

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2013 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Э.Р. Тамарова, А.Р. Мавзютов, 2013

УДК 616.314.17-008.1

Э.Р. Тамарова, А.Р. Мавзютов

ОСОБЕННОСТИ МИКРОФЛОРЫ ПОЛОСТИ РТА У БОЛЬНЫХ ПАРОДОНТИТОМ

Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

При использовании молекулярно-генетических методов, отличающихся более высокой в сравнении с культуральным методом чувствительностью, исследована частота обнаружения основных пародонтопатогенов (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. macacae*) при пародонтите. Показано, что у больных пародонтитом в содержимом пародонтального кармана зубов и слюне методом ПЦР одновременно обнаруживаются сочетания нескольких видов указанных бактерий. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения молекулярно-генетических методов в стоматологии для этиологической диагностики и проведения адекватной антибактериальной терапии.

Ключевые слова: пародонтит, пародонтопатогенная микрофлора, полимеразная цепная реакция.

E.R. Tamarova, A.R. Mavzyutov

FEATURES OF MICROFLORA OF ORAL CAVITY IN PATIENTS WITH PERIODONTITIS

Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

The frequency of the main periodontopathogens (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. macacae*) in periodontitis was investigated using molecular genetic methods, which are more sensitivity in comparison with the cultural method. It is shown that in the content of teeth periodontal pockets and saliva of patients with periodontitis simultaneously detected a combination of several types of these bacteria by PCR method. The data obtained testify to the perspectiveness of the application of molecular genetic methods for etiological diagnostics and adequate antibiotic therapy in stomatology.

Key words: periodontitis, periodontopathogenic microflora, polymerase chain reaction.

Одной из важнейших проблем современной стоматологии являются воспалительные заболевания пародонта. Высокая распространенность указанной патологии среди взрослого населения, недостаточная эффективность её лечения и частота возникновения рецидивов при этом заболевании актуализируют необходимость поиска всё новых терапевтических средств, разработки более эффективных методов лечения и профилактики воспалительных заболеваний пародонта [1, 2].

В настоящее время все больше данных за то, что в этиопатогенезе пародонтита решающее значение имеет пародонтальная микрофлора. В частно-

сти, высокоинформативными «маркерными» микроорганизмами при пародонтите являются *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, *S. oralis*, *S. salivarius* и *S. macacae* и др. Показано, что метаболизм, а в ряде случаев и патогенность, указанных микроорганизмов могут кардинально изменять интенсивность воспалительного процесса в пародонте [1, 3]. Однако оценка роли этих и других бактерий в этиологии стоматологических заболеваний и разработка высокоэффективных методов их лечения в последние годы существенно сдерживается сложностью их выявления традиционными культуральными методами и невысокой информативностью серодиагностики.

Вместе с тем в целом ряде смежных областей медицины достаточно успешно в последнее время внедрен ряд высокоспецифичных и высокочувствительных методов, среди которых наиболее широкое распространение получила полимеразная цепная реакция (ПЦР). Однако в отечественной научной литературе исследования, при которых этот метод применялся для исследования микробиоты полости рта при пародонтите, немногочисленны [4-6].

Целью настоящего исследования явилась разработка тест-систем для ПЦР детекции пародонтопатогенов и исследование их распространенности у пациентов с хроническими формами пародонтита.

Материал и методы исследования

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

Материалом для исследования служили содержимое пародонтального кармана зубов и слюна. Содержимое пародонтального кармана отбирали из наиболее глубоких участков с помощью стерильных бумажных эндодонтических штифтов (размер № 25), которые затем помещали в пробирку с физиологическим раствором. Одновременно в другую пробирку собирали слюну. Полученные образцы транспортировали в лабораторию в охлажденном состоянии.

ДНК основных представителей пародонтопатогенной микрофлоры вы-

являли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК выделяли с использованием наборов «ДНК-экспресс» (НПФ «Лиетх», Россия). Амплификацию ДНК пародонтопатогенных микробов (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. macacae*) проводили при использовании подобранных нами праймеров в термоциклере Терцик МС-2 (НПФ «ДНК-Технология», Россия). На первом этапе исследования произведен подбор олигонуклеотидных праймеров к специфическим консервативным последовательностям ДНК основных бактерий, ассоциированных с пародонтитом – генам 16S рРНК, а также генам антибиотикоустойчивости, депонированным 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). Для амплификации и электрофоретической детекции продуктов амплификации применялись наборы соответствующих реагентов (ООО «Интерлабсервис», 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

У больных хроническим пародонтитом в содержимом пародонтального кармана при пародонтите обнаружены все исследованные микроорганизмы. Наиболее распространены были бактерии *Streptococcus mutans*, которые выявлены у 48 (80,0%) из 60 обследованных больных. Следует отметить высокую представленность *Streptococcus sanguis* и *S. oralis*, частота обнаружения которых превысила 50% 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 *S. salivarius* и *S. macacae* была равна 15,0% (9 больных).

Подобная тенденция по содержанию микроорганизмов наблюдалась и в образцах слюны больных пародонтитом. Максимальная представленность показана для *S. mutans* (51 человек, 85,0%). Доля больных с *S. sanguis* и *S. oralis* составила 39 (65,0%) и 37 (61,7%) человек соответственно. Обращает

на себя внимание несколько более высокая частота встречаемости в слюне бактерий *S. salivarius* и *S. sobrinus* по сравнению с материалом пародонтального кармана зубов – соответственно 28 (46,7%) и 25 (41,7%) случаев, однако эти различия оказались статистически незначимыми.

У пациентов с пародонтитом средней степени тяжести в исследованных биотопах полости рта наблюдались сочетания одновременно несколько 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 выявления других видовых сочетаний микроорганизмов не превышала 5%.

При анализе антибиотикоустойчивости бактерий, ассоциированных с пародонтитом, получены следующие результаты. У больных (n=21), у которых был выявлен *P. gingivalis*, гены устойчивости при использовании ПЦР к бацитрацину регистрировались в 3 (14,3%), к нитромидазолу - в 12 (57,1%), к ванкомицину - в 11 (52,4%) случаях. У больных (n=51), у которых обнаружен *S. mutans*, фрагменты генов, ассоциированных с устойчивостью к линкомицину, выявлены в 6 (11,8%), а к β-лактамам антибиотикам - в 7 (13,7%) случаях. Устойчивость штаммов *S. sanguis* к блеомицину установлена в 10 из 39 случаев (25,6%), *S. salivarius* к линкомицину – в 7 из 39 (17,9%) и к ванкомицину – в 8 (28,6%) случаях выявления указанных микроорганизмов у больных. Устойчивость *S. oralis* к тетрациклину наблюдалась в 12 (32,4%) из 37 случаев выявления данного микроорганизма при пародонтите.

Представленные данные свидетельствуют о достаточно широком распространении генов антибиотикорезистентности среди микроорганизмов, этиологически причастных к развитию пародонтита.

Выводы

1. Подобранные нами праймеры позволяют выявлять методом ПЦР при пародонтопатогенные бактерии видов *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Streptococcus mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. macacae* и *S. sobrinus*.

2. У больных пародонтитом в содержимом пародонтального кармана

зубов и слюны имеет место сочетание несколько видов бактерий.

3. Проведение молекулярно-генетических исследований у больных пародонтитом позволяет обосновать этиологический диагноз заболевания, назначить адекватную антибактериальную терапию, направленную на освобождение пациента от возбудителей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грудянов А.И., Овчинникова В.В. Профилактика воспалительных заболеваний пародонта. М: МИА, 2007. 80 с.
2. Лукиных Л.М., Круглова Н.В. Хронический генерализованный пародонтит. Часть I. Современный взгляд на этиологию и патогенез. Стоматология. 2011. 1: 123-125.
3. Николаева Е.Н., Царев В.Н., Щербо С.Н. и др. Применение новой тест-системы, основанной на полимеразной цепной реакции, в пародонтологии. Клин стоматол. 2004. 4: 63-67.
4. Царев В.Н., Ушаков Р.В. Антимикробная терапия в стоматологии. М.: Медицинское Информационное Агентство, 2004. 143 с.
5. Albander J.M., De Nardin E. Serum Ig G level to P. Gingivalis in healthy and early-onset periodontitis individuals. J. Dent. Res. 1999. Vol.78: 250-255.
6. Haffajee A.D., Socransky S.S. Microbiological etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology. 2000. 1994. Vol.5 (1): 78-111.

Поступила 20.10.2013

(Контактная информация:

Тамарова Эльмира Рифовна – заочный аспирант кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России: E-mail: tamarovufa2@mail.ru;

Мавзютов Айрат Радикович – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России: E-mail: ufalab@mail.ru.)