Первый опыт детекции молекулярных маркеров пародонтопатогенных видов 1-го и 2-го порядка при одонтогенных гнойно-воспалительных процессах челюстно-лицевой области с применением разных диагностических систем

Д.м.н., проф. В.Н. ЦАРЕВ[1, 2]* к.м.н. Е.В. ИППОЛИТОВ[2], д.м.н., проф. В.В. ШУЛАКОВ[3], И.В. НИКИТИН[1]

[1]Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии (зав. — д.м.н., проф. В.Н. Царев) стоматологического факультета, [2]лаборатория молекулярно-биологических исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института (дир. — д.м.н., проф. В.Н. Царёв); [3]кафедра хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии (зав. — д.м.н., проф. А.Ю. Дробышев) стоматологического факультета ФБГУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Россия

The first experience with the detection of the molecular markers of the 1st and 2nd order periodontal pathogenic bacteria associated with the odontogenic pyo-inflammatory processes in the maxillofacial region with the use of various diagnostic systems

V.N. TSAREV[1, 2], E.V. IPPOLITOV[2], V.V. SHULAKOV[3], I.V. NIKITIN[1]

[1]Department of Microbiology, Virology and Immunology (Head — V.N. Tsarev) Stomatological Faculty; [2]Laboratory of Molecular-Biological Investigations, Research Medical Stomatological Institute (Head — V.N. Tsarev); [3]Department of Surgical Stomatology and Maxillofacial Surgery (Head — A.Yu. Drobyshev) Stomatological Faculty Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

Представлен первый опыт детекции ДНК пародонтопатогенных видов бактерий — возбудителей одонтогенного воспаления с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). **Цель исследования**: оценка эффективности молекулярно-генетического метода диагностики одонтогенных воспалительных процессов челюстно-лицевой области с применением разных наборов реагентов. **Материал и методы.** Проведено исследование гнойного экссудата 32 больных одонтогенными флегмонами от 18 до 56 лет с использованием двух вариантов диагностических систем — МультиДент-5 и Micro-Ident plus. **Результаты.** Установлено, что изученные наборы реагентов для ПЦР-диагностики позволяют определить видовой состав микрофлоры в течение 24 ч с момента оказания ургентной помощи. Определен спектр пародонтопатогенных видов 1-го и 2-го порядка, очевидно, играющих роль в развитии одонтогенного воспаления.

Ключевые слова: детекция ДНК, одонтогенное воспаление, флегмоны, гнойный экссудат, полимеразная цепная реакция, ургентная помощь.

The authors describe the first experience with the detection of DNA of the periodontal pathogenic bacteria inducing odontogenic inflammation by means of polymerase chain reaction (PCR). **The objective** of the study was to estimate the effectiveness of the molecular-genetic method for diagnostics of the odontogenic inflammatory processes in the maxillofacial region with the use of various reactant kits. **Material and methods.** Suppurative exudate obtained from 32 patients presenting with odontogenic phlegmonas at the age varying from 18 to 56 years was investigated using two variants of diagnostic systems (MultiDent-5 and Micro-Ident plus). **Results.** It was shown that the reactant kits for PCR diagnostics used in the present study made it possible to determine the species composition of periodontal microflora within 24 hours after delivery of urgent care. The spectrum of the 1st and 2nd order periodontal pathogenic microbial species allegedly playing the role in the development of odontogenic inflammation has been identified.

Key words: detection of DNA, odontogenic inflammation, phlegmonas, suppurative exudate, polymerase chain reaction, urgent medical aid.

Одной из наиболее актуальных проблем хирургической стоматологии по-прежнему остается совершенствование методов профилактики, диагностики и лечения инфекционных воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области. Это связано с сохраняющейся высокой частотой этих заболеваний в общей структуре стоматологической заболеваемости, увеличением числа случаев развития атипично протекающих форм воспаления, развивающихся на фоне нарушенной реактивности орга-

© Коллектив авторов, 2014

*e-mail: nikola777@rambler.ru

низма и изменяющихся свойств микроорганизмов, постоянно приспосабливающихся к новым условиям существования [5, 7].

По данным современной литературы, базирующейся на результатах бактериологического исследования, наиболее часто встречающийся анаэробный компонент микробных ассоциаций при воспалительных процессах челюстно-лицевой области — представители группы бактероидов (преимущественно относящиеся к родам *Porphyromonas*, *Prevotella*) — на их долю приходится от 19 до 23% случаев. Реже встречаются фузобактерии и пептострептококки — 8—16%, а также вейлонеллы, пропионибактерии, эубактерии и извитые формы — 4—10% случаев [3, 4, 6, 7].

Однако известны вирулентные виды бактерий, обнаруживаемые в полости рта, как правило, пародонтопатогенной группы, которые невозможно или трудно идентифицировать традиционным бактериологическим методом исследования, даже с применением техники анаэробного культивирования [1, 2].

Так, выявление таких видов, как *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* spp. затруднено в связи с ограниченной возможностью их культивирования на питательных средах. Есть определенные сложности и при выделении основных пародонтопатогенных видов — *Porphyromonas gingivalis* и *Tannerella forsythia* [1, 6]. Кроме того, при использовании анаэробного метода культивирования, диагностика нередко бывает малоэффективной, поскольку занимает продолжительное время — 5—7 сут и более. Особенности транспортировки материала, необходимость использования большого количества питательных сред, газовых смесей для культивирования, использование специальных идентификационных систем — все это является недостатками традиционного метода, так как усложняет и затрудняет процесс клинико-лабораторного исследования, увеличивает вероятность диагностических ошибок [1, 4].

Отсутствие возможности проведения современной и своевременной диагностики при данной патологии создает трудности в выборе адекватной антибактериальной терапии и создает предпосылки для развития грозных осложнений. В связи с тем литература по использованию молекулярно-генетического метода малочисленна и ограничивается несколькими сообщениями в отечественной и зарубежной печати, изучение эффективности данного метода диагностики при одонтогенных воспалительных процессах является актуальной задачей современной хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии [1, 6, 7].

Цель исследования: оценить эффективность молекулярно-генетического метода диагностики одонтогенных воспалительных процессов челюстно-лицевой области с применением разных наборов реагентов для выявления молекулярных маркеров пародонтопатогенных бактерий 1-го и 2-го порядка.

Материал и методы

Обследованы 32 пациента (18 мужчин и 14 женщин) в возрасте от 18 до 56 лет. Пациенты были госпитализированы с диагнозом одонтогенной флегмоны дна полости рта (19 пациентов) и флегмоны подчелюстной области (11 пациентов) в отделение центральной стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Московского государственного медико-стоматологического университета (МГМСУ) им. А.И. Евдокимова и отделение хирургической стоматологии ГКБ №36, где им оказывали ургентную медицинскую помощь.

Под внутривенным наркозом и местной анестезией Sol. Lidocaini 0,5% — 10—30 мл производили разрез кожи длиной 5—10 см, отступя от нижнего края челюсти на 2,0 см. Послойно рассекали подкожную клетчатку, платизму. Полутупым путем проходили в подчелюстное, подподбородочное, крылочелюстное пространства пораженной стороны, получали гнойное отделяемое. Раны дренировали трубочными дренажами, которые фиксировали йодоформным тампоном. Накладывали асептическую повязку.

Отбор проб для исследования (гнойный экссудат), в соответствии с протоколом фирмы производителя тест-систем, проводили бумажными чипами, которые помещали в пробирки Эппендорфф с подготовленным стерильным физиологическим раствором. Материал для исследования доставляли в лабораторию кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова в течение 2 ч.

Для осуществления полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали отечественный амплификатор, в который помещали пробирки с реакционной смесью, а также ультрацентрифуги, термошейкеры и другое необходимое оборудование. Учет результатов проводили в агарозном геле. Результаты исследования материала были доступны для анализа уже через 12—24 ч.

Как известно, ПЦР — искусственный процесс многократного копирования (амплификации) специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro*. Амплификацию ДНК выполняли термостабильным ферментом ДНК-полимеразой при 72 °С. Начало синтеза новой цепи ДНК инициировали специфическими праймерами — «затравочными» олигонуклеотидами. Праймеры ограничивали копируемый участок с двух сторон, связываясь с противоположными цепями ДНК-мишени. Праймеры были ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекал только между ними, удваивая количество копий этого участка ДНК [1, 2].

Результаты молекулярно-биологического исследования материала, полученного при вскрытии одонтогенных флегмон с использованием двух разных наборов реагентов для ПЦР-диагностики

Вид пародонтопатогенных бактерий 1-го и 2-го порядка	Частота, %
1.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitas*	26,6
1.2. *Porphyromonas gingivalis*	46,6*
1.3. *Tannerella forsythia*	73,3*
2.1. *Prevotella intermedia*	66,6*
2.2. *Treponema denticola*	20,0
2.3. *Peptostreptococcus micros*	0
2.4. *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*	40,0*
2.5. *Campylobacter rectus*	0
2.6. *Eubacterium nodatum*	0
2.7. *Eikenella corrodents*	0
2.8. *Capnocytophaga* spp. (*S. gingivalis*, *C. ochraces*, *C. sputigena*)	0

Примечание. * — разница статистически достоверна ($p<0,002$).

Для выделения ДНК из исследуемого материала использовали вариант пробоподготовки с помощью набора реагентов ГенЛаб (Россия), включающего: экстраген — суспензию смеси гранул ионообменников (1 флакон, 10 мл); энзимикс, протеолитический комплекс (1 пробирка с лиофилизированным содержимым), растворитель энзимикса (1 пробирка, 100 мкл). Дальнейшее выделение и детекцию ДНК пародонтопатогенных бактерий осуществляли в соответствии с медицинской технологией ФС-2006/043-У, разработанной на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии МГМСУ [1].

Анализ молекулярных маркеров методом ПЦР-диагностики проводили с учетом рабочей классификации пародонтопатогенных видов, позволяющей разделить их по значимости в патологии пародонта на виды 1-го и 2-го порядка [2]. Соответственно выявление молекулярных маркеров трех основных видов пародонтопатогенов 1-го порядка: *Aggregatibacter actinomycetemcomitas*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, и двух пародонтопатогенов 2-го порядка — *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* — осуществляли, используя отечественную систему МультиДент-5. Выявление еще шести видов пародонтопатогенов 2-го порядка: *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodents*, *Capnocytophaga* spp. (*S. gingivalis*, *C. ochraces*, *C. sputigena*) проводили с использованием тест-системы Micro-Ident plus.

Одновременно выполняли бактериологическое исследование с применением техники анаэробного культивирования в анаэростатах с бескислородной газовой смесью. Для получения демонстраций готовили мазки из выделенных чистых культур и осуществляли микрофотографирование с использованием цифровой техники микроскопа Eclips.

Статистическую обработку результатов проводили методами непараметрической статистики с использованием критерия Манна—Уитни.

Результаты исследования

При проведении молекулярно-биологических исследовании нами были проанализированы результаты частоты обнаружения бактериальных видов пародонтопатогенной группы в гнойном экссудате, полученном у пациентов при ургентном хирургическом лечении (вскрытии и дренировании) одонтогенных флегмон челюстно-лицевой области **(см. таблицу)**.

В результате проведенного исследования получили следующее процентное соотношение по 11 бактериальным видам. Как видно из **таблицы**, такой приоритетный пародонтопатоген 1-го порядка и частый возбудитель гнойно-воспалительных процессов полости рта, как *Aggregatibacter actinomycetemcomitas*, выделяли из полученного гнойного экссудата в 26,6% случаев. Другой пародонтопатогенный вид 1-го порядка *Porphyromonas gingivalis* выявлен у 46,6% пациентов. Максимальная частота установлена для пародонтопатогенного вида 1-го порядка *Tannerella forsythia* — у 73,3% пациентов.

Частота выявления пародонтопатогенных видов 2-го порядка была значительно ниже, за исключением двух возбудителей — *Prevotella intermedia*, который был идентифицирован нами в 66,6% случаев и *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, который обнаружили в гнойном экссудате в 40% случаев.

Частота выявления молекулярных маркеров вида *Treponema denticola* составляла 20%, в то время как молекулярные маркеры остальных пародонтопатогенных видов 2-го порядка (*Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eikenella corrodents*, *Capnocytophaga* spp.) не были выявлены ни у одного пациента.

Полученные данные были подтверждены для культивируемых возбудителей при бактериологическом методе исследования. На **рисунке** представлены фотографии препаратов чистых культур анаэробных бактерий *F. nucleatum*, *T. forsythia*, полученные с помощью цифровой камеры микроскопа Eclips.

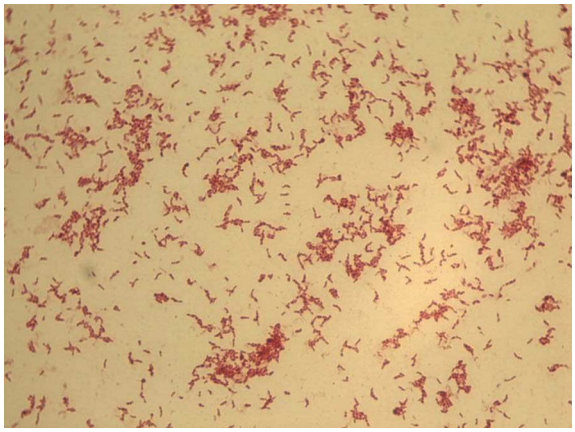
Заключение

Сочетание новых подходов к диагностике и лечению одонтогенных воспалительных процессов позволяет повысить эффективность оказания ургентной медицинской помощи пациентам. Большие возможности в диагностике одонтогенных инфекций открывает молекулярно-генетический метод исследования. ПЦР, лежащая в основе данного метода, позволяет многократно умножить за несколько часов специфический фрагмент молекулы ДНК возбудителя и обнаружить его в исследуемом материале даже при незначительном количестве последнего. При этом нет необходимости соблюдать особые условия стерильности взятия материла, практически нет ограничений по времени и способу доставки материала в лабораторию.

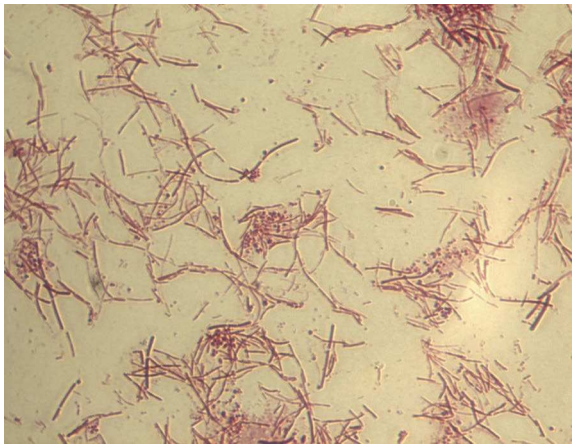
Использование молекулярно-биологического метода диагностики позволяет в течение 12—24 ч с момента оказания ургентной помощи определить видовой состав микрофлоры. Высокая чувствительность метода, быстрота получения результатов обусловливают высокую эффективность данной методики при диагностике воспалительных процессов головы и шеи.

Как показали наши исследования, набор праймеров, содержащихся в отечественной системе МультиДент-5, имеет больше перспектив для диагностики одонтогенных процессов по сравнению с немецкой системой Micro-Ident plus, так как праймеры пародонтопатогенных видов 2-го порядка этой тест-системы не выявляли соответствующих возбудителей, за исключением *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*, который обнаруживали в гнойном экссудате в 40% случаев.

В заключение необходимо подчеркнуть, что возможность оперативно получить результаты молекулярно-биологического исследования позволяет врачу быстро и точно подобрать антибактериальную терапию пациенту.



а



б

Мазок из чистой культуры возбудителя одонтогенной инфекции *T. forsythia* (а) и *F. nucleatum* (б).
Окраска по Граму. Ув. ×90, масляная иммерсия.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Давыдова М.М., Плахтий Л.Я., Царев В.Н.* Методы микробиологического исследования, применяемые в стоматологии. В кн.: Микробиология, вирусология и иммунология полости рта. Под ред. проф. Царева В.Н. М: ГЭОТАР-Медиа 2013; 223—273.
2. *Николаева Е.Н., Царев В.Н., Ипполитов Е.В.* Пародонтопатогенные бактерии — индикаторы риска возникновения и развития пародонтита. Стоматология для всех 2011; 1: 4—7.
3. *Царев В.Н.* Антимикробная терапия в стоматологии. Руководство. 2-е изд. М: Медицинское информационное агентство 2006.
4. *Bratton T.A., Jackson D.C., Nkungula-Howlett T., Williams C.W., Bennett C.R.* Management of complex multi-space odontogenic infections. Tenn Dent Assoc 2002; 82: 3: 39—47.
5. *Robertson D., Smith A.J.* The microbiology of the acute dental abscess. J Med Microbiol 2009; 58: Pt 2: 155—162.
6. *Sánchez R., Mirada E., Arias J., Paño J.R., Burgueño M.* Severe odontogenic infections. Epidemiological, microbiological and therapeutic factors. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2010.
7. *Tsarev V., Chuvilkin V., Ippolitov E.* Susceptibility of oral anaerobic bacteria to fluoroquinolones of various generations and molecular characterization of resistant strains. Int J Infect Dis 2008; 12: 1: 309—310.