

Закиров Т.В.¹, Ворошилина Е.С.^{1,2}, Бимбас Е.С.¹, Стати Т.Н.¹

Микробиоценоз пародонтальных карманов у больных агрессивным генерализованным пародонтитом тяжелой степени по данным ПЦР в реальном времени

1 - ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России, г. Екатеринбург; 2 - ООО Медико-фармацевтический центр «Гармония», г. Екатеринбург

Zakirov T.V., Voroshilina E.S., Bimbass E.S., Stati T.N.

Microbiocenosis of periodontal pockets of patients with generalized aggressive severe periodontitis according to real time PCR

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 сохраненных пациентов от 11 до 35 лет. Для детекции пародонтопатогенов использовали метод ПЦР в реальном времени. Частота выявления и количество *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* и *Treponema denticola* у больных агрессивным пародонтитом было статистически значимо выше, чем у пациентов с хроническим пародонтитом.

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

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. Real time PCR was used for detection of periopathogens. The quantity of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola* in patients with aggressive periodontitis was significantly higher than in patients with chronic periodontitis.

Keywords: aggressive periodontitis, periopathogens, real time PCR

Введение

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 [5]. Значимым фактором в развитии данной патологии принято считать особенности качественного и количественного состава микрофлоры пародонтальных карманов. В связи с этим, внедрение в практическое здравоохранение доступных объективных методов лабораторной диагностики микробного пейзажа пародонтальных карманов является актуальной проблемой современной пародонтологии. Это позволит правильно выбирать антибактериальный препарат или их комбинацию, а также получать информацию об эффективности проводимой терапии, поможет предсказывать периоды обострения заболевания и предупреждать их развитие при регулярном проведении микробиологического мониторинга во время поддерживающей терапии [3].

Традиционно с целью выявления пародонтопатогенов применяется бактериологический (культуральный метод), который позволяет выявить присутствующие в биоматериале бактерии и определить их чувствительность к антибиотикам. Однако возможности данного метода ограничены, когда необходимо культивировать облигатно анаэробные микроорганизмы, с которыми сегодня принято связывать развитие пародонтита. При этом следует иметь в виду, что многие значимые специфические пародонтопатогены не поддаются культивированию в принципе. В диагностике и количественной оценке этих микроорганизмов большую роль играют современные методы, а именно полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [1]. Появление тест-систем для выявления 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.)) методом ПЦР-РВ открывает новые возможности в диагностике этиологически значимых микроорганизмов при агрессивном пародонтите.



Рис.1. Полость рта пациентки с агрессивным пародонтитом при первичном обращении (15 лет)

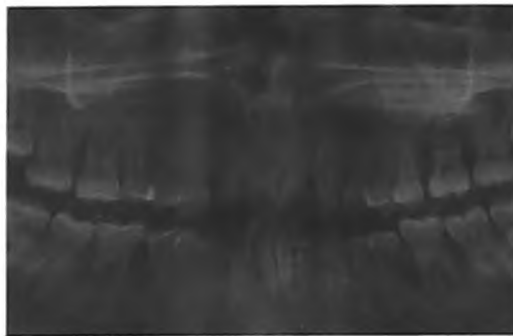


Рис.2. Рентгенологически выявлена максимальная резорбция костной ткани в области первых моляров и резцов

донтите, одном из наиболее сложно поддающихся терапии заболеваний в практике врача-стоматолога.

Целью настоящего исследования было изучить микробиоценоз пародонтальных карманов методом ПЦР в реальном времени у пациентов с агрессивным генерализованным пародонтитом тяжелой степени в стадии обострения.

Материалы и методы

В исследование были включены 86 пациентов: 32 (37,2 %) мужчин и 54 (62,8 %) женщин, 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 длины корней зубов, отсутствие ранее проводимого комплексного пародонтологического лечения (Рисунок 1, 2). 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 ± 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 ± 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. Штифт с полученным биоматериалом помещали в пробирку типа Эппендорф, содержащую 1,0 мл стерильного физиологического раствора.

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 (ПЦР-РВ). ДНК микроорганизмов выделяли при помощи набора реагентов «Проба-ГС» (производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) согласно прилагаемой инструкции производителя.

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

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). Реже всего у пациентов всех групп выявляли *Actinobacillus* (*Aggregatibacter*) *actinomycetemcomitans*: обнаружен у (36 %) обследованных в основной и (35%) в группе сравнения.

Облигатно-анаэробные пародонтопатогены были обнаружены у подавляющего большинства пациентов. При этом частота встречаемости *Tannerella forsythensis* у больных обеих групп практически не различалась (98,8 % и 100 % соответственно), тогда как другие микроорганизмы этого комплекса с разной частотой выявляли у пациентов обследованных групп. *Porphyromonas gingivalis* присутствовала у 100 % и 80% пациентов основной группы и группы сравнения, соответственно ($p < 0,05$);

Таблица 1. Частота встречаемости основных патогенных микроорганизмов у больных агрессивным пародонтитом тяжелой степени

Показатель	Пациенты с обострением агрессивного генерализованного пародонтита тяжелой степени (n=86)				Пациенты с обострением хронического генерализованного пародонтита тяжелой степени (n=40)			
	Выявление основных пародонтопатогенов		Выявление основных пародонтопатогенов в количестве, превышающем 10 ⁷ ГЭ/мл		Выявление основных пародонтопатогенов		Выявление основных пародонтопатогенов в количестве, превышающем 10 ⁶ ГЭ/мл	
	Число больных	%	Число больных	%	Число больных	%	Число больных	%
Микроорганизм								
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 пародонтитом.

Treponema denticola — у 91,86 % пациентов с агрессивным пародонтитом и у 80 % пациентов с хроническим пародонтитом (p < 0,05). Prevotella intermedia была обнаружена у 88,4% и 55% пациентов 1-й и 2-й групп соответственно (p < 0,005).

Важным показателем роли микроорганизма в развитии патологического процесса является его количественный показатель. За диагностически значимое количество было принято содержание пародонтопатогена более 10⁵ ГЭ/мл. Частота встречаемости A.actinomycetemcomitans в диагностически значимом количестве не различалась между группами, тогда как облигатных анаэробов обнаруживали статистически значимо чаще у пациентов основной группы. P.gingivalis в диагностически значи-

мом количестве присутствовала у 55,8 % и 45 % пациентов основной группы и группы сравнения (p<0,05), T.forsythensis у 70,9 % и 55 % пациентов (p<0,05), T.denticola — у 62,7 % и 45 % (p<0,05), P.intermedia — у 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 A.actinomycetemcomitans (табл. 2). При этом в среднем количество облигатно-анаэробных пародонтопатогенов в группе пациентов, страдающих агрессивной формой пародонтита, превы-

Таблица 2. Сравнительная количественная оценка содержания основных патогенных микроорганизмов у больных агрессивным и хроническим пародонтитом тяжелой степени

Показатель	Пациенты с агрессивным пародонтитом тяжелой степени (n=86)			Пациенты с хроническим пародонтитом тяжелой степени (n=40)		
	Медиана, Лг ГЭ	25 - 75 проценты	5 - 95 проценты	Медиана, Лг ГЭ	25 - 75 проценты	5 - 95 проценты
Микроорганизм						
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.

шало 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 высокой частоте обнаружения P.gingivalis в глубоких карманах при различных формах пародонтита. По данным Цимбалистова А.В. и Lindhe J. именно у пациентов с агрессивным пародонтитом выявление P.g. в больших количествах коррелирует со снижением содержания и активности сывороточных антител сыворотки против P.g. и подавлением антибактериальной активности полиморфно-ядерных лейкоцитов, что приводит к неспособности организма больных справиться с пролиферацией данного микроорганизма [5,7].

Выводы

1) Количественный и качественный состав микрофлоры пародонтальных карманов у пациентов с агрессивным генерализованным пародонтитом тяжелой степени значительно отличается от такового у больных хроническим генерализованным пародонтитом тяжелой степени.

2) Ведущая роль в прогрессировании агрессивного пародонтита принадлежит комплексу облигатно-анаэробных пародонтопатогенов.

3) Чаще всего у больных агрессивным генерализованным пародонтитом в тяжелой степени выявляли P.gingivalis, T.forsythensis и T.denticola в количестве более 10^4 ГЭ/мл (выявлены в 55,8 %; 70,9 % и 62,7 % случаев, соответственно).■

Закиров Т.В. к.м.н., ассистент кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии УГМА, г. Екатеринбург; Ворошилина Е.С. к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии УГМА, заведующая лабораторным отделением ООО МФЦ «Гармония», г. Екатеринбург; Бимбас Е.С. д.м.н., профессор, зав. кафедрой стоматологии детского возраста и ортодонтии УГМА, г. Екатеринбург; Стати Т.Н. к.м.н., доцент кафедры стоматологии детского возраста и ортодонтии УГМА, г. Екатеринбург; Автор, ответственный за переписку - Закиров Тарас Валерьевич, 620147, Екатеринбург, ул. Бардина 38 А, кафедра стоматологии детского возраста и ортодонтии УГМА, e-mail: sekir-zakirov@mail.ru

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. Ратейшак, Клаус Ратейшак; 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. Цимбалистов А.В., Нацльцшвили Т.Т., Кадурин Т.И., Шторина Г.Б. Агрессивные формы пародонтита. Состояние проблемы / Стоматология для всех. – № 1996.-№ 6.-п. 986-994.
6. Heid C.A. Real-time quantitative PCR. // Genome Res-1996.-№ 6.-п. 986-994.
7. Lindhe J. Clinical periodontology and implant dentistry [Text] / J. Lindhe, T. Karring, N. P. Lang, - 4 ed., 2003.