

РОЛЬ МИКРОФЛОРЫ В РАЗВИТИИ РЕЦИДИВОВ РАДИКУЛЯРНЫХ КИСТ ЧЕЛЮСТЕЙ

Рачков А.А.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра хирургической стоматологии, г. Минск*

Ключевые слова: пародонтопатогенные микроорганизмы, рецидивы радикулярных кист.

Резюме: проведено клинико-лабораторное исследование пациентов с рецидивами радикулярных кист челюстей, с определением состава микробной флоры в динамике и оценкой генетической резистентности возбудителей к различным группам антибактериальных препаратов.

Resume: a clinical and laboratory study of patients with relapses of radicular cysts of jaws was carried out, with the determination of the composition of microbial flora in dynamics and an assessment of the genetic resistance of pathogens to various groups of antibacterial drugs.

Актуальность. Возникновение и развитие заболеваний тканей периодонта связаны с появлением в области десневой борозды преимущественно грамотрицательных анаэробных бактерий. По данным литературы, в состав пародонтальной инфекции входит патогенная и условно-патогенная флора: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces* spp., *Bacteroides (Tannerella) forsythia*, *Porphyromonas endodontalis* и др [1, 4, 6].

Микроорганизмы, выделенные из зубодесневого кармана, пародонтального кармана, со слизистой оболочки полости рта и языка, из одонтогенных очагов с помощью бактериологического и ПЦР методов, по морфологическим, культуральным, биохимическим, антигенным, вирулентным свойствам можно подразделить на следующие основные группы: пигментообразующие бактероиды, различные грамотрицательные анаэробные бактерии, грамположительные анаэробные бактерии, стабилизирующая резидентная флора, срансбионты, дрожжеподобные грибы рода *Candida*, вирусы.

При оценке роли отдельных видов микроорганизмов в возникновении или развитии заболеваний периодонта следует выделять: пародонтопатогенные виды 1-го порядка; пародонтопатогенные виды 2-го порядка; коинфицирующие агенты (вирусы, хламидии, грибы, простейшие и др.); оппортунистические виды, представители которых встречаются в полости рта постоянно, но количество их резко возрастает при развитии пародонтита и пародонтита.

Данные микроорганизмы являются ключевым фактором и маркером начинающейся деструкции тканей периодонта. Наиболее выраженная корреляция между деструкцией периодонта и наличием определенного вида микроорганизмов отмечена также для грамотрицательных облигатно-анаэробных бактерий группы бактероидов (*Prevotella intermedia*) и извитых форм — *Treponema denticola*. Экзо- и эндотоксины, продуцируемые этими микроорганизмами, вызывают длительное воспаление и разрушение тканей [6].

Инфекционно-воспалительные заболевания челюстно-лицевой области, как правило, имеют полимикробную этиологию, в связи, с чем требуют применения

эмпирической антибактериальной терапии. Препаратом выбора, согласно протоколам лечения, для большинства одонтогенных заболеваний являются β -лактамы антибиотики. В настоящее время наблюдается повышение резистентности бактерий к пенициллинам в частности и к антибиотикам в целом, что может быть одной из причин осложнений лечения, рецидивов и перехода в хроническую форму инфекционно-воспалительных процессов. В связи с этим, одной из актуальных проблем в хирургической стоматологии является лечение пациентов с радикулярными кистами челюстей, а также рецидивов данной патологии, так как осложнения после операции цистэктомии могут достигать более 56% [5, 7].

Цель: определить качественный и количественный состав микробной флоры у пациентов с рецидивами радикулярных кист с оценкой генетической резистентности возбудителей к различным группам антибактериальных препаратов.

Задачи:

1. Установить влияние периодонтопатогенной микрофлоры полости рта на развитие рецидивов радикулярных кист челюстей;
2. Установить зависимость между наличием генетической резистентности возбудителей к различным группам антибактериальных препаратов и развитием рецидивов радикулярных кист челюстей.

Материалы и методы исследования. Под наблюдением находилось 40 пациентов (22 мужчины, 18 женщин) с рецидивами радикулярных кист челюстей, которым проводилась повторная операция цистэктомия. Средний возраст пациентов составил: у мужчин — 37,5 года, женщин — 35,4 года. С целью получения данных о составе микробной флоры в зоне костного дефекта на момент операции и в послеоперационном периоде были проведены дополнительные молекулярно-биологические исследования.

В день проведения цистэктомии проводилось взятие содержимого полости кисты. Для этого использовали одноразовую иглу диаметром 0,7-1,25 мм и одноразовый шприц объемом 2 мл. Игла погружалась в полость костного дефекта и проводилась аспирация содержимого, после чего полученный биологический материал помещался в эппендорф с транспортной средой для дальнейшего проведения ПЦР-исследований.

Повторное взятие содержимого полости кисты проводился на 3 сутки. Для этого использовалась одноразовая пункционная игла с мандреном, диаметром 0,7-1,25 мм, которую соединяли с одноразовым шприцем объемом 2 мл. Наличие в игле мандрена позволяло избежать попадания в образец клеток эпителия и микроорганизмов с поверхностных слоев раны, слизистых оболочек, швов. Алгоритм получения биологического материала включал: очищение области раны от налета из шприца 0,9% физиологическим раствором, проведение аппликационной анестезии поверхности раны 10% раствором лидокаина гидрохлорида. Затем введение пункционной иглы в проекции послеоперационного костного дефекта на всю глубину полости, извлечение мандрена, присоединение к игле шприца с опущенным поршнем и аспирации содержимого раны. Полученный биологический материал помещался в пробирку с транспортной средой с последующей лабораторной диагностикой.

Для получения данных о качественном и количественном составе микробной флоры в динамике использовался молекулярно-генетический метод – полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени. Метод основан на многократном избирательном копировании определенного участка нуклеиновой кислоты (ДНК) микроорганизма при помощи ферментов в специальном приборе – амплификаторе. В нашем исследовании ПЦР позволяет обнаружить в биологическом материале в числе прочего некультивируемую анаэробную микрофлору, а также выявить у микроорганизмов генетические детерминанты лекарственной устойчивости. Исследование проводилось в научно-исследовательской лаборатории БелМАПО. Выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов для выделения ДНК из биологического материала «ДНК-СОРБЕНТ» (НПФ «Литех», РФ) согласно инструкции производителя. Выявление и количественное определение концентраций ДНК периодонтопатогенных микроорганизмов проводили методом ПЦР в режиме реального времени с использованием тест-системы для количественного анализа «Дентоскрин» (ООО НПФ «Литех», РФ) в соответствии с инструкцией производителя. Исследования выполняли с использованием амплификатора Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Лабораторные исследования по выявлению периодонтопатогенных и условно-патогенных микроорганизмов и их генетической резистентности к антибактериальным препаратам проводились в соответствии с инструкциями по применению, утвержденными Министерством здравоохранения Республики Беларусь от 27.04.2018 [2, 3].

Определение ДНК пародонтопатогенной и условно-патогенной микрофлоры проводилось в отношении следующих 19 микроорганизмов: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Bacteroides (Tannerella) forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, семейства *Enterobacteriaceae*, рода *Staphylococcus* spp., рода *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* spp. / *Klebsiella* spp., *Streptococcus* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Enterococcus faecalis* / *E. Faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*.

Результаты исследования и их обсуждение. По результатам проводимого молекулярно-биологического исследования выявлена анаэробная микрофлора полости рта, которая включала две основных группы периодонтопатогенных и стабилизирующих микроорганизмов.

В день операции, периодонтопатогенные микроорганизмы. ДНК *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* и *Treponema denticola* определялась у всех исследуемых (100% пациентов, n=40). ДНК *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* и *Prevotella intermedia* определялась у 75% (n=30) пациентов.

На 3 сутки после операции, периодонтопатогенные микроорганизмы. Численное присутствие ДНК *Tannerella forsythia* и *Fusobacterium nucleatum* оставалось без изменений и на 3-и сутки после операции определялось также в 100% случаев у всех исследуемых (n=40). Увеличилось количество пациентов-носителей *Porphyromonas endodontalis* до 100% (n=40) (возбудитель был впервые обнаружен в 25% случаев (n=10)). Сократилось количество случаев выявления *Porphyromonas*

gingivalis и Prevotella intermedia до 50% (определялись у n=20), на 50% уменьшилось выявление ДНК Treponema denticola (n=20).

В день операции, стабилизирующие микроорганизмы. ДНК Enterobacteriaceae, Staphylococcus spp., Staphylococcus aureus и Enterococcus faecalis / E. Faecium была обнаружена у 50% пациентов (n=20); ДНК Streptococcus spp., Enterobacter spp. / Klebsiella spp., Proteus spp. и Pseudomonas aeruginosae – 25% (n=10).

На 3 сутки после операции, стабилизирующие микроорганизмы. Количество случаев выявления ДНК Enterobacteriaceae, Enterobacter spp. / Klebsiella spp. и Enterococcus faecalis / E. Faecium составило 100% (n=40). Следующие виды, которые не были определены в образцах, взятых на момент операции, были обнаружены в фокусе воспаления: Streptococcus spp. (75%, n=30), Enterobacter spp. / Klebsiella spp. и Pseudomonas aeruginosae - (25% n=10). Кроме того, в исследуемых образцах в 100% (n=40) отсутствовала ДНК Staphylococcus spp., Staphylococcus aureus, Proteus spp.

ДНК Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Escherichia coli, Serratia spp. и Helicobacter pylori не определялась ни в одной пробе.

Для уточнения этиологической роли определенных микроорганизмов нами были проведены дополнительные количественные исследования. Концентрации микроорганизмов из группы периодонтопатогенных и стабилизирующих возбудителей на момент операции и на 3 сутки представлены в таблице 1.

Табл. 1. Количественный состав микроорганизмов разных групп в области костной раны челюстей после цистэктомии в динамике

Группы микроорганизмов	Период наблюдений	
	До операции	3-и сутки после операции
Периодонтопатогенные возбудители		
Porphyromonas gingivalis	10 ³ и более ГЭ/мл	10 ³ и менее ГЭ/мл (↓)
Porphyromonas endodontalis	10 ⁵ ГЭ/мл	10 ³ и более ГЭ/мл (↓)
Tannerella forsythia	10 ³ ГЭ/мл	10 ⁴ и более ГЭ/мл (↑)
Prevotella intermedia	10 ⁴ и более ГЭ/мл	10 ² и более ГЭ/мл (↓)
Fusobacterium nucleatum	10 ⁵ и более ГЭ/мл	10 ⁵ и более ГЭ/мл
Treponema denticola	10 ³ и более ГЭ/мл	10 ² ГЭ/мл (↓)
Стабилизирующие возбудители		
Enterobacteriaceae	10 ² ГЭ/мл	10 ² и менее ГЭ/мл (↓)
Staphylococcus spp.	10 ² ГЭ/мл	не определен (↓)
Streptococcus spp.	10 ² и менее ГЭ/мл	10 ² и менее ГЭ/мл

Следует отметить, что возможности ПЦР диагностики ограничены аналитической чувствительностью методики, которая способна определить фрагменты ДНК периодонтопатогенных микроорганизмов при их концентрации в биологической пробе от 10³ копий/мл и выше.

Таким образом, проведенное молекулярно-биологическое исследование позволило нам определить состав микробной флоры при диагностически значимых концентрациях данных микроорганизмов 10³ и выше геномных эквивалентов/мл. Стабилизирующие микроорганизмы, которые присутствуют в составе ассоциации в более низких концентрациях, не являются доминантными и не имеют

диагностически значимого значения для данной патологии. Тогда как периодонтопатогенные микроорганизмы, присутствующие в составе ассоциации в концентрации 10^3 и более являются доминантными. И преимущественно ими определяется биологическая роль в развитии рецидивов радикулярных кист.

Результаты ПЦР-исследований на наличие генетической резистентности возбудителей показал следующее: во всех пробах (100%, $n=40$) определялась генетическая устойчивость микроорганизмов к β -лактамам и тетрациклинам; в 50% ($n=20$) образцов была выявлена генетическая резистентность к макролидам и фторхинолонам; генетическая резистентность к метронидазолу не была определена ни в одной пробе ($n=0$).

Выводы: основную этиологическую роль в развитии рецидивов радикулярных кист челюстей играют периодонтопатогенные микроорганизмы. Высокие концентрации этих возбудителей говорят о том, что в составе ассоциации они являются доминантными. Стабилизирующие микроорганизмы, концентрации которых не превышают 10^2 ГЭ/мл, являются сопутствующими (рецессивные в составе ассоциации).

Наличие генетической антибиотикорезистентности микроорганизмов к β -лактамам и тетрациклинам у пациентов-носителей, включенных в исследование, может быть связано с неоднократной консервативной терапией в анамнезе.

Литература

1. Волошина А. А. Значение микробного фактора в развитии и течении воспалительных заболеваний пародонта // Молодой ученый. – 2011. - №1. – С. 248-251.
2. Инструкция по применению: «Метод выявления гонов, отвечающих за резистентность к антибактериальным лекарственным средствам» № 035-0418 утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 27.04.18. – Минск.
3. Инструкция по применению: «Метод выявления присутствия периодонтопатогенных микроорганизмов» № 036-0418 утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 27.04.18. – Минск.
4. Костюк С.А. Молекулярно-биологические методы в медицине: монография / С.А. Костюк ; Бел. мед. акад. последиплом. образования. – Минск:БелМАПО,2013.-326.
5. Марусов И.В. Рациональная антибактериальная терапия гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой локализации / И.В.Марусов [и др.] учеб.- метод. пособие для студ. стом. факульт. – СПб: Человек, 2019. – 152 с.
6. Царев В.Н. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта : учеб. / [Царев В. Н. и др.] ; под ред. В. Н. Царева. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. - 576 с.: ил.
7. Шевела Т.Л. Видовой состав микробной флоры в операционной зоне костной ткани челюстей [Текст] / Т. Л. Шевела [и др.] // Вестник фонда фундаментальных исследований. – 2018. – №1. – С. 75-79.