневой борозды при гингивите у детей младшего возраста или инвазия происходит по мере взросления на фоне сопутствующих факторов: смены зубов, гормональных изменений, снижения локальной резистентности полости рта в пубертатный период и т.д. Также важно, в какой последовательности происходит колонизация полости рта пародонтопатогенами, какие микроорганизмы встречаются наиболее часто и насколько очевидно их роль в развитии пародонтита. Все эти вопросы активно изучаются, но не находят однозначных ответов.

В настоящее время выделяют около двадцати видов пародонтопатогенов, различающихся по степени вирулентности, влиянию на ткани пародонта, патогенетическому значению. Классификации возбудителей по этим признакам имеют некоторые различия [4].

Согласно классификации пародонтальных микробных комплексов по Socransky S.S. различают: «красный» комплекс: *T. denticola* (T.d.), *T. forsythia* (T.f.), *P. gingivalis*

(P.g.); «зеленый» комплекс: *A. actinomycetemcomitans* (A.a.); *E. corrodens*, *Capnocytophaga* spp., «желтый» комплекс: *S.mitis*, *S.israelis*, *S.sanguis*; «пурпурный» комплекс: *V.parvula*, *A.odontolyticus*; «оранжевый» комплекс: *P.nigrescens*, *P.micros*, *C.rectus*, *Campylobacter* spp. Безрукова И.В. и Грудянов А.И. (2002) к патогенам, обладающих высокой агрессивностью, относят *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*.

Особую роль в развитии и прогрессировании воспалительных заболеваний пародонта играют *T. forsythia* и *P.gingivalis* - это грамотрицательные анаэробы с тенденцией к внутриклеточному паразитированию в клетках десневого эпителия и тканей пародонта. *Porphyromonas gingivalis* вызывает деструкцию тканей пародонта за счет наличия фимбрий, гемоглиагглютинирующей активности, выработки гингипаина К, протеаз и других факторов вирулентности. *Tannerella forsythia* может индуцировать клеточный апоптоз, продуцировать протео- и гликолитические ферменты. Также большое значение в развитии воспалительных заболеваний пародонта у детей имеет *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Эта бактерия вырабатывает сильный лейкотоксин, разрушающий лейкоциты, моноциты и нейтрофилы, т.е. атакует факторы врожденного иммунного ответа. Лейкотоксин вызывает образование пор в клеточных мембранах и в высоких концентрациях вызывает лизис клеток, в том числе и опухолевых [4]. Леонова Е.В. с соавт. (2018) отмечает, что именно *A. actinomycetemcomitans* выявляется в большом количестве при агрессивном пародонтите.

В литературных источниках данных о выявлении основных пародонтопатогенов у детей намного меньше, чем у взрослых. Возможно, это связано со сложностями проведения клинических исследований в детском возрасте.

Для идентификации пародонтопатогенов в проанализированных нами работах использовался метод ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR). Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет провести количественное определение ДНК и РНК патогенов, не требует особых условий во время сбора проб [5].

Dawn L. (1996) с помощью ПЦР выявил достоверное увеличение частоты встречаемости *P. gingivalis* с 33% до 50% у детей в возрасте от 6 до 18 лет. Gafan G.P. (2004) при обследовании 65 детей 5-9 лет с гингивитом обнаружил высокую распространенность пародонтопатогенов - *P. gingivalis* был выявлен у 49%, *A. actinomycetemcomitans* у 55% и *T. forsythia* 65% соответственно. При этом *T. forsythia* чаще обнаруживалась у детей без гингивита, также не было найдено достоверной разницы в группах

с гингивитом и со здоровым пародонтом в отношении *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans*. Okada M. с соавт. (2001) изучал присутствие *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis* в образцах бляшек у детей 2 - 12 лет, собранных с зубных щеток с использованием ПЦР. Были отобраны группы (21 и 73 ребенка) со здоровым пародонтом и гингивитом. Распространенность *A. actinomycetemcomitans* у здоровых субъектов составила 4,8%, а у лиц с гингивитом - 6,8%, тогда как распространенность *P. gingivalis* составила 4,8% у здоровых детей и 9,6% у пациентов с гингивитом. В исследовании Papaioannou W. с соавт. (2009) в трех возрастных группах от 3 до 12 лет было обнаружено достоверное увеличение частоты встречаемости бактерий красного комплекса (*T. forsythia*, *P. gingivalis*, *T. denticola*) что было связано авторами с возрастным созреванием микробиоты полости рта.

Среди отечественных исследований очень мало работ, посвященных выявлению пародонтопатогенов у детей. Доменюк Д.А. с соавт. (2014), у детей с гингивитом 7-14 лет значительно чаще регистрировал *P. gingivalis* - в 24,8% случаев. У детей с зубочелюстными аномалиями этой же возрастной группы, данный микроорганизм обнаруживался в 27,1%. Маркеры *T. forsythia* были выявлены в 21,3%, *A. actinomycetemcomitans* - в 13,8%, *P. intermedia* в 13,3% случаев. *T. denticola* встречалась наиболее редко - у 7,1% детей [6]. В то же время в работе Lamell C.W. с соавт. (2000) при обследовании 222 практически здоровых детей 0-18 лет у трети из них регистрировали наличие *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis*.

Различия результатов исследований во многом связаны с популяционными и средовыми особенностями выборок. Так, например, полиморфизм генов, влияющих на развитие заболеваний пародонта, по-разному выражен среди разных этнических групп [3]. Нет однозначного мнения, является ли повышение частоты встречаемости бактерий красного пародонтального комплекса с возрастом у детей результатом созревания микробиоты или прогрессирования пародонтального воспаления, какое влияние оказывает на микробиоценоз в придесневой области прорезывание постоянных зубов. Это делает актуальным дальнейшее изучение содержания и количественную оценку основных пародонтопатогенов в разных субпопуляциях.

Цель исследования: сравнительная количественная оценка содержания пародонтопатогенов в десневой борозде детей с катаральным гингивитом в период раннего сменного прикуса.

Материалы и методы

Исследование соответствовало этическим стандартам Комитета по экспериментам, стандартам проведения клинических исследований (ГОСТ Р 52379-2005). На проведение исследования получено письменное информированное согласие родителей (опекунов).

Исследование проведено на базе детского отделения стоматологической поликлиники УГМУ и в отделении лабораторной диагностики МЦ «Гармония» г. Екатеринбурга. Общее число обследованных детей составило 50

человек, из них мальчиков - 23, девочек - 27. Средний возраст составил 7,4 года.

Критерии включения в исследование: возраст детей 7-8 лет с прорезыванием постоянных резцов и первых моляров, отсутствие соматической патологии. Из общего числа обследованных было сформировано две группы: в основную группу исследования вошли дети с диагнозом K05.1 хронический эндодонтический гингивит (ОГ), контрольную группу составили дети со здоровым пародонтом (КГ). Количество детей в группах было равным: основная группа 25 человек и контрольная - 25 человек, распределение по полу не имело значимых различий в группах.

Забор материала для исследования пародонтопатогенов десневой борозды проводили с помощью стерильных бумажных эндодонтических шпигтов однократно в области первых постоянных моляров по стандартной методике. Биоматериал помещали в пробирку 1,0 мл типа Eppendorf с транспортной средой (физиологический раствор) и в охлажденном состоянии транспортировали в лабораторию.

Выявление пяти пародонтопатогенных микроорганизмов: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Tannerella forsythia* (T.f.) и *Treponema denticola* (T.d.) производили методом количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ), так же проводили количественную оценку содержания гриба *Candida Albicans* (C.a). 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 элюзией нуклеиновых кислот с сорбента. Учет результатов вели с помощью программного обеспечения, прилагающегося к детектирующему амплификатору «ДТ-96».

Оценивали частоту встречаемости, количественные показатели шести перечисленных патогенов.

Соотношение исследованных патогенов изучали с помощью нормировки по бактериальной массе (Зорина О.А. с соавт., 2011) - проводили корреляционный анализ количественных показателей каждого патогена с общей бактериальной массой пробы.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программного пакета статистического анализа SPSS, EViews. Для корреляционного анализа использовали метод наименьших квадратов. Различия между группами считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При определении частоты встречаемости основных пародонтопатогенных микроорганизмов у детей по данным ПЦР-РВ мы обнаружили, что в группе детей с гингивитом наиболее распространены *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* и *Porphyromonas gingivalis*, выявленные у пятнадцати, двенадцати и восьми человек соответственно (рис. 1). Все эти бактерии относятся к

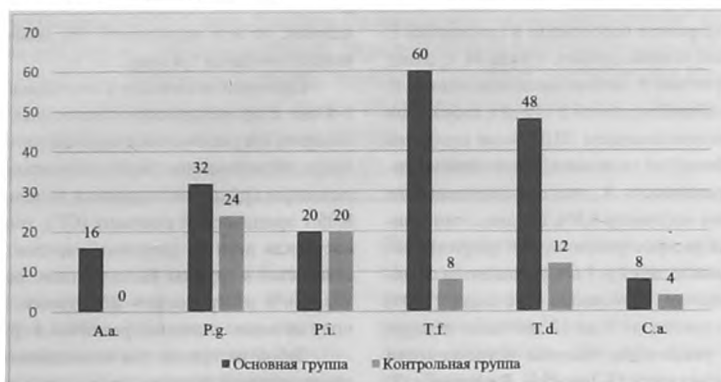


Рисунок 1. Распространенность основных пародонтопатогенных микроорганизмов у детей 7-8 лет, %
A.a. – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *P.g.* – *Porphyromonas gingivalis*; *P.i.* – *Prevotella intermedia*; *T.f.* – *Tannerella forsythia*, *T.d.* – *Treponema denticola*, *C.a.* – *Candida albicans*.

«красному» комплексу, который отличает специфичность воздействия на ткани пародонта. *Treponema denticola* по данным литературы часто образует ассоциации с *P. gingivalis* и *T. Forsythia*, что подтверждалось более частым совместным выявлением этих микроорганизмов по результатам нашего исследования.

В контрольной группе наиболее часто выявляли *Prevotella intermedia* (20%) и *Porphyromonas gingivalis* (24%). Среди детей со здоровым пародонтом ни в одном случае не был обнаружен *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, тогда как в группе детей с гингивитом этот микроорганизм выявляли в 16%. В основной группе наименее распространенным оказался *Candida albicans* – 8%, который встречался и у детей контрольной группы в 4% случаев.

Комплексы из двух-трех патогенов были выявлены у четырех здоровых детей (8%). В основной группе комплексы из 4-х пародонтопатогенов были обнаружены у трех детей (12%), из 3-х и из 2-х патогенных микроорганизмов – у пяти детей.

Клинически значимые количественные значения содержания пародонтопатогенов ($Ig \text{ ГЭ/мл} > 105$) были выявлены у четырех детей основной группы: у двух *Tannerella forsythia*, у одного ребенка *Treponema denticola* и у одного *Prevotella intermedia*. В контрольной группе количественный порог *Prevotella intermedia* был превышен у одного ребенка. В среднем количественные показатели среди детей-носителей не достигали критических значений (таблица 1). Однако, у детей с гингивитом выявлено достоверно большее количество *P. gingivalis*, *T. forsythensis* и *T. denticola*.

Исследуя соотношение количества каждого из патогенов с общей бактериальной массой методом корреляционного анализа абсолютных значений показателей (ГЭ/мл) ни в группе детей с гингивитом, ни в выборке в целом не было выявлено статистически достоверной связи между общей бактериальной массой и каким-либо из изучаемых патогенов (Таблицы 2, 3). Это свидетельствует о том, что в бактериальной массе десневой борозды нет преобладания какого-то определенного патогена.

Таким образом, у обследованных детей в период раннего сменного прикуса клинические проявления катарального гингивита не были связаны напрямую с наличием и количеством какого-либо из микроорганизмов – основных возбудителей воспалительных заболеваний пародонта. Эти данные согласуются с результатами приведенных выше исследований – вероятно, инвазия и агрессия пародонтопатогенов реализуются в более поздние возрастные сроки. При этом особое внимание должно уделяться пубертатному периоду.

Сравнительно высокая частота выявления *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* и *Porphyromonas gingivalis* в группе детей с гингивитом может свидетельствовать о роли этих микроорганизмов как оппортунистической инфекции. Если это наблюдение подтвердится с точки зрения доказательной медицины в дальнейших исследованиях при увеличении набора клинических данных, то стратегия лечения может существенно измениться – при отсутствии выявленных экзогенных возбудителей воспаления пародонта у детей лечение должно быть направлено, в первую очередь, на восстановление баланса сапрофитов, а не на эрадикацию патогенов с помощью антибактериальной терапии.

Выводы

1. Распространенность бактерий «красного пародонтального комплекса» выше в группе детей с катаральным гингивитом. *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* и *Porphyromonas gingivalis* были обнаружены в 60%, 48% и 32% случаев у детей с гингивитом соответственно.

2. Среднее количественное значение пародонтопатогенных микроорганизмов среди детей-носителей в период раннего сменного прикуса не достигало клинически значимых величин ($>105 \text{ ГЭ/мл}$), достоверные различия между основной и контрольной группами выявлены только для бактерий «красного комплекса».

3. В бактериальной массе десневой борозды у детей с гингивитом в период раннего сменного прикуса нет преобладания какого-то определенного вида пародонтопатогена из числа исследованных. ■

Таблица 1. Среднее значение количественных показателей пародонтопатогенов у детей-носителей (lgГЭ/мл)

Микроорганизм	Дети с гингивитом (основная группа)	Дети без гингивита (контрольная группа)	P
A. actinomycetemcomitans	3,98±1,80	0,00	
P. gingivalis	2,44±1,12	1,52±0,31	0,0027
P. intermedia	3,86±1,60	2,70±2,69	0,0253
T. forsythensis	3,39±1,66	2,05±0,49	0,0001
T. denticola	3,14±1,23	1,70±0,77	0,0005
C. albicans	2,50±0,42	1,50±0,00	0,1572

Таблица 2. Корреляционный анализ влияния пародонтопатогенов в основной группе (ГЭ/мл)

Микроорганизм	Коэффициент при переменной	Стандартная ошибка	p
A. actinomycetemcomitans	-10,12500	59,73977	0,8673
P. gingivalis	-1686,678	3024,816	0,5004
P. intermedia	1,168125	29,93372	0,9693
T. forsythensis	-5,140393	52,78261	0,9235
T. denticola	8,975554	13,93679	0,5277
C. albicans	19998,17	17904,26	0,2787

Таблица 3. Корреляционный анализ влияния пародонтопатогенов в обеих группах (ГЭ/мл)

Микроорганизм	Коэффициент при переменной	Стандартная ошибка	p
A. actinomycetemcomitans	-9,014628	41,44351	0,8288
P. gingivalis	-1597,180	2071,349	0,4449
P. intermedia	0,525112	19,9381	0,7451
T. forsythensis	-1,749545	36,92809	0,8983
T. denticola	9,070812	9,815361	0,3606
C. albicans	20111,76	12614,54	0,1182

Авторы выражают глубокую признательность Зубринской Д.П. за помощь в статистической обработке данных.

Закиров Тарас Валерьевич, к.м.н., доцент кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии, Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Ворошилина Екатерина Сергеевна, д.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Уральского государственного медицинского университета, г. Екатеринбург, Брусницкая Елена Викторовна, к.м.н., ассистент кафедры стоматологии детского возраста и

ортодонтии, Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Иоценко Евгений Сергеевич, к.м.н., доцент кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии, Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Канторович Анна Яковлевна, Студент 4 курса фармацевтического факультета, Уральский государственный медицинский университет, г. Екатеринбург, Савченко Глеб Денисович, Студент 3 курса биологического факультета, Уральский федеральный университет, г. Екатеринбург, Автор, ответственный за переписку — Закиров Тарас Валерьевич, 620028 г. Екатеринбург, ул. Ретина, 3. seki-zakirov@mail.ru

Литература:

1. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018; 45(Suppl 20):S162–S170.
2. Takahashi K., Cunha R.F., Junior E.G. Periodontal Pathogen Colonization in Young Children by PCR Quantification - A Longitudinal Survey. *Journal Clinical Pediatric Dentistry.* 2018; 42(2):103-108.
3. Саркисян Н.Г. Генетические маркеры пародонтита: обзор литературы. *Пародонтология.* 2016; 1: 3-9.
4. Шеремет О.К., Царев В.Н., Воронцова Н.И., Земляная Н.Ю. Пародонтогенная микрофлора полости рта и методы ее диагностики. *Dental magazine.* 2013; 8: 6-7.
5. Закиров Т.В., Ворошилина Е.С., Бимбас Е.С., Стати Т.Н., Брусницкая Е.В. Анализ микробиологического статуса пародонтальных карманов у пациентов с агрессивным генерализованным пародонтитом тяжелой степени по данным ПЦР в реальном времени. *Проблемы стоматологии.* 2012; 1: 4-8.
6. Доменюк Д.А., Зеленский В.А., Карслиева А.Г., Базиков И.А. Оценка микробиологического статуса у детей с аномалиями зубочелюстной системы по результатам бактериологических и молекулярно-генетических исследований. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2015; 9 (4): 344-348.