

Роль анаэробной микрофлоры в патогенезе одонтогенных флегмон

Иванюшко Т. П., Кафедра ГХС и ЧЛХ ПМГМУ им И.М.Сеченова, г. Москва; Тумбинская Л. В., к.б.н., зам.генерального директора по развитию ЗАО «НПФ ДНК-Технология», г. Москва; Смирнов А.В., Кафедра ГХС и ЧЛХ ПМГМУ им И.М.Сеченова, г. Москва; Балькин Р.А., Кафедра ГХС и ЧЛХ ПМГМУ им И.М.Сеченова, г. Москва; Херсонская А. М., менеджер по реклациям, ООО «ДНК-Технология», г. Москва

Role of anaerobic microflora in the pathogenesis of odontogenic phlegmons

Ivanuyshko T.P., Smirnov A.V., Balykin R.A., Khersonskaya A.M., Tumbinskaya L.V.

Резюме

Проведено изучение роли анаэробной микрофлоры в патогенезе гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области, в частности одонтогенных флегмон. Исследование сделано на основе методики полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени. На основании полученных данных показана роль групп азробных и анаэробных микроорганизмов в этиологии и патогенезе одонтогенных флегмон.

Ключевые слова: одонтогенные флегмоны, диагностика анаэробных микроорганизмов, ПЦР-диагностика в реальном времени

Summary

The role of anaerobic microflora in the pathogenesis of maxillofacial diseases, particularly odontogenic phlegmons, was investigated. Based on the results the role of pathogens in the etiology and pathogenesis of odontogenic phlegmons is shown. RT PCR used as a research method.

Keywords: odontogenic phlegmons, diagnostics of anaerobic microflora, real-time PCR

Введение

Проблема гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области (ГВЗ ЧЛО) остается актуальной, в связи с высокой частотой поступления в стационары больных с одонтогенными флегмонами (ОФ), представляющими угрозу для жизни больных [1, 2, 3].

В этиологии и патогенезе ОФ существенную роль играют состав и количество анаэробной микрофлоры, а также неспецифические факторы противомикробной защиты [1, 4, 5, 2, 6, 3, 7].

Вопрос этиологии флегмон изучается до настоящего времени. В возникновении ОФ основную роль играют облигатные спорообразующие анаэробные микроорганизмы, относящиеся к представителям нормальной резидентной микрофлоры полости рта [8].

Существенный вклад в изучение причинных факторов ГВЗ ЧЛО принесло использование полимеразной цепной реакции (ПЦР), обладающей высокой чувствительностью и

специфичностью при определении возбудителей инфекции [9]. ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени дает возможность не только диагностировать труднокультивируемые анаэробные микроорганизмы, но и количественно оценивать их содержание в исследуемом образце.

Совершенствование диагностики характера микрофлоры и уровня неспецифических факторов защиты позволит повысить эффективность лечения больных с ОФ.

Целью нашей работы явилось изучение роли анаэробной микрофлоры в этиологии и патогенезе больных с одонтогенными флегмонами.

Материалы и методы

Было обследовано 30 больных с одонтогенными флегмонами, в возрасте от 20 до 55 лет, из них 10 женщин и 20 мужчин, госпитализированных в клинику ЧЛХ УКБ №2. У 10 больных гнойно-воспалительный процесс локализовался в одном клетчаточном пространстве, у 20 больных в 2-х и более. Среди больных с ОФ наиболее часто встречались флегмоны: поднижнечелюстного пространства - 15 случаев (50% от общего числа случаев), дна полости рта - 9 случаев (30%), околушно-жевательное, крылочелюстное по 3 случая (10%).

Контрольную группу составили 10 здоровых доноров 22 - 40 лет, а также 6 больных из отделения реконструктивной хирургии ЧЛХ. Взятие материала из чистой

Ответственный за ведение переписки -
Херсонская Анастасия Михайловна,
тел.: (495) 980 45 55
a.khersonskaya@dna-technology.ru

раны проводили во время операций по остеосинтезу.

Оценку качественного и количественного состава микрофлоры (материалом служили: слюна и содержимое раны) у больных с ОФ и здоровых лиц проводили методом ПЦР-диагностики в реальном времени.

ДНК микроорганизмов выделяли при помощи набора реагентов «Проба-ГС» (производства ООО «НПО ДНК-Технология») согласно прилагаемой инструкции производителя. Методика выделения основана на сорбции ДНК на органическом носителе, отмывке примесей, с последующей элюцией нуклеиновых кислот с сорбента [10]. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с помощью детектирующего амплификатора «ДТ-96» (производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Учет результатов вели с помощью программного обеспечения, прилагающегося к детектирующему амплификатору «ДТ-96».

Для постановки ПЦР в реальном времени использовали реагенты ООО «НПО ДНК-Технология», согласно инструкции производителя. После прохождения амплификации, по показателю индикаторного цикла (Cp) рассчитывали количество ДНК исследуемого инфекционного агента в исходном материале.

С помощью данной методики была проведена количественная оценка содержания в образцах 15 групп факультативно- и облигатно-анаэробных микроорганизмов (МО), предположительно, вызывающих гнойно-некротические процессы:

- 1.Сем. Enterobacteriaceae
2. Streptococcus spp.
3. Staphylococcus spp.
4. Fusobacterium spp.
5. Prevotella spp., Porphyromonas spp.
6. Megasphaera spp., Veillonella spp., Dialister spp.
7. Corynebacterium spp., Mobiluncus spp.
8. Leptotrichia spp., Sneathia spp.
9. Lachnobacterium spp., Clostridium spp.
10. Haemophilus influenzae
11. Peptostreptococcus spp.
12. Bacteroides spp.
13. Anaerococcus spp.
14. Eubacterium spp.
15. Capnocytophaga spp.

Как показатель общей обсемененности исследуемого образца, использовали общую бактериальную массу (ОБМ).

Результаты и обсуждение

Полученные результаты исследования состава микрофлоры, наиболее значимых при ГВЗ ЧЛО представлены в таблицах 1 и 2.

Сравнение изучаемых показателей в слюне у здоровых лиц и больных ОФ показало, что общая бактериальная масса была достаточно высокой в обеих группах (медиана=10^{5.9} и 10^{6.6} ГЭ/образец, соответственно).

Таблица 1. Показатели состава микроорганизмов слюны у больных с ОФ(п=15) и контрольной группы(п=10) (Lg ГЭ/образец).

Показатели	ОФ		Контроль	
	Медиана, Lg ГЭ/образец	5-95 Перцентиль	Медиана, Lg ГЭ/образец	5-95 Перцентиль
Слюна				
Общая бактериальная масса	6,6	5,5-7,3	5,9	5,2-6,2
Факультативно-анаэробные (аэробные) микроорганизмы				
1.Сем. Enterobacteriaceae	4,0	3,2-4,9	3,5	3,0-4,5
2. Streptococcus spp.	5,7	4,4-6,6	5,1	4,4-6,0
3. Staphylococcus spp.	1,5	0-2,2	1,9	0-2,4
Облигатно-анаэробные микроорганизмы				
4. Fusobacterium spp.	3,6	0-6,1	3,8	2,4-5,5
5. Prevotella, Porphyromonas	6,0*	4,6-7,3	4,8*	3,6-5,9
6. Megasphaera, Veillonella, Dialister	4,5	3,0-6,0	3,8	2,4-5,6
7. Corynebacterium, Mobiluncus	2,2	0-4,2	2,1	1,9-2,3
8. Leptotrichia, Sneathia	3,7	0-5,6	3,1	2,7-3,3
9. Lachnobacterium, Clostridium	3,8	2,3-5,7	2,5	2,2-5,4
10. Haemophilus influenzae	5,0	4,1-6,8	4,5	3,2-4,7
11. Peptostreptococcus spp.	3,1	2,3-5,7	3,4	2,1-4,7
12. Bacteroides spp.	4,8	0-7,5	4,7	4,0-6,3
13. Anaerococcus spp.	1,0	0-6,8	0	0
14. Eubacterium spp.	3,6	2,7-5,5	3,3	2,4-4,6
15. Capnocytophaga spp.	3,6	1,9-6,5	3,4	2,6-5,1

*-достоверные различия между группами (p<0,01)

Таблица 2. Состав микроорганизмов раны у больных с ОФ (n=30) и у контрольной группы пациентов (n=10) (Lg ГЭ/образец).

Показатели	ОФ		Контроль	
	Медиана Lg ГЭ/образец	5-95 Процентиль	Медиана Lg ГЭ/образец	5-95 Процентиль
Рана				
Общая бактериальная масса	7,2*	5,5-8,3	4,2	3,0-6,3
Факультативно-анаэробные(аэробные)микроорганизмы				
1.Сем. Enterobacteriaceae	3,9*	2,2-6,1	2,5	2,3-2,7
2. Streptococcus spp.	4,0*	1,4-6,9	2,5	1,4-4,1
3. Staphylococcus spp.	3,0	0-7,0	2,1	1,4-2,7
Облигатно-анаэробные микроорганизмы				
4. Fusobacterium spp.	5,6*	3,5-7,7	0,6	0-1,8
5. Prevotella, Porphyromonas	6,3*	5,0-8,5	2,2	1,9-2,6
6. Megasphaera, Veillonella, Dialister	5,0*	3,1-7,4	0,4	0-2,4
7. Corynebacterium, Mobiluncus	2,6	0-6,1	1,6	0-2,8
8. Leptotrichia, Sneathia	5,3*	3,1-7,6	0,9	0-2,3
9. Lachnobacterium, Clostridium	5,0*	3,2-7,0	1,1	0-1,9
10. Haemophilus influenzae	2,0*	0-5,6	0,3	0-2,7
11. Peptostreptococcus spp.	5,5*	3,9-7,7	1,2	0-2,4
12. Bacteroides spp.	5,4*	0-6,9	1,6	0-2,5
13. Anaerococcus spp.	2,5*	0-6,1	0,9	0-2,8
14. Eubacterium spp.	4,9*	0-7,7	2,6	2,1-3,8
15. Capnocytophaga spp.	0	0	0	0

*-достоверные различия между группами (p<0,05)

В слюне преобладали в основном представители группы Streptococcus spp. (10^{5.1} и 10^{5.7} ГЭ/образец, для контрольной группы и группы больных, соответственно). В слюне были найдены достоверные различия между группами по количеству микроорганизмов Prevotella spp. и Porphyromonas spp. (p<0,01) (Табл. 1).

Сравнение изучаемых микроорганизмов в чистой ране и в ране у больных с ОФ показало, что общая обсемененность раны при ОФ повышена в 1000 раз по сравнению с «чистой» раной (медиана=10^{4.2} и 10^{7.2} ГЭ/образец, соответственно) (Табл.2). Между сравниваемыми группами были обнаружены достоверные различия почти по всем исследованным показателям (p<0,05).

Как видно из полученных данных, у больных с одонтогенными флегмонами в ране обнаружено сообщество из представителей аэробно-анаэробных микроорганизмов, но в основном преобладали облигатно-анаэробные микроорганизмы (Табл.2). У всех обследованных больных с ОФ в материале, полученном из раны, было повышено содержание Fusobacterium spp., Prevotella spp.+Porphyromonas spp., Megasphaera spp., Veillonella spp., Dialister spp., Leptotrichium+Sneathia spp., Lachnobacterium spp., Clostridium spp., Peptostreptococcus spp., Bacteroides spp. по сравнению с группой здоровых лиц. Наибольших значений в ране, так же, как и в слюне, достигало количество группы микроорганизмов Prevotella spp.+Porphyromonas spp. (от 10^{5.0} до 10^{8.5} ГЭ/образец), что составляло до 10% всех выявляемых МО

в образце. Можно предположить, что эти облигатно-анаэробные микроорганизмы играют ведущую роль при развитии одонтогенных флегмон.

В отличие от слюны, в ране ни у представителей контрольной группы, ни у больных с ОФ не был обнаружен микроорганизм Capnocytophaga spp., что не подтверждает литературные данные о его этиологической роли в развитии ОФ.

Аэробная микрофлора была представлена всеми тремя группами исследованных микроорганизмов, но в наибольших количествах выявляли представителей группы Streptococcus spp. Наиболее высокие показатели, 10^{5.0-6.9} ГЭ/образец, наблюдали у 60% больных с одонтогенными флегмонами (18 больных из 30 обследованных).

Клинический пример

Больная М-на Т.И., 37 лет. № истории 46080. Д-з: Одонтогенная флегмона поднижнечелюстного пространства слева. Обострение хронического периодонтита зуба 37.

Одонтогенный источник инфекции при флегмоне прослежен нами при исследовании материала взятого одновременно из раны, после вскрытия флегмоны, в слюне и венозная кровь (в качестве контроля). Как видно из табл.4 в ране и слюне выявлено высокое содержание анаэробов. В ране после вскрытия флегмоны было умеренное содержание аэробов и преобладали анаэробные микроорганизмы.

Общая обсемененность раны при ОФ была почти в

Таблица 3. Показатели количественного и качественного состава микробного пейзажа у больной М-на.

Показатели	Количество, Lg ГЭ/образец		
	слюна	рана	кровь
1. Общая бактериальная масса	7,3	6,8	2,0
2. сем. Enterobacteriaceae	2,6	2,6	2,0
3. Streptococcus spp.	4,9	1,9	0
4. Staphylococcus spp.	1,9	3,9	1,5
5. Fusobacterium spp.	6,1	5,8	0
6. Prevotella, Porphyromonas	7,3	6,7	2,0
7. Megasphaera, Veillonella, Dialister spp.	6,0	5,3	0
8. Corynebacterium, Mobiluncus spp.	1,8	2,2	2,0
9. Leptotrichium, Sneathia spp.	5,6	5,4	0
10. Lachnobacterium, Clostridium spp.	5,7	5,0	2,0
11. Haemophilus influenzae	4,1	0	0
12. Peptostreptococcus spp.	5,7	5,2	1,6
13. Bacteroides spp.	7,3	6,8	1,9
14. Anaerococcus spp.	2,3	2,4	0
15. Eubacterium spp.	5,5	5,2	1,8
16. Capnocytophaga spp.	5,7	0	0

10 раз меньше, чем в слюне. Основную массу (почти 100% от всех выявленных и в слюне и в ране микроорганизмов) у пациентки составляли *Prevotella* spp. и *Porphyromonas* spp. В остальном микробный пейзаж раны и слюны отличался. Так среди аэробных микроорганизмов, в слюне преобладали *Streptococcus* spp., а в ране – представители группы *Staphylococcus* spp. Также в ране в больших количествах обнаружены *Corynebacterium*, *Mobiluncus* spp.

Микроорганизмы *Haemophilus influenzae* и *Capnocytophaga* spp. в ране вообще не встречались и были выявлены только в слюне пациентки.

Обсемененность венозной крови и присутствие в ней микроорганизмов были на уровне отрицательного контроля.

Выводы

Метод ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени позволяет проводить количественную диагностику труднокультивируемых анаэробных микроорганизмов, являющихся частью сложных микробных сообществ и делать это в сжатые сроки. Такие диагностические возможности эффективны при выявлении этиологии ОФ и могут быть использованы в клинической практике.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что у больных одонтогенными флегмонами в развитии патологических процессов принимают участие широкий спектр факультативно- и облигатно-анаэробных микроорганизмов. Наиболее значимыми являются представители группы *Prevotella* spp.+*Porphyromonas* spp., количества которых достоверно различаются у группы пациентов с ОФ и в группе здорового контроля.

Для выявления этиологии инфекционного процесса при ОФ наиболее показательным материалом служит содержимое раны.

Значительные выявляемые количества групп микроорганизмов – представителей анаэробной микрофлоры являются показателем развития массивного бактериального процесса, косвенным показателем уровня иммунодефицитного состояния у больных с одонтогенными флегмонами, уровня снижения противомикробных факторов защиты и показанием для включения иммунокорригирующей терапии.

Совершенствование диагностики состава микрофлоры позволит разработать эффективную системную антибактериальную терапию больных с гнойно-воспалительными заболеваниями ЧЛО. ■

Литература:

1. Бажанов Н.Н., Козлов В.А., Максимовский Ю.М., Робустова Т.Г. Состояние и перспективы профилактики и лечения гнойных воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области. - *Стоматология*. - Специальный выпуск. - Москва. - 9-13 сентября 1996. - с.38-39.
2. Соловьев М.М., Большаков О.П. Абсцессы, флегмоны головы и шеи. - Москва. - 2001. - 229с.
3. Робустова Т.Г. Хирургическая стоматология. - М. - «Медицина». - 2003. - 504с.
4. Бажанов Н.Н., Тер-Асатуров Г.П., Иванюшко Т.П.

- Некоторые иммунологические аспекты одонтогенного воспаления.-Российский Медицинский Форум.- Пилотный номер.-2007.-с.26-29.
5. Царев В.Н., Ушаков Р.В. Комплексная бактериологическая и иммунологическая диагностика заболеваний челюстно-лицевой области и шеи.-Методические рекомендации.-М.-1991.-28с.
 6. Дрегалкина А.А.,Журавлев В.П. Микробный состав гнойных очагов при острых воспалительных процессах в челюстно-лицевой области.- Уральский стоматологический журнал.-2003.-№3.-с.45-49.
 7. Тер-Асатуров Г.П., Иванюшко Т.П. Суперлимф-средство патогенетического лечения больных с одонтогенными флегмонами.- Нижегородский медицинский журнал.-2008.-№2.-вып.2.-с.292-295.
 8. Воробьев А.А., Буданова Е.В., Пашков Е.П. и др. Состояние проблемы инфекций, вызываемых анаэробными неспорообразующими бактериями.- Вестник РАМН.-1996.-№2.-с.3-7.
 9. Царев В.Н., Николаева Е.Н., Максимовский Ю.М., Плахтий Л.И. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики и контроля эффективности лечения генерализованного пародонтита. Рос. Стоматол.ж-л 2002.-№2.-с.12-19.
 10. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени.-М.-2009.-223с.