

ПЦР диагностика в практике стоматолога

Качественные и количественные пцр тест-системы «Дентоскрин»



научно-производственная фирма
Литех 

Быстрый старт определения пародонтопатогенов в Вашей лаборатории

По данным Всемирной Организации Здравоохранения воспалительными заболеваниями пародонта в разных возрастных группах страдают от 80 до 100% взрослого населения [1]. Болезни пародонта наряду с кариесом зубов и его осложнениями являются самыми распространенными стоматологическими заболеваниями у населения России [2]. В настоящее время установлено, что у пациентов старше 40 лет причиной потери зубов в большей степени являются заболевания пародонта, чем кариес.

Этиология заболеваний пародонта

Одной из главных причин развития заболеваний пародонта являются специфические бактериальные агенты. Дополнительными факторами риска являются генетическая предрасположенность иммунной системы, плохая гигиена полости рта, курение, системные заболевания и стресс (рис. 1).

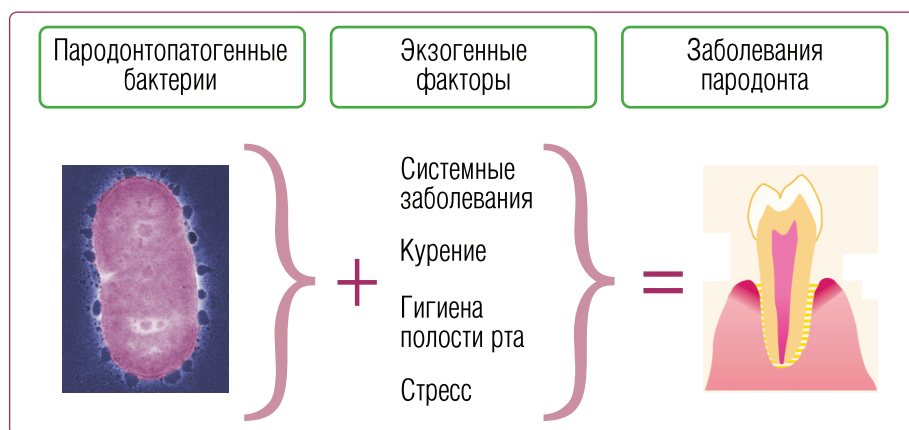


Рисунок 1. Причины развития заболеваний пародонта.

Микробный фактор, являясь одним из самых мощных этиологических агентов, обуславливает различные клинические проявления заболеваний пародонта. При этом существенное значение в их патогенезе имеют состав и видовая специфичность микроорганизмов в зубном налете, его объем, длительность пребывания в участках десны и тканях пародонта [3,4]. Данными факторами большинство исследователей объясняют развитие воспалительных изменений в пародонте с различными клиническими проявлениями.

Инфекционная природа заболеваний пародонта.

Заболевания пародонта представляют собой разнородную группу инфекционных заболеваний тканей пародонта, имеющих различных специфических возбудителей, которыми являются неклостридиальные анаэробные бактерии. Согласно классификации ВОЗ они объединены в группу так называемых пародонтопатогенных бактерий (ПБ) [2]. В настоящее время установлено, что именно группа патогенных микроорганизмов является основной причиной прогрессирующих заболеваний пародонта. Это приводит к необходимости использования специфических методов диагностики и терапии выявленных бактерий в случаях хронически–прогрессирующих, резистентных и агрессивных заболеваний пародонта. Только механическая обработка, как правило, оказывается неэффективной, особенно когда ПБ присутствуют в тканях ротовой полости, в этом случае должна быть использована антибактериальная терапия. Необходимым условием для выбора подходящего антибактериального агента являются знания о спектре и концентрации присутствующих микроорганизмов.

Биологические маркеры заболеваний пародонта

Многочисленные исследования показывают, что лишь немногие из более чем пятисот микроорганизмов, присутствующих в ротовой полости, имеют высокий патогенный потенциал и могут стать причиной развития заболевания (рис. 2). Заболевания пародонта чаще носят полимикробный характер [3,4]. Возбудители заболеваний пародонта относятся к группе облигатно–анаэробных видов бактерий.

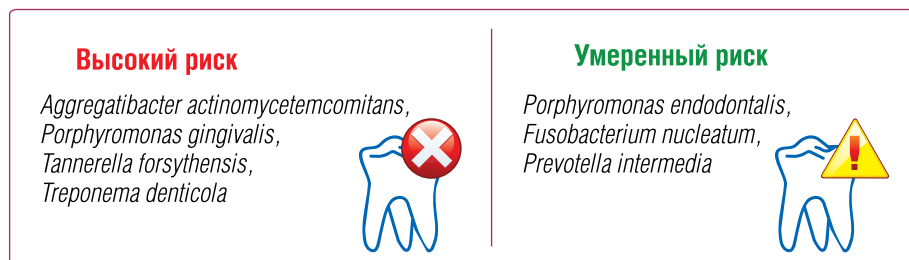


Рисунок 2. Список пародонтопатогенов

Основное патогенное действие данных микроорганизмов заключается в способности продуцировать различные метаболиты, которые вместе с факторами вирулентности приводят либо к прямому разрушению окружающих тканей пародонта, либо к инактивации иммунного ответа организма. В частности, постоянное присутствие в десневом кармане таких высокопатогенных видов как *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *A. actinomycetemcomitans* и *T.denticola*, могут приводить к потере зуба [5].

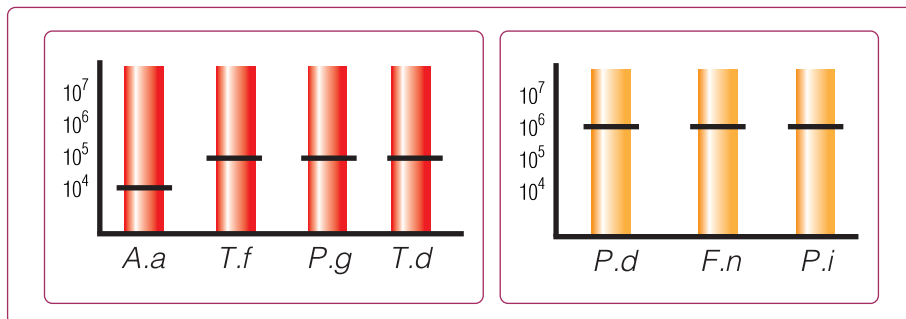


Рисунок 3. Пороговые линии «патогенности» микроорганизмов. Клинически значимая концентрация, выше которой повышается риск развития заболеваний пародонта.

Кроме вышеперечисленных видов, в развитии деструкции тканей пародонта принимают участие и другие резидентные виды, которые также могут иметь патогенный потенциал в зависимости от концентрации (рис. 3), в которой они находятся. Обсуждается их роль как первичных этиологических агентов пародонтита [4].

Диагностика возбудителей заболеваний пародонта методом ПЦР

Молекулярно–генетические тесты являются одним из методов, которые выбирают врачи для диагностики заболеваний пародонта.

Метод ПЦР является проверенным стандартом обнаружения различных микроорганизмов. Простота забора проб, легкость их транспортировки вместе со скоростью ПЦР–анализа позволяет проводить исследования в кратчайшие сроки.

Первым этапом является выделение бактериальной ДНК (рис 4). Далее она переносится в «рабочую» смесь, где идет процесс амплификации, который основан на многократном увеличении числа копий фрагмента нуклеиновых кислот (ДНК/РНК). Это позволяет обнаружить специфичный участок генома возбудителя и оценить концентрацию присутствующего микроорганизма.

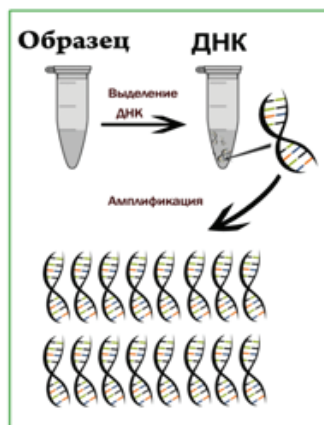


Рисунок 4.

Присутствие в пробе представителей сопутствующей флоры не влияют на результаты ПЦР–анализа. Высокая специфичность ПЦР позволяет выявлять только конкретные микроорганизмы. Таким образом, получить ложноположительные или ложноотрицательные результаты практически невозможно.

Инструкция по забору материала и выделению ДНК

Выбор анализируемого материала для исследования определяется наиболее вероятным местом локализации возбудителя. Решение о выборе материала для исследования принимается врачом на основании совокупности жалоб пациента и клинических проявлений инфекции.

Взятие, доставка и хранение материала

Взятие биологического материала, по возможности, должно проводиться в период обострения инфекции. Перед взятием материала не рекомендуется полоскать полость рта лекарственными средствами и чистить зубы.

Материал	Взятие образца для анализа
Содержимое пародонтального кармана	Стерильные бумажные клинья для просушивания каналов (эндодонтические штифты) № 20 — 40 поместить в карманы на 10-20 секунд. Вынуть клинья и поместить в пробирку с «ДНК-ЭКСПРЕСС»*
Зубной налет	Снять зубной налет стерильным универсальным зондом типа А*. Кончик зонда с забранным материалом поместить в пробирку с «ДНК-ЭКСПРЕСС»*, сделать 5-10 вращательных движений зондом, затем зонд удалить и закрыть пробирку.
Десневая жидкость	Отобрать стерильными бумажными полосками размером 0,3—0,8 мм или бумажными клиньями № 20 — 40. Поместить в пробирку с «ДНК-ЭКСПРЕСС»*.

Образцы помещаются непосредственно в пробирки с реагентом «ДНК-ЭКСПРЕСС» и не требуют предварительной обработки.

Доставка проб в лабораторию должна проводиться в термосе со льдом или в термоконтейнере в течение 12 часов.

Процесс выделения ДНК занимает в среднем около 20 минут и состоит всего из трех этапов:

- Перемешивание пробирки с реагентом ДНК-ЭКСПРЕСС, содержащей анализируемый материал (10 секунд).
- Прогревание пробирки в твердотельном термостате (98⁰С, 20 мин).
- Отделение супернатанта, содержащего ДНК, с помощью центрифугирования (8000–14000 об/мин, 20–30 секунд).

Информация о панели «Дентоскрин»

Наборы панели «Дентоскрин» позволяют выявить семь наиболее важных микроорганизмов, ассоциированных с развитием различных заболеваний пародонта (рис. 2).

Разработаны два варианта тестов:

- 1) Качественный вариант теста позволяет установить наличие патогена и его локализацию в клинически значимом титре.
- 2) Количественный вариант теста позволяет оценить концентрацию исследуемого пародонтопатогена (рис. 5).

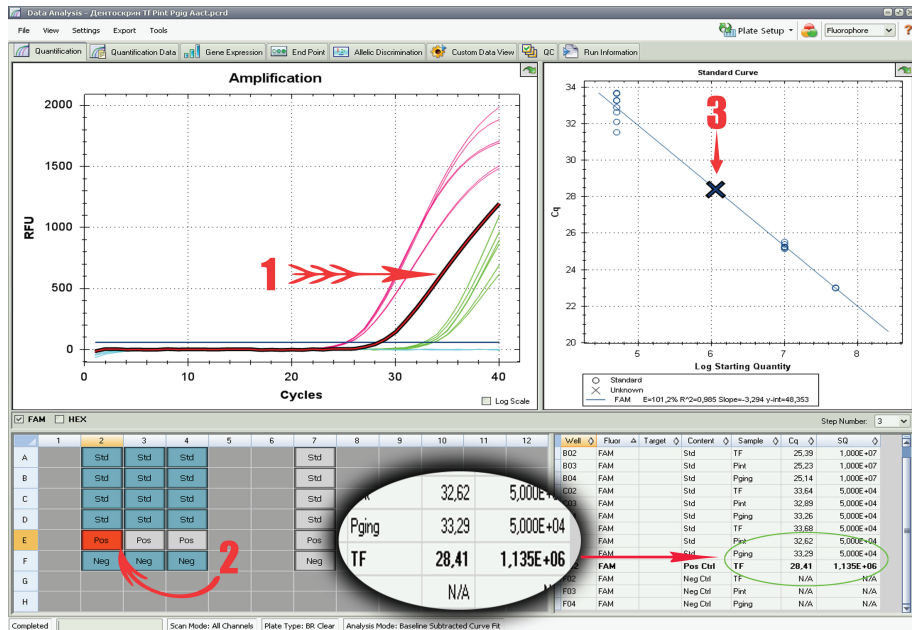


Рисунок 5. Вид результатов количественного теста «Дентоскрин» в программе CFX-Manager (Bio-Rad), 1 – вид кривых накопления; 2 – окно выбора образцов; 3 – значение концентрации образца на калибровочной кривой.

Интерпретация результатов

Все выявляемые панелью «Дентоскрин» микроорганизмы имеют различный патогенный потенциал. Положительным результатом анализа является случай, когда концентрация искомого пародонтопатогена выше значения клинически значимого титра. Врачу необходимо оценить совокупный патогенный потенциал микрофлоры в зависимости от вида микроорганизма и его концентрации согласно данным, представленным в таблице ниже. Идентификация микроорганизмов и их концентрация позволяет не только подобрать схему лечения, но и проводить его контроль.

Набор «Дентоскрин» позволяет осуществить профилактику осложнений дентальной имплантации. Рекомендуется использовать ПЦР–диагностику микробиоценоза полости рта до и после предимплантационного лечения воспалительных заболеваний пародонта.

Патоген	Порог	Клиническое значение
A.a <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	10^4	Высокий риск развития заболевания. Возможно поражение тканей кости, патогенен при относительно низкой концентрации. Ассоциирован с агрессивными формами гингивита и пародонтита.
P.g <i>Porphyromonas gingivalis</i>	10^5	Высокий риск развития заболевания. Продуцирует протеазы, адгезины, эндотоксины и цитотоксины, повреждающие целостность десневых и костных тканей. Вместе с <i>A.a</i> являются главными маркерами заболевания.
T.f <i>Tannerella forsythensis</i>	10^5	Высокий риск развития заболеваний пародонта. Продуцирование нескольких факторов вирулентности (протеазы и липополисахариды) может привести к ингибированию иммунного ответа и переходу заболевания в хроническую форму.
T.d <i>Treponema denticola</i>	10^5	Высокий риск развития заболевания. Принимает участие в образовании «каркаса» биопленки, способствуя адгезии более патогенных бактерий. При высоких концентрациях проявляет патогенные свойства
P.e <i>Porphyromonas endodontalis</i>	10^6	Умеренный риск развития заболевания. Выделяет активные ферменты и метаболиты способен ингибировать фагоцитоз, нарушая работу местного иммунитета.
F.n <i>Fusobacterium nucleatum</i>	10^6	Умеренный риск развития заболевания. Способствует адгезии других патогенов. Наиболее часто выявляется в начале быстро прогрессирующего заболевания.
P.i <i>Prevotella intermedia</i>	10^6	Умеренный риск развития заболевания. Наиболее характерен при остром течении заболеваний пародонта, особенно гингивита.

Для более значимой оценки риска заболеваний пародонта необходимо учитывать дополнительные факторы риска, которые в совокупности с патогенными микроорганизмами могут значительно увеличить риск заболеваний пародонта:

Клинические	Диагностические	Медицинские
<input type="checkbox"/> Кровоточивость	<input type="checkbox"/> Локализованный	<input type="checkbox"/> Наследственность
<input type="checkbox"/> Воспаление/опухание	<input checked="" type="checkbox"/> Генерализованный	<input type="checkbox"/> Иммунодефицит
<input checked="" type="checkbox"/> Покраснение/обесцвечивание		<input type="checkbox"/> Диабет
<input type="checkbox"/> Запах изо рта		<input checked="" type="checkbox"/> Сердечно-сосудистые заболевания
<input type="checkbox"/> Разрушение кости		<input type="checkbox"/> Курение

Рисунок 6. Пример выбора различных факторов риска у пациента

Исследование пародонтопатогенных микроорганизмов методом ПЦР позволяет оценить состояние пациента в различных суббиотопах ротовой полости. Результаты анализа могут быть использованы, как при контроле терапии воспалительного заболевания, так и при имплантации.

Литература:

1. Безрукова А.П. Пародонтология. М.: ЗАО «Стоматологический научный центр». – 1999. – 336
2. Барер Г.М . 2008 ч 2 Барер, Г.М. Терапевтическая стоматология. Часть 2. Болезни пародонта / Г.М. Барер. М.: Геотар–Медиа, 2008. – 236 с.
3. Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol* 2003; 32: 24–35.
4. Nonnenmacher C., Dalpke A., Mutters R., Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR // *Journal of Microbiological Methods*. 2004 № 59. P. 117–125.
5. Lee H.J., Kim J.K., Cho J.Y., Lee J.M., Hong S.H. Quantification of subgingival bacterial pathogens at different stages of periodontal diseases // *Curr Microbiol*. 2012 № 65 (1). P. 22–7.

