

# Методика визначення пародонтопатогенів навколо оксид-цирконієвих і титанових абатментів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу

Real-time PCR as a Method of Periodontal Pathogens Detection Around Zirconia and Titanium Abutments

Готь С.-Р.Р.<sup>1,2</sup>, асп., Бондарчук О.Л.<sup>3</sup>, лікар-бактеріолог вищої категорії, Угрин М.М.<sup>1,2</sup>, доц.

<sup>1</sup>Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

<sup>2</sup>Центр стоматологічної імплантації та протезування «ММ», Львів

<sup>3</sup>ПЛР-лабораторія Київської міської клінічної лікарні №4

Got S.-R.R.<sup>1,2</sup>, Bondarchuk O.L.<sup>3</sup>, Ugryn M.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Danylo Halytskyi Lviv National Medical University

<sup>2</sup>MM Dental Implants and Prosthetics Center

<sup>3</sup>PCR Laboratory of Kyiv City Clinical Hospital №4

Адреса для кореспонденції:

Готь Софія-Роксолана Ростиславівна

e-mail: sofiyagot@gmail.com

**Мета:** Провести аналіз методики вивчення особливостей мікрофлори пародонтальних кишень та періімплантних ділянок навколо оксид-цирконієвих та титанових абатментів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу. **Методи:** У дослідженні брали участь пацієнти, яким встановлювали імплантати у Центрі стоматологічної імплантації та протезування «ММ». Усім пацієнтам проводили полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) у три етапи. Біоматеріал забирали паперовим піном з пародонтальної кишені та періімплантної борозни навколо оксид-цирконієвих і титанових абатментів. Після 10 с пін виймали та поміщали у пластикову пробірку об'ємом 1,5 мл типу «Еппендорф», герметично закривали і передавали у лабораторію. **Результати:** Облік результатів реакції здійснювався автоматично за допомогою програмного забезпечення. Інтерпретація результатів проведена згідно з таблицею. Якщо значення КВМ менше ніж 2,5 (інтерпретують як недостатню кількість матеріалу), то матеріал забирають повторно та повністю проводять весь цикл ПЛР-аналізу. **Висновки:** Встановлення особливостей мікрофлори пародонтальних та періімплантних кишень може стати основою нових підходів для успішного планування лікування у пацієнтів, яким проводять дентальну імплантацію, та надалі при виборі оптимального матеріалу для опорних структур імплантатів.

**Ключові слова:** мікрофлора, пародонтальні кишені, полімеразна ланцюгова реакція, абатменти.

**Purpose:** To analyze the method of periodontal pathogens detection using real-time PCR around the zirconium oxide and titanium abutments. **Methods:** The study includes patients who undergo implantation in MM Dental Implants and Prosthetics Center. PCR is done in three stages for every patient. The biomaterial is taken with a paper pin from the periodontal pocket and periimplant site around the zirconia and titanium abutments. After 10 seconds the paper pin is extracted, placed in a plastic tube and sent to the laboratory. **Results:** The results of PCR are recorded automatically using the software. Interpretation of the results is carried out according to the table. If the value of CFM is less than 2.5 (interpreted as insufficient amount of material), the biomaterial is re-collected and the entire cycle of the PCR analysis is carried out again. **Conclusions:** Periodontal pathogens detection in the sites of periodontal and periimplant pockets may be a new approach for the successful treatment planning in patients who undergo dental implantation and for the subsequent selection of the right abutment material.

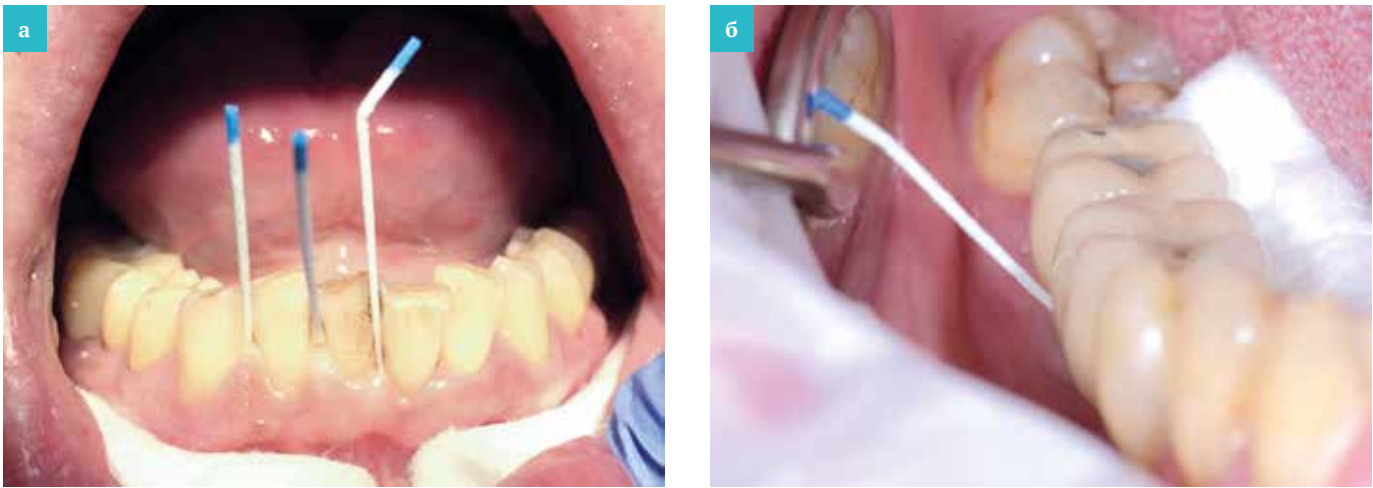
**Key words:** pathogens, periodontal pocket, PCR, abutments.

## ВСТУП

Між зубами та дентальними імплантатами є суттєві гістологічні та структурні відмінності [10]. Однак, їхня клінічна схожість дозволяє застосовувати загальноприйняті наукові судження

пародонтології і при імплантологічній реабілітації. В обох випадках (навколо зуба чи імплантату) наявне запалення в межах м'яких тканин на ранніх стадіях, а потім настає втрата кісткової тканини і збільшення глибини пародонтальної кишені. Періімплантні

захворювання поділяють на періімплантний мукозит та періімплантит [13]. Періімплантний мукозит – це запальне ураження м'яких тканин навколо імплантату, а періімплантит охоплює ще й оточуючу кісткову тканину [9]. Незважаючи на цю клінічну схожість



Мал. 1. Паперовий пін у пародонтальній кишені (а) та періімплантній борозні (б) для забору біоматеріалу

періімплантних та пародонтальних захворювань, на сьогодні немає прогнозованого лікування періімплантиту, тому визначальна роль надається саме первинній профілактиці [5]. М.М. Угрин і співавт. розробили заходи професійної гігієни для пацієнтів, залежно від термінів імплантації [8]. На думку авторів, тільки при ретельній індивідуальній і професійній гігієні можна розраховувати на успіх довготривалого функціонування ортопедичної конструкції на імплантатах [5–8]. Незважаючи на те, що захворювання пародонта є мультифакторним розладом, доведено, що наявність великої кількості пародонтопатогенів підвищує ризик виникнення пародонтального статусу, особливо при скомпроментованій імунній відповіді [11]. Доведено, що бактерії, які беруть участь у виникненні пародонтиту, можуть мігрувати та колонізувати періімплантні ділянки [12, 13, 17]. Quiñen і співавт. [14, 15] аналізували мікрофлору навколо трансмукозальних абатментів у субкрестально встановлених імплантатах. Автори продемонстрували більшу частоту наявності пародонтопатогенів навколо абатментів, якщо суміжними були зуби із такою самою бактеріальною картиною. Tanakashi та співавт. [18] досліджували зразки

двох пародонтопатогенів, взятих від зубів та імплантатів у одних і тих самих суб'єктів. Результати показали, що зразки *P. gingivalis* збігалися на 75%, *P. intermedia* – на 100%. Це наочно демонструє трансмісію бактерій від зубів до імплантатів [12, 15, 18].

Основними патогенами при пародонтиті та мікроорганізмами, які були ідентифіковані навколо імплантатів при періімплантних захворюваннях, є *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola* [16]. Мікробний склад пародонтальної та періімплантної ділянок вивчали з використанням різних методів ідентифікації бактерій. Автори найчастіше обирали полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) [1–4]. Використання ПЛР у режимі реального часу дозволяє провести аналіз складу мікрофлори та виявити ДНК мікроорганізмів у складі суміші нуклеїнових кислот [1].

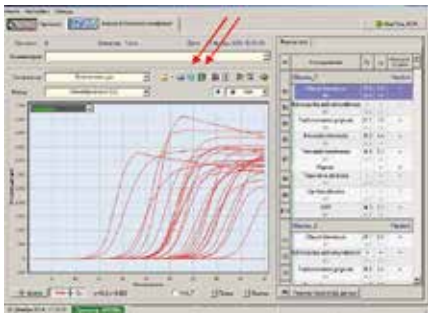
Мета роботи – провести аналіз методики вивчення особливостей мікрофлори пародонтальних кишень та періімплантних ділянок навколо оксид-цирконієвих та титанових абатментів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу.



Мал. 2. Паперовий пін у пластиковій пробірці «Еппендорф»

## МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

У дослідженні взяли участь пацієнти, яким проводили імплантацію у Центрі стоматологічної імплантації та протезування «ММ». Пацієнтів відбирали за такими критеріями: вторинна часткова адентія та відсутність приймання антибіотиків протягом останніх 6 місяців. Усім пацієнтам проводили ПЛР у три етапи, використовуючи тестову систему «ПародонтоСкрин» (реєстраційне посвідчення № 12407/2013 від 15.02.2013). ПЛР у реальному часі проводили у ПЛР-лабораторії Київської міської клінічної лікарні №4.



Мал. 3. Програмне забезпечення для обліку та інтерпретація результатів ПЛР у р.ч.

#### Етапи забору біоматеріалу:

Етап №1 – визначення гігієнічного індексу О'Лірі, проводили PSR тест та полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (ПЛР у р. ч.) навколо зубів. Етап №2 – (після встановлення опорних структур імплантатів): проводили полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (ПЛР у р. ч.) навколо титанового та оксид-цирконієвого абатмента.

Етап №3 – ПЛР у р.ч. проводили навколо титанового та оксид-цирконієвого абатмента через 1 місяць після їхнього встановлення.

Забирали біоматеріал паперовими пінами № 25-30, оскільки вони товщі і не так часто згинаються при введенні. Для забору матеріалу пін вводили в пародонтальну або періімплантну кишеню (ПК) на 10 с (мал. 1 а, б). Пін вводили під невеликим кутом до зуба і повільно просували вздовж осі зуба до опору. Дуже важливо виключити можливість доторкання до слизової

оболонки порожнини рота. Після 10 с пін виймали з ПК та поміщали в пластикову пробірку об'ємом 1,5 мл типу «Еппендорф», герметично закривали і передавали у лабораторію (мал. 2). Транспортне середовище не використовували. На сьогодні відомо, що ДНК стійкіша при транспортуванні і зберіганні, на відміну від РНК, і це не зобов'язує використовувати транспортне середовище. Крім того, при розподілі матеріалу одразу у пробірці типу «Еппендорф» виключається перехресна контамінація матеріалу і полегшується подальша обробка проб. Кожну пробірку маркують відповідним чином і супроводжують скеруванням із зазначенням необхідних даних.

На етапі попередньої обробки в кожену марковану пробірку з паперовим піном вносили по 100 мкл стерильного 0,9% розчину натрію хлориду (фізіологічний розчин) з використанням стерильних одноразових накопичувачів з фільтром, рекомендованих до застосування в ПЛР-лабораторіях. Пробірки залишали на 20 хв при кімнатній температурі для екстракції мікробної маси у розчин. Після закінчення екстракції пробірки центрифугували на вортексі при 1000 об./хв протягом 30 секунд для осадження крапель. Після цього паперовий пін виймали з пробірки стерильним пінцетом, ретельно витискаючи до стінки надлишок рідини та утилізували в

емність з дезрозчином. У пробірки з екстрактом вносили лізуючий розчин і виділяли нуклеїнові кислоти відповідно до інструкції зі застосування комплекту реагентів «Проба-НК». На всіх етапах постановки ПЛР-реакції використовували стерильні одноразові наконечники з фільтром, рекомендовані до застосування в ПЛР-лабораторіях. Отримані препарати нуклеїнових кислот передавали через передавальне вікно в ампліфікаційну для проведення ампліфікації згідно з інструкцією для набору реагентів для виявлення умовно-патогенних мікроорганізмів порожнини рота методом ПЛР у р.ч.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Облік та інтерпретація результатів реакції здійснюється автоматично за допомогою програмного забезпечення (мал. 3). Після проходження ампліфікації програмне забезпечення порівнює задане оператором розташування пробірок з реальним станом маркера Rox і, якщо знаходять розбіжність, пропонується програмно змінити результат аналізу, розмістивши дані з кожної окремої пробірки у відповідному порядку. У разі, якщо оператор дає згоду на цю операцію, скоректовані дані можна зберегти в новому файлі. При наявності в досліджуваному зразку ДНК мікроорганізмів, вони виявляються набором «ПародонтоСкрин». У рядку з назвою цього мікроорганізму вказана кількість мікроорганізму (десятковий логарифм концентрації). Інтерпретація результатів проводиться згідно з таблицею (табл.). Якщо значення КВМ менше ніж 2,5 (інтерпретують як недостатню кількість матеріалу), то матеріал забирають повторно та повністю проводять весь цикл ПЛР-аналізу.

Таблиця. Кількість мікроорганізмів у біотопі пародонтальної кишені (Lg GE/зразок)

| Назва мікроорганізму                                               | Норма | Ступінь пародонтиту |        |
|--------------------------------------------------------------------|-------|---------------------|--------|
|                                                                    |       | легкий/середній     | важкий |
| Загальна бактеріальна маса                                         | <6,5  | ≥6,5                | >7,5   |
| <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>                        | <4,0  | ≥4,0                | >5,0   |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i>                                    | <5,0  | ≥5,0                | >6,0   |
| <i>Prevotella intermedia</i>                                       | <4,5  | ≥4,5                | >6,0   |
| <i>Tannerella forsythensis</i><br>( <i>Bacteroides forsythus</i> ) | <5,0  | ≥5,0                | >5,5   |
| <i>Treponema denticola</i>                                         | <3,5  | ≥3,5                | >5,0   |
| <i>Candida albicans</i>                                            | <4,5  | ≥4,5                | >6,0   |

## ВИСНОВКИ

ПЛР у реальному часі дозволяє точно встановити наявність конкретного виду патогена з урахуванням праймерів,

закладених у діагностичний набір. Встановлення особливостей мікрофлори пародонтальних та періімплантальних кишень може стати основою нових підходів для успішного пла-

нування лікування у пацієнтів, яким проводять дентальну імплантацію, та надалі при виборі оптимального матеріалу для опорних структур імплантатів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Волінська Т. Б. Клінічний досвід застосування тестової системи Стوماتофлор для оцінки мікробіоти пародонтальної кишені методом ПЛР у режимі реального часу / Т. Б. Волінська, О. В. Бондарчук // Імплантологія Пародонтологія Osteологія. – 2016. – № 2. – С. 84–89. – Бібліогр.: 10 назв.
2. Зорина О.А., Кулаков А.А., Борискина О.А. Метод ПЦР «в реальном времени» для анализа количественного и качественного соотношений микробтоценоза пародонтального кармана // Стоматология. – 2011. – №3. – С. 31–33.
3. Іванюшко Т.П., Тумбинская Л.В., Донников А.Е. Исследование условно-патогенных микроорганизмов методом ПЦР в реальном времени у больных пародонтитом // Стоматология. – 2011. – №5. – С. 22–26.
4. Косенко К.Н., Чумакова Ю.Г., Городенко Э.А., & Басова, С.П. Микробные ассоциации пародонтального кармана у больных генерализованным пародонтитом // Вісник стоматології. – 2000. – №3. – С. 10–13.
5. Потупа О.І. Періімплантатні захворювання. Фактори ризику. Профілактика / О.І. Потупа // Імплантологія Пародонтологія Osteологія. – 2017. – № 3(47). – С.58-64.
6. Сидельников П.В. Гигиена полости рта на этапах имплантации / П. В. Сидельников // Современная стоматология. – 2002. – № 1. – С. 81–83.
7. Тимофеев А.А. Гигиена полости рта после проведения хирургического этапа дентальной имплантации / А.А. Тимофеев, В.И. Беда, М.А. Ярифа // Современная стоматология. – 2009. – № 2 (46). – С. 106–114.
8. Угрин М.М. Роль професійної гігієни у підтримуючій терапії на різних етапах імплантопротезної реабілітації пацієнтів та основні вимоги до спеціаліста / Угрин М.М., Бронська Ю.В., Угрин О.М. // Імплантологія Пародонтологія Osteологія. – 2008. – № 2 (10). – С. 13–20.
9. Berglundh, T., Gotfredsen, K., Zitzmann, N.U., Lang, N.P., & Lindhe, J. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs // *Clinical oral implants research*, 18 (5), (2007): 655-661.
10. Cortelli, Sheila Cavalca, et al. Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses // *Archives of oral biology* 58.1 (2013): 67-74.
11. Hajishengallis, George, Richard P. Darveau, and Michael A. Curtis. The keystone-pathogen hypothesis // *Nature Reviews Microbiology* 10.10 (2012): 717.
12. Mombelli, A., & Cionca, N.. The Prevalence of Peri-Implantitis: How Big is the Problem? // *In Forum implantologicum*. 9, No. 1, (2013): 12-19.
13. Mombelli A., N.P. Lang. The diagnosis and treatment of peri-implantitis. // *Periodontology*, 2000 17.1 (1998): 63-76.
14. Quirynen, M., Papaioannou, W., & van Steenberghe, D.. Intraoral transmission and the colonization of oral hard surfaces // *Journal of Periodontology*, 67(10), (1996): 986-993.
15. Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, et al. Initial subgingival colonization of pristine pockets // *Journal of Dental Research* 2005;84(4):340–4.
16. Socransky S., Haffajee A. et al. Microbial complexes in subgingival plaque // *Journal of clinical periodontology* 25.2 (1998): 134-144.
17. Sumida, Shinichi et al. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions // *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 17.5 (2002).
18. Takanashi, Kiyotoshy et al. Colonization by *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* from teeth to osseointegrated implant regions // *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 45.2 (2004):77-85.

## REFERENCES

1. Volinska, T.B., & Bondarchuk, V.O. (2016). Klinichniy dosvid zastosuvannya testovoi systemy Stomatoflor dlia otsinky mikrobioty parodontalnoi kysheni metodom PLR u rezhymy realnoho chasu. *Implantolohiia Parodontolohiia Osteolohiia*, 2, 84-89 (in Ukrainian).
2. Zorina, O.A., Kulakov, A.A., & Boriskina, O.A. (2011). Metod PCR «v real'nom vremeni» dlja analiza kolichestvennogo i kachestvennogo sootnoshenij mikrobtocenoza parodontal'nogo karmana. *Stomatologija*, 3, 31-33 (in Russian).
3. Ivaniushko, T.P., Tumbynskaia, L.V., & Donnykov, A.E. (2011). Yssledovanye uslovno-patohennykh mykroorhanyzmov metodom Ptsr v realnom vremeny u bolnykh parodontytom. *Stomatolohiia*, 5, 22-26 (in Russian).
4. Kosenko, K.N., Chumakova, Ju.G., Gorodenko, Je.A., & Basova, S.P. (2000). Mikrobnye asociacii parodontal'nogo karmana u bol'nyh generalizovannym parodontitom. *Visnik stomatologii*, (3), 10-13 (in Russian).
5. Potupa, O.I. (2017). Periimplantatni zakhvoriuvannia. Faktory ryzyku. Profylaktyka. *Implantolohiia Parodontolohiia Osteolohiia*, 3(47), 58-64 (in Ukrainian).
6. Sidel'nikov, P.V. (2002). Gigiiena polosti rta na etapah implantacii. *Sovremennaja stomatologija*, 1, 81–83 (in Russian).
7. Timofeev, A.A., Beda, V.I., & Jarifa, M.A. (2009). Gigiiena polosti rta posle provedeniia hirurgicheskogo jetapa dental'noj implantacii. *Sovremennaja stomatologija*, 2 (46), 106–114 (in Russian).
8. Uhryn, M.M., Bronska, Yu.V., & Uhryn, O.M. (2008). Rol profesiinoi hihieny u pidtrymuuichii terapii na riznykh etapakh implantoproteznoi rehabilitacii patsiiientiv ta osnovni vymohy do spetsialista. *Implantolohiia Parodontolohiia Osteolohiia*, 2 (10), 13-20 (in Ukrainian).
9. Berglundh, T., Gotfredsen, K., Zitzmann, N.U., Lang, N.P., & Lindhe, J. (2007). Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface roughness: an experimental study in dogs. *Clinical oral implants research*, 18 (5), 655-661 (in English).
10. Cortelli, Sheila Cavalca, & et al. (2013). Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. *Archives of oral biology*. 58.1, 67-74 (in English).
11. Hajishengallis, George, Richard P. Darveau, and Michael A. Curtis (2012). The keystone-pathogen hypothesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10.10: 717 (in English).
12. Mombelli, A. & Cionca, N. (1998). The Prevalence of Peri-Implantitis: How Big is the Problem? *In Forum implantologicum*. 9, 1, (2013): 12-19 (in English).
13. Mombelli, A., Lang, N.P. (2000). The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontology*, 17.1, 63-76 (in English).
14. Quirynen, M., Papaioannou, W., & van Steenberghe, D. (1996). Intraoral transmission and the colonization of oral hard surfaces. *Journal of Periodontology*, 67(10), 986-993 (in English).
15. Quirynen, M., Vogels, R., Pauwels, M., Haffajee, AD., Socransky, SS, Uzel, NG & et al. (2005). Initial subgingival colonization of pristine pockets. *Journal of Dental Research*, 84(4):340–4 (in English).
16. Socransky, S., Haffajee, A. et al. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*, 25.2, 134-144 (in English).
17. Sumida, Shinichi & et al. (2002). Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 17.5 (in English).
18. Takanashi, Kiyotoshy & et al. (2004). Colonization by *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* from teeth to osseointegrated implant regions. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 45.2, 77-85 (in English).

Стаття надійшла в редакцію 19 березня 2018 року