

Применение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для определения пародонтопатогенов

Э.М. Джафаров¹, У.Б. Эдишерашвили¹, М.З. Чониашвили², Д.Т. Таймазова³, А.А. Долгалев¹

¹ ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

² ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

³ «Городская стоматологическая поликлиника № 1», г. Владикавказ, Российская Федерация

РЕЗЮМЕ

Этиологическим фактором заболеваний пародонта является наличие пародонтопатогенов, при условии дисбаланса с комменсалами они начинают оказывать патологическое действие. При снижении количества пародонтопатогенов, находящихся в биопленке, возможно восстановление баланса и профилактика заболеваний пародонта или их переход в стадию ремиссии. На сегодняшний день наиболее информативным и доступным диагностическим способом определения пародонтопатогенов является полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пародонтит, пародонтопатогены, полимеразная цепная реакция (ПЦР), пародонт, профилактика.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Application of the real-time PCR-method for the determination of periodontopathogens

E.M. Jafarov¹, U.B. Edisherashvili¹, M.Z. Choniashvili², D.T. Taimazova³, A.A. Dolgalev¹

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Stavropol State Medical University», Ministry of HealthCare of the Russian Federation

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Kosta Khetagurov North Ossetian State University Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation

³ «City Dental Clinic № 1», Vladikavkaz, Russian Federation

SUMMARY

The etiological factor of periodontal diseases is the presence of periodontopathogens, under the condition of an imbalance with commensals, they begin to have a pathological effect. With a decrease in the number of periodontopathogens in the biofilm, it is possible to restore the balance and prevent periodontal diseases or their transition to the stage of remission. To date, the most informative and accessible diagnostic method for determining periodontopathogens is real-time PCR.

KEYWORDS: periodontitis, periodontopathogens, PCR, periodontium, prevention.

CONFLICT OF INTEREST. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Актуальность

Пародонтит – хроническое воспалительное заболевание десен полимикробной этиологии. *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* напрямую связаны с этим заболеванием и поэтому называются пародонтопатогенами или красными сложными бактериями [14, 15]. Эти грамотрицательные облигатные анаэробные бактерии существуют в составе биопленки, которая формируется в поддесневых карманах, а *Fusobacterium nucleatum* служит мостиком к наддесневой биопленке, состоящей в основном из стрептококков [16]. Липополисахарид (ЛПС) этих бактерий действует как иммуностимулятор, вызывая воспаление десен и активируя остеокласты через Toll-подобные рецепторы (TLR2

или TLR4), которые запускают экспрессию различных цитокинов, что, в свою очередь, вызывает резорбцию альвеолярной кости [14]. Однако недавние метагеномные исследования показывают, что в процесс заболевания может быть вовлечен широкий спектр микробиоты, связанной с пародонтитом, который еще предстоит идентифицировать [4].

Традиционное лечение пародонтита предполагает нехирургическое лечение, направленное на контроль патогенной биопленки зубного налета и зубного камня с поверхности коронки и корня с помощью механических процедур (скейлинг) в сочетании с улучшением личной гигиены, таким образом уменьшая воспаление и глубину кармана [10, 19.] В тяжелых случаях может потребоваться

антибактериальная терапия для ускорения разрешения болезни [5]. Такие терапевтические подходы не всегда связаны с успехом, и частая реколонизация обрабатываемых участков пародонтопатогенами, а также появление резистентности к антибиотикам привели к необходимости поиска новых терапевтических подходов для лечения заболеваний пародонта [3].

Среди различных процедур, используемых для обнаружения бактерий полости рта, таких как микробная культура, иммунологические анализы, ферментативные методы и молекулярная биология, диагностический метод на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) стал мощным и все более популярным инструментом благодаря своей скорости, чувствительности и эффективности [12].

Был разработан ряд методов для обнаружения и количественного определения пародонтальных патогенов, включая бактериальные культуры, проточную цитометрию, ДНК-ДНК-гибридизацию, иммунологические анализы, ферментативные методы и стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Однако большинство из этих методов трудоемки и требуют много времени. Кроме того, все они имеют свои субъективные ограничения для достижения желаемой чувствительности и специфичности для точного количественного определения конкретных бактерий в образцах [7, 13]. В последние годы для количественного определения бактерий была разработана технология количественной ПЦР в реальном времени. ПЦР в реальном времени с видоспецифичными праймерами преодолевает ограничения, связанные с традиционными методами, и становится более подходящей для количественного определения бактерий [1, 2, 6, 8, 9, 11, 19, 20, 21]. За последние 10 лет внимание привлекло использование слюны в качестве диагностической жидкости для заболеваний пародонта [17].

Материалы и методы

В обследование были включены 20 пациентов: 10 мужчины и 10 женщин, обратившиеся ООО «СКМУМЦ».

Все пациенты прошли опрос для сбора общего анамнеза и анамнеза заболевания, обследование для определения кровотечения при зондировании (BOP), глубины зондирования (PD), а также оценка потери клинического прикрепления (CAL), а также индекса зубного налета (PI), и оценка рентгенологической потери костной ткани (RBL). Критериями включения пациентов в опытную группу был диагноз пародонтит средней степени тяжести (Наличие

BOP, PD – ≤ 5 мм, CAL – 3–4 мм, RBL – 15–33% PI – 1–3). Отсутствие в анамнезе потери зубов из-за пародонтита) Контрольную группу составили пациенты со здоровыми тканями пародонта (BOP – <10%, PD – ≤ 3 мм, CAL – нет, RBL – нет PI – 0–1).

В опытную группу вошло 10 пациентов (5 мужчин и 5 женщин) в контрольную 10 (5 мужчин и 5 женщин)

Забор материала производили утром, натощак, до процедуры чистки зубов. Предварительно зуб был высушен стерильными марлевыми тампонами. Забор образцов производили при помощи стерильных бумажных эндодонтических штифтов размером № 25, путем погружения в самый глубокий пародонтальный карман (пациенты опытной группы) или в десневую борозду (пациенты контрольной группы) на 10 с. Затем бумажный штифт был извлечен и помещен в пластиковую пробирку типа «Эппендорф» со средой «ДНК-Экспресс». 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 при помощи набора «Дентоскрин». Время от забора до начала исследования материала составляло менее 24 ч.

Результаты исследования

В контрольной группе у 8 пациентов была обнаружена *Tannerella forsythensis*, у 6 пациентов группы обнаруживалась *Treponema denticola*, что может свидетельствует о повышенном риске развития заболеваний пародонта. По данным литературы *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* входят в «красный комплекс» пародонтопатогенов (Socransky et al., 1998). Бактерии входящие в эту группу препятствуют колонизации комменсальных бактерий и считаются наиболее патогенным пародонтальным комплексом, обнаруживаемым в значительных количествах при активном и прогрессирующем пародонтите (Thurnheer et al., 2014; Holt & Ebersole, 2005). Результаты контрольной группы представлены в Таблице 1.

У 100% пациентов опытной группы наиболее часто обнаруживается *Porphyromorans gingivalis* (42,9%), *Tannerella forsythensis* (66,7%) и *Treponema denticola* (33,3%). *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola*, сгруппированы в группу, известную как «красный комплекс» (Socransky et al., 1998).

Таблица 1
Результаты обследования контрольной группы пациентов

№	Пол	Возраст	Зона	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> (Lg)	<i>Porphyromorans gingivalis</i> (Lg)	<i>Prevotella intermedia</i> (Lg)	<i>Tannerella forsythensis</i> (Lg)	<i>Treponema denticola</i> (Lg)
1	М	31	46				2,5	
2	М	26	46					
3	Ж	30	46				2,1	
4	Ж	34	36		2,1	0,9	2,4	2,2
5	Ж	28	36					
6	М	27	36				2,1	
7	Ж	30	46			2	2,9	
8	М	24	46				2,6	1,6
9	М	25	26				2,6	
10	Ж	29	26				1,7	

Таблица 2

Результаты обследования опытной группы пациентов

№	Пол	Возраст	Зона	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> (Lg)	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (Lg)	<i>Prevotella intermedia</i> (Lg)	<i>Tannerella forsythensis</i> (Lg)	<i>Treponema denticola</i> (Lg)
1	Ж	48	33		4,6	4,5	3,8	3,4
2	М	60	46	2	5,3	4,2	3,8	4
3	Ж	53	15		1,4			2,5
4	М	61	36		4,5		3,4	2,6
5	М	54	26		4,2			3,3
6	Ж	64	44		2,5		0,8	
7	М	61	25		5,2		4,3	4
8	Ж	61	35		1,9			
9	М	56	22		3,5	2,9	3,4	
10	Ж	44	34		4,1	3,1	3,4	3,9

Наиболее редко обнаруживается *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (4,8%) и *Prevotella intermedia* (14,3%). Результаты опытной группы представлены в Таблице 2.

Вывод

Результаты исследования дают понимание о качественном и количественном нахождении пародонтопатогенов у лиц с пародонтитом средней степени тяжести, а также у клинически здоровых пациентов. Этиологической причиной воспалительных заболеваний тканей пародонта являются микроорганизмы, и обнаружение их на ранней или доклинической стадии определяет успех лечения, позволяя снизить микробную нагрузку.

Метод полимеразной цепной реакции широко не применяется в клинической практике, хотя имеет ряд преимуществ:

- контроль микробного пейзажа перед лечением, а также на этапах,
- профилактика заболеваний пародонта на объективном уровне,
- раннее обнаружение заболеваний пародонта.

Список литературы / References

1. Choi EJ, Lee SH, Kim YJ (2009). Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent* 19:141–147.
2. Colombo AV, Barbosa GM, Higashi D, di Micheli G, Rodrigues PH, Lorenzetti Simionato MR (2013 Jun 25). Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. *J Med Microbiol* 62(Pt 10):1592–1600.
3. Gupta G. Probiotics and periodontal health. *J Med Life* 2011; 4(4): 387–394.

4. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10(10): 717–725.
5. Hung HC, Douglass CW. Meta-analysis of the effect of scaling and root planing, surgical treatment and antibiotic therapies on periodontal probing depth and attachment loss. *J Clin Periodontol* 2002; 29(11): 975–986.
6. Hyvärinen K, Laitinen S, Paju S et al (2009). Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immunol* 15:195–204.
7. Loomer PM (2004). Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 34: 49–56.
8. Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y et al (2003). Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *ItiQ* gene and total bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol* 39:81–86.
9. Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Martín C, Silva A (2004). Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 31:1054–1060.
10. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet* 2005; 366(9499): 1809–1820.
11. Price RR, Viscount HB, Stanley MC, Leung KP (2007). Targeted profiling of oral bacteria in human saliva and in vitro biofilms with quantitative real-time PCR. *Biofouling* 23:203–213.
12. Rodu B. The polymerase chain reaction: the revolution within. *Am J Med Sci* 1990;299:210–216.
13. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A (2004). Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 31:1034–1047.
14. Socarransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134–44. doi: 10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x. PMID: 9495612.
15. Socarransky S.S. and Haffajee A.D. (2002). Dental Biofilms: Difficult Therapeutic Targets. *Periodontology* 2000, 28, 12–55. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280102.x>.
16. Socarransky S.S. and Haffajee A.D. (2005). Periodontal Microbial Ecology. *Periodontology* 2000, 38, 135–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>.
17. Spielmann N, Wong DT (2011). Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Dis* 17:345–354.
18. Suvan JE. Effectiveness of mechanical nonsurgical pocket therapy. *Periodontol* 2000 2005; 37: 48–71.
19. Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y (2005). Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan real-time PCR. *Clin Med Res* 3:176–185.
20. Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N (2002). Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 217:23–30.
21. Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Kawada M, Koga T (2003). Development of a 5' fluorogenic nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 41:863–866.

Статья поступила / Received 14.03.2023
Получена после рецензирования / Revised 24.03.2023
Принята в печать / Accepted 26.03.2023

Информация об авторах

Джафаров Эльнур Матлаб оглы¹, заочный аспирант кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии
ORCID ID: 0000-0001-9995-3749. E-mail: elnur985@mail.ru
Эдisherашвили Ушанги Бесикович¹, заочный аспирант кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии
ORCID ID: 0000-0002-1711-1415. E-mail: ushangimaster@mail.ru
Чониашвили Марина Зурабовна², старший ассистент кафедры терапевтической, хирургической и детской стоматологии с курсом геронтологии и заболевания полости рта. E-mail: Choniashvili.marina@mail.ru
Таймазова Дилара Тимуровна³, врач стоматолог-терапевт. E-mail: dilya.04@mail.ru
Долгалева Александра Александрович¹, д.м.н., доцент, профессор кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии, заведующий лабораторией трансфера инновационных медицинских изделий и технологий

¹ ФГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
² ФГБОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет имени Коста Левановича Хетагурова» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации
³ «Городская стоматологическая поликлиника № 1», г. Владикавказ, Российская Федерация

Контактная информация:

Джафаров Эльнур Матлаб оглы. E-mail: elnur985@mail.ru

Для цитирования: Джафаров Э.М., Эдisherашвили У.Б., Чониашвили М.З., Таймазова Д.Т., Долгалева А.А. Применение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени для определения пародонтопатогенов. Медицинский алфавит. 2023;(12):72–74. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-12-72-74>

Author information

Jafarov Elnur Matlab oglu¹, postgraduate student of the Department of general practice dentistry and pediatric dentistry
ORCID ID: 0000-0001-9995-3749. E-mail: elnur985@mail.ru
Edisherashvili Ushangi Besikovitch¹, postgraduate student of the Department of General Practice Dentistry and Pediatric Dentistry
ORCID ID: 0000-0002-1711-1415. E-mail: ushangimaster@mail.ru
Marina Zurabovna Choniashvili², Senior Assistant of Therapeutic, Surgical and Pediatric Dentistry with a Course of Gerontology and Oral Diseases.
E-mail: Choniashvili.marina@mail.ru
Dilyara Timurovna Taimazova³, Dentist-therapist. E-mail: dilya.04@mail.ru
Dolgaleva Alexandra Alexandrovich¹, PhD, MD, Head of the Center for Innovation and Technology Transfer, Professor of the Department of General Practice Dentistry and Pediatric Dentistry
E-mail: dolgaleva@dolgalev.pro. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6352-6750>

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Stavropol State Medical University», Ministry of HealthCare of the Russian Federation
² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education «Kosta Khetagurov North Ossetian State University Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation
³ «City Dental Clinic № 1», Vladikavkaz, Russian Federation

Contact information

Jafarov Elnur Matlab oglu. E-mail: elnur985@mail.ru

For citation: Jafarov E.M., Edisherashvili U.B., Choniashvili M.Z., Taimazova D.T., Dolgaleva A.A. Application of the real-time pcr-method for the determination of periodontopathogens. Medical alphabet.2023; (12):72–74. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2023-12-72-74>

