

Т.А. Гайдарова, Н.В. Попова

РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ*Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)*

Статья посвящена сравнительному анализу ПЦР-метода и метода культурального анализа при диагностике хронического генерализованного пародонтита. Авторы пришли к заключению о том, что в диагностическом процессе необходимо использовать оба метода исследования в связи с тем, что по результатам анализов в 66,4 % случаев был выявлен хронический генерализованный пародонтит, ассоциированный с пародонтопатогенами, встречающимися при средней и тяжелой степени заболевания, и в 19,4 % — пародонтит легкой степени тяжести с преобладанием смешанной флоры, представленной патогенными стрептококками и энтеробактериями.

Ключевые слова: пародонтит, ПЦР-метод, микробиологическое обследование, культуральный анализ

THE RESULTS OF MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF PATIENTS WITH CHRONIC GENERALIZED PARODONTITIS

T.A. Gaydarova, N.V. Popova

Irkutsk State Medical University, Irkutsk

The article is devoted to the comparative analysis of PCR and method of cultural analysis at diagnostics of chronic generalized parodontitis. The authors have come to the conclusion that both methods should be used in diagnostic process because according to the results of the examinations chronic generalized parodontitis associated with parodontopathogenes met at medium and severe degree of disorder was revealed in 66,4 %, and in 19,4 % the tests revealed parodontitis of light degree with prevalence of mixed flora presented by pathogenic streptococci and enterobacteria.

Key words: parodontitis, PCR, method of cultural analysis

По мнению большинства исследователей, пародонтит является заболеванием, в основе развития которого лежит комплекс происходящих в полости рта патологических сдвигов, связанных с микробиологическими, иммунологическими изменениями [7]. Заболевания пародонта связывают с воспалительными инфекционными болезнями неспецифической природы, основной причиной развития которых является микробная инфекция, но не строго специфические виды, а различные их сочетания. Патологические изменения в пародонте, по мнению некоторых авторов, могут возникнуть не только при резком увеличении количества обычных микроорганизмов, появлении в составе микрофлоры полости рта некоторых пародонтопатогенных микробов, но и при обычном составе микрофлоры в случае резкого снижения местных и общих защитных сил организма [2].

Микробная флора десневого кармана при пародонтите весьма разнообразна и зависит от формы проявления заболевания: преимущественно атрофической, воспалительно-дистрофической с выраженным воспалением и без него [1].

Данные, приведенные Е.В. Боровским и В.К. Леонтьевым, свидетельствуют о том, что воспалительные процессы в полости рта иногда являются эндогенной инфекцией, вызываемой резидентной флорой не только полости рта, но и других экосистем организма. Возникновение аутоинфекции возможно в результате резкого ослабления барьерных функций слизистой оболочки полости рта [1].

По данным F. Legler (1965), постоянное нахождение микроорганизмов в десневых карманах при определенных состояниях организма может вызвать состояние гиперсенсibilизации и изменение его иммунологической реактивности. По мере развития воспалительного заболевания тканей пародонта изменяется состав микрофлоры различных биотопов, входящих в состав полости рта. В начале заболевания наблюдается вытеснение нормальной микрофлоры условно-патогенными бактериями, затем наступает обильное размножение патогенных микробов, в том числе вызывающих гнилостные процессы в пародонте [4].

Помимо вышесказанного, А.И. Грудянов с соавт. утверждают, что воспалительные заболевания тканей пародонта, как правило, сопровождаются дисбиозом полости рта, выраженность которого соответствует степени поражения пародонта. При этом на фоне выраженного роста патогенных и условно-патогенных микроорганизмов концентрация представителей нормальной микрофлоры уменьшается [3].

Микробиологические исследования, связанные с культивированием бактерий микробной бляшки показали, что некоторые грамотрицательные виды микроорганизмов ассоциированы с определенными типами заболеваний пародонта. В настоящее время из пародонтального кармана изолировано около 500 видов бактерий, но только 12 из них связаны с этиологией пародонтита. Эти возбудители (генотипы бактерий) пародонтита

получили название маркерных микроорганизмов. Обнаружение и анализ их на диагностическом приеме являются одним из наиболее сложных инструментов в оценке не только клинического состояния заболеваний пародонта, но и их прогноза [6].

Таким образом, микрофлора полости рта и взаимодействие факторов местной и общей неспецифической и специфической резистентности являются одним из наиболее информативных показателей состояния тканей пародонта [2].

В современной стоматологии есть разные мнения по выбору методов диагностики болезней пародонта, но большинство ученых сходятся на необходимости проведения микробиологических исследований [3].

Вопросы своевременной диагностики заболеваний пародонта особенно важны, так как именно адекватная и как можно более ранняя диагностика является залогом успешного лечения. Проводимые в последние годы исследования опираются на общие концепции патогенеза заболеваний пародонта, в частности гингивита и пародонтита [8].

В настоящее время клиницисты имеют возможность определять структуру пародонтальной микрофлоры. Данный вид исследований стал важным, а подчас непременным условием диагностики, выработки стратегии лечения и оценки его эффективности [2].

Из существующих методов бактериологического исследования ввиду своих преимуществ для характеристики видового состава микрофлоры полости рта при хроническом генерализованном пародонтите (ХГП) чаще других используются культуральный анализ и анализ ДНК присутствующих пародонтопатогенных бактерий [5].

Касаясь вопроса организации диагностического процесса, следует указать на необходимость сравнительного анализа этих диагностических методов — их диагностической ценности, разрешающих возможностей, а также места каждого из них в системе диагностики воспалительных заболеваний пародонта, это и явилось целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Было обследовано 72 человека с хроническим генерализованным пародонтитом. По данным жалоб, анамнеза заболевания, пародонтологического статуса больные были подразделены на 3 группы с легкой (24 человека) (ХГПЛАСТ), средней (36 человек) (ХГРССТ) и тяжелой (12 человек) степени тяжести (ХГПТСТ).

С помощью культурального анализа проводили микробиологическое исследование пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом с целью выявления качественного и количественного состава микрофлоры полости рта.

Материал для бактериологического исследования забирали натошак методом смыва со слизистой оболочки (путем полоскания) 10 мл стерильного физиологического раствора. Полученные смывы после тщательной гомогенизации и последова-

тельных десятикратных разведений исследовали согласно Методическим рекомендациям по бактериологической диагностике дисбактериоза кишечника (МЗ СССР, 1986). При изучении микробиоценоза полости рта применялись соответствующие питательные среды. Исследование проводилось на базе бактериологической лаборатории ОДКБ (зав. лабораторией — к.м.н. Е.Д. Агапова).

Наряду со смывами полости рта, у пациентов исследовали материал из пародонтальных карманов и зубодесневой борозды с целью проведения микробиологической идентификации возбудителей, вызвавших воспалительный процесс пародонта.

Детекцию штаммов пародонтопатогенных бактерий с помощью полимеразной цепной реакции и обратной гибридизации ДНК проводили с использованием мультиплексной ПЦР-тест-системы, разработанной ООО «ДНК-технологии» (Москва). Для исследования проводилось взятие проб путем погружения стерильных бумажных штифтов на 20 секунд с помощью пинцета в исследуемые пародонтальные карманы. Затем бумажные штифты помещали в специальные пробирки (эпиндорфы) и отправляли в микробиологическую лабораторию ЦМД г. Иркутска.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Больные ХГП легкой степени тяжести в возрасте от 32 до 57 лет составили первую группу клинического наблюдения. Результаты исследования микрофлоры полости рта методом культурального анализа показали, что в группе больных с легкой степенью тяжести хронического генерализованного пародонтита чаще всего высевалась палочковидная аэробная и анаэробная флора, относящаяся к второстепенной резидентной флоре. Среди грамотрицательных анаэробных бактерий доминировали бактероиды (*Prevotella oralis*), вейлонеллы и фузобактерии, причем концентрация последних в 1 мл слюны на порядок превышала количественные показатели у здоровых людей. Грамположительная анаэробная флора в результатах анализов была представлена актиномицетами, (при легкой форме хронического генерализованного пародонтита преобладали *Actinomyces viscosus* (КОЕ / 1 мл слюны — 10^7), и бифидобактериями (концентрация бифидобактерий составила 10^4 КОЕ в 1 мл).

Из грамположительной аэробной и факультативной анаэробной флоры наибольшей оказалась группа стрептококков. Помимо резидентных представителей этой группы при ХГП легкой степени тяжести отмечены патогенные стрептококки и энтеробактерии: *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*. При анализе микрофлоры полости рта больных первой группы клинического сравнения выявлено уменьшение количества доминирующих представителей нормофлоры полости рта, замещение кокковой флоры грамотрицательной палочковидной (бактероидами, фузобактериями) (табл. 1).

В 8,05 % случаев у больных ХГП легкой степени методом ПЦР обнаружено присутствие в зубодес-

Таблица 1

Состав микрофлоры полости рта у больных хроническим генерализованным пародонтитом различной степени тяжести

Микрофлора	ХГП легкой степени тяжести	ХГП средней степени тяжести	ХГП тяжелой степени тяжести
<i>Bacteroides coccae</i>	2×10^4	—	—
<i>Bacteroides distosonis</i>	—	2×10^8	—
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3×10^2	3×10^4	5×10^4
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	2×10^4	—	—
<i>Prevotella intermedia</i>	—	—	3×10^4
<i>Prevotella oralis</i>	10^6	—	10^9
<i>Actinobacillus actinomycetecommitans</i>	—	—	10^4
<i>Fusobacterium varium</i>	2×10^8	2×10^8	—
<i>Viellonela parvula</i>	3×10^8	—	10^6
<i>Viellonela spp.</i>	3×10^8	—	—
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	—	2×10^8	—
<i>Actinobacillus naeslundii</i>	—	3×10^8	—
<i>Actinomyces israelliae</i>	10^4	10^6	—
<i>Actinomyces viscosus</i>	10^7	3×10^8	10^2
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^4	10^2	10^2
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	10^2	10^2	—
<i>Lactobacillus spp.</i>	3×10^4	2×10^4	10^5
<i>Lactobacterium fermentum</i>	10^9	—	—
<i>Rothia dentocariosae</i>	—	2×10^4	10^8
<i>Enterococcus faecalis</i>	3×10^4	—	5×10^6
<i>Enterobacter cloacae</i>	10^4	2×10^6	10^8
<i>Streptococcus intermedius</i>	2×10^5	3×10^6	3×10^7
<i>Streptococcus salivarius</i>	2×10^6	10^6	10^5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10^2	3×10^7	10^5
<i>Streptococcus pyogenus</i>	10^2	10^5	10^6
<i>Streptococcus oralis</i>	—	3×10^7	10^5
<i>Streptococcus epidermidis</i>	—	10^4	10^6
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	10^8	—
<i>Staphylococcus hominis</i>	10^5	2×10^4	10^6
<i>H. influenzae</i>	—	—	10^8
<i>Candida albicans</i>	—	10^4	10^8

невой борозде *Bacteroides forsythus*, в 9,4 % — *Treponema denticola* и в 8,33 % случаев — *Porphyromonas gingivalis* (табл. 3).

Вторую группу составили больные ХГП средней степени тяжести в возрасте от 18 до 50 лет. При средней степени тяжести заболевания частота высеваемости грамотрицательной палочковидной резидентной флоры методом культурального анализа оказалась на порядок меньше, чем при ХГП легкой степени тяжести. Однако количество актиномицет в группе ХГП средней степени тяжести резко возросло (концентрация *Actinomyces naeslundii* — 3×10^8 КОЕ в 1 мл). Качественный и количественный состав анаэробной флоры был снижен по сравнению с легкой степенью тяжести

заболевания, грамотрицательные облигатные бактерии выделены не были.

Группа аэробов и факультативных анаэробов при ХГП средней степени тяжести включала роти, лактобациллы, стрептококки и стафилококки. Установлено, что стрептококки и лактобактерии полости рта, число которых было снижено в группах с хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени, являются антагонистами грамотрицательных бактерий, к которым относятся *E. Coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* [9]. Поэтому следует считать закономерным присутствие в результатах анализов больных ХГП *Enterobacter cloacae* в повышающихся титрах. При культуральном анализе микрофлоры полости

рта больных ХГП второй группы клинического сравнения помимо резидентных представителей при ХГП легкой и средней степени тяжести отмечены в незначительном количестве патогенные стрептококки и энтеробактерии: *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*. При средней степени хронического генерализованного пародонтита в результатах анализов присутствовали патогенные грибы рода *Candida* и в незначительных количествах *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Treponema denticola*.

Методом ПЦР-диагностики при средней степени из пародонтальных карманов в 37,5 % случаев выделены *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, в 18,05 % — *Porphyromonas gingivalis*, в 29,16 % — *Treponema denticola*, в 26,38 % — *Bacteroides forsythus* и в 16,7 % случаев — *Prevotella intermedia* (табл. 3).

Для третьей группы пациентов, возраст которых составлял от 34 до 56 лет, при проведении метода культурального анализа был характерен достаточно скудный качественный состав микрофлоры полости рта: практически отсутствовала группа бактероидов, не выявлено актиномицет. Из грамотрицательных анаэробов обнаружены превотеллы и вейлонеллы. Группа стрептококков при ХГПТСТ включала условно-патогенные и патогенные виды. Количественный и видовой состав резидентов (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Vibrio* spp., *Lactobacillus*) значительно снижен.

В результатах анализов больных пародонтитом средней и тяжелой степени при культуральном анализе состава микрофлоры полости рта в концентрации 10^4 и 10^8 КОЕ в 1 мл соответственно, присутствовали грибы *Candida albicans*.

Пептострептококки, пропионобактерии, а также коринебактерии у данной группы больных не обнаружены. Культуральный анализ микрофлоры полости рта больных третьей группы показал, что с увеличением степени тяжести происходит уменьшение количества грамотрицательной флоры, пре-

валируют актиномицеты, спектр микробов полости рта в основном представлен условно-патогенной, патогенной кокковой и пародонтопатогенной флорой.

Методом ПЦР выявлено присутствие в пародонтальных карманах *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (12,5 %), *Porphyromonas gingivalis* (15,2 %), *Bacteroides forsythus* (11,11 %), *Treponema denticola* (9,7 %), *Prevotella intermedia* (12,5 %).

Данные наших исследований также показали, что пародонтопатогенные виды бактерий обнаруживаются в основном при средней и тяжелой степени заболевания (табл. 2, 3), когда происходит значительная деструкция альвеолярной кости [2].

Пародонтопатогенные виды бактерий при использовании метода культурального анализа были высеяны в 36 % случаев, так, при легкой степени тяжести заболевания в 8,3 %, при средней — в 9,7 % и тяжелой — в 17,96 % случаев. По данным Socransky (1979), эти микроорганизмы закономерно обнаруживаются в пародонте в области хронического воспалительно-деструктивного процесса. С их размножением и инвазией в тканевые структуры пародонта, с агрессивными продуктами их жизнедеятельности связывают весь комплекс патологических изменений и реакций. При микроскопическом исследовании эти бактерии обнаруживались не только в соединительнотканной основе десны, но и даже вблизи края альвеолярного гребня, где наблюдались признаки резорбции костного вещества [10].

Actinobacillus actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, играющие, по мнению некоторых исследователей, основную роль в возникновении пародонтопатий, при микробиологическом методе исследования были выделены в 6,9 %, 24,9 % и 4,16 % случаев соответственно (табл. 2).

Таким образом, частота выявления основных пародонтопатогенных видов бактерий методом ПЦР была в несколько раз выше, чем при использовании метода культурального анализа микрофлоры полости рта.

Таблица 2
Частота встречаемости пародонтопатогенных микроорганизмов в результатах анализов больных ХГП различной степени тяжести методом культурального анализа

Степень тяжести ХГП	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
ХГПЛСТ	—	8,3 %	—
ХГПССТ	—	9,7 %	—
ХГПТСТ	6,9 %	6,9 %	4,16 %

Таблица 3
Частота встречаемости пародонтопатогенных микроорганизмов в результатах анализов больных ХГП различной степени тяжести методом ПЦР

Степень тяжести ХГП	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Bacteroides forsythus</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
ХГПЛСТ	—	8,33 %	8,05 %	9,4 %	—
ХГПССТ	37,5 %	18,05 %	26,38 %	29,16 %	16,7 %
ХГПТСТ	12,5 %	15,2 %	11,11 %	9,7 %	12,5 %

При параллельном проведении ПЦР-метода и традиционного бактериологического исследования из 3 основных пародонтопатогенных микроорганизмов (*P. intermedia*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*) совпадение положительных результатов бактериологического метода исследования и ПЦР у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом легкой, средней и тяжелой степени наблюдалось в 63,6 %, 55,0 % и 35,7 % соответственно.

Результаты исследований микрофлоры полости рта методом культурального анализа показали изменение соотношения количества аэробных и анаэробных микроорганизмов, присутствие в полости рта условно-патогенных микробов, наличие признаков дисбиоза, степень выраженности которого увеличивалась со степенью тяжести заболевания.

Кроме этого, с помощью ПЦР-метода удалось выявить маркеры *B. forsythus*, *T. denticola* у 32 (45,54 %) и 34 (48,26 %) пациентов соответственно (табл. 3). При культуральном методе исследования данные пародонтопатогенные виды бактерий не определялись. У значительной части больных выявлялись одновременно маркеры разных видов пародонтопатогенов.

Результаты наших исследований молекулярно-генетического метода и культурального анализа в 66,4 % случаев выявили хронический генерализованный пародонтит, ассоциированный с пародонтопатогенами, включающими пигментообразующие бактероиды *B. forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* и *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, встречающихся при средней и тяжелой степени заболевания. На пародонтит легкой степени тяжести с преобладанием смешанной флоры, представленной патогенными стрептококками и энтеробактериями — *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, приходилось 19,4 % случаев.

На основании вышеизложенного можно предположить, что инициатором заболевания хронического генерализованного пародонтита является условно-патогенная грамположительная кокковая флора, замещающаяся в дальнейшем, при нарастании степени тяжести заболевания, пародонтопатогенными анаэробами. В связи с этим при диагностике ХГП рекомендуется использовать как метод культурального анализа, так и метод молекулярно-генетического исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боровский Е.В., Леонтьев В.К. Биология полости рта. — М. : Медицина, 1991. — 304 с.
2. Григорьян А.С., Грудянов А.И., Рабухина Н.А., Фролова О.А. Болезни пародонта. Патогенез, диагностика, лечение. — М. : МИА, 2004. — С. 64 — 65
3. Грудянов А.И., Григорьян А.С., Фролова О.А. Диагностика в пародонтологии. — М. : МИА, 2004. — 104 с.
4. Грудянов А.И., Дмитриева Н.А., Фоменко Е.В. Применение пробиотиков в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта. — М. : ООО «МИА», 2006. — 112 с.
5. Детьенвиль Р. Лечение пародонтита тяжелой степени. — М. : Азбука стоматолога, 2008. — 120 с.
6. Иорданишвили А.К. Заболевания эндодонта, пародонта и слизистой оболочки полости рта. — М. : МЕДпресс-информ, 2008. — 344 с.
7. Орехова Л.Ю. Заболевания пародонта. — М. : Поли Медиа Пресс, 2004. — 432 с.
8. Фролова О.А. Актуальные задачи развития диагностических методов в клинике пародонтологии // Стоматология. — 2004. — № 4. — С. 22 — 24.
9. Царев В.Н., Ушаков Р.В. Антимикробная терапия в стоматологии — М. : ООО «МИА», 2006. — 144 с.
10. Carranza F.A. Clinical periodontology. — Philadelphia : W.B. Saunders Co, 2002. — P. 1990 — 1012.

Сведения об авторах

Гайдарова Татьяна Андреевна — доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой пропедевтической стоматологии Иркутского государственного медицинского университета (664003, г. Иркутск, ул. Лапина, 4, каб. 116; тел.: 8 (3952) 20-39-31; e-mail: gaidarova-irk@mail.ru)

Попова Надежда Владимировна — ассистент кафедры пропедевтической стоматологии Иркутского государственного медицинского университета (664003, г. Иркутск, ул. Лапина, 4, каб. 311; тел.: 8 (3952) 20-39-30; e-mail: nadine-popova@mail.ru)