

УДК: 616.314

# Інтенсивність утворення біоплівки на цирконій оксидних опорних елементах імплантатів на прикладі полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі та бактеріальних посівів

The Intensity of Biofilm Formation Intensity on Zirconia Abutments Using Real-time Polymerase Chain Reaction and Microbiological Culture

Готь С.-Р.Р.<sup>1,2</sup>, асп.,  
Угрин М.М.<sup>1,2</sup>, к.мед.н., доц.,  
Гутор Т.Г.<sup>1</sup>, к.мед.н., доц.,  
Бондарчук О.Л.<sup>3</sup>, лікар-бактеріолог

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

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

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

Got S.-R.<sup>1,2</sup>, Ugrin M.<sup>1,2</sup>, Gutor T.<sup>1</sup>,  
Bondarchuk O.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Danylo Halytskyi 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: sofuyagot@gmail.com

**Мета:** Вивчити інтенсивність утворення біоплівки на цирконій оксидних опорних елементах імплантатів на прикладі полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі та бактеріальних посівів. **Методи:** У досліді взяли участь пацієнти, яким було встановлено цирконій оксидні абатменти. Дослідження проводили у три етапи, де на кожному етапі-відвідуванні забирали біоматеріал для проведення ПЛР в реальному часі та бактеріальних посівів. На першому відвідуванні забір біоматеріалу проводили навколо зуба. Друге відвідування відбулося після встановлення абатментів в порожнині рота, забір матеріалу проводили з періімплантної борозни навколо цирконій оксидних опорних структур імплантатів. На третьому відвідуванні, через три місяці після встановлення абатментів, проводили ідентичний забір матеріалу навколо абатментів.

**Результати:** Всього було проведено 42 ПЛР в реальному часі та 42 бактеріальні посіви. Реєстрація та облік результатів ПЛР проводилися автоматично з використанням ПЗ RealTime\_PCR для ампліфікаторів детектуючих. Інтерпретували результати згідно зі стандартною таблицею кількості мікроорганізмів у біотопі пародонтальної кишені. Порівняння кількості виявлення мікроорганізмів при ПЛР в реальному часі показало, що під час другого відвідування, коли біоматеріал забирали з періімплантної борозни навколо цирконій оксидних абатментів, було виявлено значно меншу кількість бактерій, ніж на зубі під час першого відвідування. Проте, під час третього відвідування кількість цих мікроорганізмів навколо цирконій оксиду зростала і була близькою до показників, які отримували навколо зубів під час першого відвідування. Однак, результати ПЛР за стандартними показниками відповідали нормі. Лише у двох пацієнтів виявили більшу кількість пародонтопатогенів. **Висновки:** Результати бактеріальних посівів та полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі, де кількісно оцінювали загалом 15 видів бактерій, показали незначну інтенсивність утворення біоплівки на цирконій оксидних опорних елементах імплантатів порівняно з показниками навколо зубів. Кількість виявлених пародонтопатогенів, які спричиняють запалення періімплантних тканин, не перевищувала норми. Результати проведеного дослідження підтверджують позитивні гігієнічні властивості цирконій оксиду.

**Ключові слова:** інтенсивність утворення біоплівки, ПЛР в реальному часі, пародонтопатогени, бактеріальні посіви.

**Purpose:** To study the intensity of the biofilm formation on zirconium oxide abutments using real-time polymerase chain reaction and microbiological culture. **Methods:** The study included patients who underwent dental implantation and had zirconia abutments fixed in their mouth. The research was conducted in three stages, where at each stage/visit a real-time PCR and bacterial cultures were performed. At the visit 1 samples were taken from the periodontal socket around the tooth. The second visit was after the installation of the abutments in the oral cavity, samples were collected from the periimplant socket around the zirconium oxide abutments. Visit 3 was in three months after the abutment installation. **Results:** A total of 42 real-time PCRs and 42 bacterial cultures were performed. Registration and record of PCR results were performed automatically by RealTime\_PCR software. Interpretation of the results was carried out in accordance with the standard table of microorganisms in the biotope of the periodontal pocket. A comparison of the number of microorganisms found in real-time PCR showed that in the second visit, when the samples were taken from a periimplant sulcus around

zirconia abutment, a significantly lower number of bacteria was detected than around a tooth during Visit 1. However, on Visit 3 the number of these microorganisms around zirconium oxide increased and was close to the values that were obtained around the teeth at Visit 1. However, the PCR results were in line with the standard according to the table of standards. Only two patients had an increased incidence of parodontopathogens. **Conclusions:** The results of bacterial cultures and real-time polymerase chain reaction, a total of 15 types of bacteria, showed an insignificant intensity of the biofilm formation on zirconia abutments compared with the teeth. The number of revealed periodontal pathogens did not exceed the norm. The results of this study confirm the positive hygienic properties of zirconium oxide.

**Key words:** intensity of the biofilm formation, a real-time PCR, parodontopathogens, microbiological culture.

## ВСТУП

Одним із ключових факторів вибору матеріалу для абатмента є його гігієнічні властивості [6, 7, 9–11]. Сьогодні на ринку доступна велика різноманітність матеріалів для імплантатів та їхніх складових, однак, через високі механічні, естетичні, а особливо гігієнічні вимоги найчастіше перевагу для виготовлення трансгінгівальних елементів імплантатів надають цирконій оксиду. У досліді *in vivo* досліджували утворення біоплівки порожнини рота на різних видах дентальної кераміки. Дійшли висновку, що найменше накопичення бактерій було саме на поверхні із цирконій оксиду [5]. Численні дослідження

показали, що періімплантні ділянки колонізовані бактеріями, серед яких є пародонтопатогени, а слизова оболонка, яка контактує з опорними структурами імплантатів, є бар'єром, що захищає імплантат від контамінації [3, 12]. Найінформативнішим дослідженням, яке дає кількісний і якісний склад мікрофлори періімплантних ділянок, є полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі [1, 2, 4, 12]. ПЛР дає можливість безпосередньо ідентифікувати такі пародонтопатогени, як *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* та *Treponema denticola*, адже саме ці мікроорганізми можуть спричинити пе-

ріімплантні захворювання та ставити під ризик довготривалу успішність імплантації. Мета дослідження – вивчити інтенсивність утворення біоплівки на цирконій оксидних опорних елементах імплантатів на прикладі полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі та бактеріальних посівів.

## МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

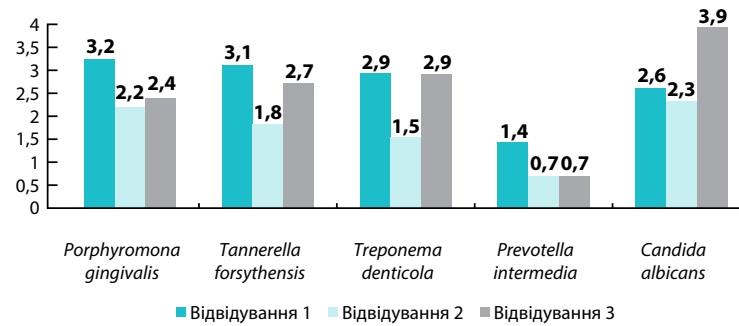
У дослідженні взяло участь 14 пацієнтів у належному фізичному стані, яких скерували на лікування у Центр стоматологічної імплантації та протезування «ММ». Дослідження було схвалене комісією з етики, і кожен пацієнт отримав детальний опис запропонованого

**Таблиця.** Середнє значення показників ( $M \pm SE$ ) мікроорганізмів під час кожного відвідування та порівняння відсотка виявлення мікроорганізмів

ZrO <sub>2</sub>	ПЛР							Бак
	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Porphyromona gingivalis</i>	<i>Tannerella forsythensis</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Candida albicans</i>	Загальна бакт. маса	КВМ
	Середнє значення показників ( $M \pm SE$ )							
Відвідування 1	–	3,2±0,6	3,1±0,7	2,9±0,9	1,4±0,8	2,6±1,3	5,7±0,3	3,2±0,1
Відвідування 2	2,3*	2,2±0,3	1,8±0,3	1,5±0,3	0,7±0,1	2,3±0,8	4,8±0,3	3,0±0,1
Відвідування 3	–	2,4±0,4	2,7±0,5	2,9±0,7	0,7±0,1	3,9±0,1	5,2±0,2	3,3±0,1
	Відсоток виявлення мікроорганізмів							
Відвідування 1/відвідування 2	–	-31,3%	-41,9%	-48,3%	-50,0%	-11,5%	-15,8%	-6,3%
Відвідування 2/відвідування 3	–	+9,1%	+50,0%	+93,3%	0%	+69,6%	+8,3%	+10,0%



**Мал. 1.** Забір біоматеріалу з періімплантної борозни для проведення ПЛР в режимі реального часу



**Мал. 2.** Зміна кількості мікроорганізмів (Lg GE/зразок) періімплантної борозни навколо цирконій оксидних опорних елементів імплантів за даними ПЛР

лікування для підписання форми інформованої згоди.

Пацієнтам провели дентальну імплантацию. Через три–шість місяців після хірургічного втручання встановили цирконій оксидні опорні елементи імплантів (абатменти). За 1 тиждень до початку лікування кожному пацієнтові виконали професійну гігієну порожнини рота, надалі гігієну більше не проводили протягом усього експериментального періоду. Обстежували пацієнтів упродовж трьох відвідувань. Під час першого відвідування суб'єкту дослідження проводили професійну гігієну порожнини рота, забір мате-

ріалу навколо зуба за допомогою паперових штифтів для полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в режимі реального часу та забір матеріалу навколо зуба для бактеріальних посівів. Друге відвідування відбулося через один тиждень – під час встановлення абатментів. На цьому відвідуванні проводили забір матеріалу навколо цирконій оксидного абатмента для отримання результатів ПЛР в режимі реального часу та бактеріальних посівів. На третьому відвідуванні через 3 місяці після встановлення абатментів виконували ті самі маніпуляції, як і при другому відвідуванні. Дослідження

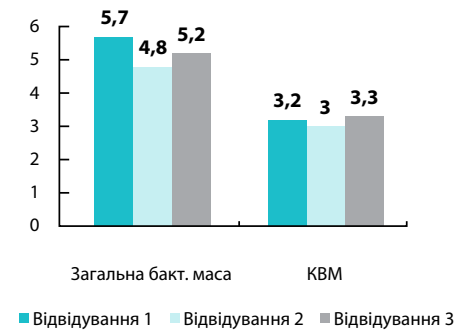
поділили на три групи відповідно до черговості відвідування: проводили попарні спостереження для порівняння кожної групи.

Матеріал для бактеріологічного дослідження забирали кюретами. Кюрету поміщали у періімплантну борозну навколо абатмента, відтак її вміст витирали об стерильний одноразовий ватний тампон, який поміщали у пробірку із транспортним середовищем. Забирали біоматеріал для ПЛР паперовими пінами №30. Пін вводили в ясенну або періімплантну борозну на 10–15 секунд (мал. 1). Якщо пін при введенні згинався, його замінювали, а забір матеріалу

(відвідування 1 і 2 та 2 і 3)

Бак								
<i>S.epidermidis</i>	<i>Candida</i>	<i>Ent.cloacal</i>	<i>St.saprophyticus</i>	<i>Str.viridans</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>E.coli</i>	<i>Morgi morganii</i>	<i>St.aureus</i>
$(2,5 \pm 2,5) \times 10^7$	$(1,4 \pm 1,2) \times 10^8$	$(2,3 \pm 1,3) \times 10^7$	$(3,8 \pm 2,4) \times 10^6$	$(3,4 \pm 2,1) \times 10^7$	–	$1,0 \times 10^{8**}$	–	$1,0 \times 10^{8**}$
$(1,7 \pm 1,7) \times 10^7$	$5,0 \times 10^{5**}$	$(7,5 \pm 2,5) \times 10^7$	$3,0 \times 10^{3**}$	$(7,6 \pm 6,2) \times 10^7$	$5,0 \times 10^{6**}$	$5,0 \times 10^{7**}$	–	–
$(1,0 \pm 0,8) \times 10^7$	$(5,3 \pm 4,8) \times 10^6$	$1,0 \times 10^{8**}$	–	$(3,1 \pm 1,6) \times 10^6$	–	–	–	–
-32,0%	–	+226,1% (у 3,2 рази)	–	+123,5% (у 2,2 рази)	–	–	–	–
-41,2%	–	–	–	-95,9%	–	–	–	–

Примітка: \* результати, де мікроорганізм висіювали лише в одного пацієнта



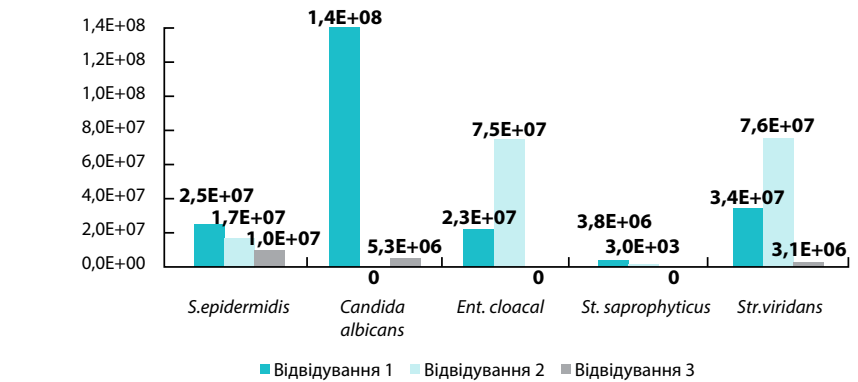
**Мал. 3.** Зміна кількості загальної бактеріальної маси та індексу КВМ періімплантної борозни навколо цирконій оксидних опорних елементів імплантатів за даними ПЛР

проводили повторно. Через 10–15 с пін витягали та поміщали в пластикову пробірку «Еппендорф» об'ємом 1,5 мл, герметично закривали і відправляли в лабораторію. Усі аналізи проводили в ПЛР-лабораторії Київської міської клінічної лікарні №4. Застосовували тестову систему «Стоматофлор» (Реєстраційне посвідчення № 12407/2013 від 15.02.2013), яка дозволяє проводити якісну та кількісну оцінку.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загалом було проведено 42 ПЛР в реальному часі та 42 бактеріальні посіви. Реєстрацію та облік результатів ПЛР виконували автоматично у ПЗ RealTime\_PCR для ампліфікаторів детектуючих. Інтерпретували результати відповідно до стандартної таблиці кількості мікроорганізмів у біотопі пародонтальної кишені (Lg GE/зразок). Кількість колоній, відібраних для подальшої роботи видів мікроорганізмів, підраховували для визначення ступеня бактеріального обмінення досліджуваного матеріалу та перерахунку на 1 мл рідкого матеріалу згідно зі стандартними показниками.

Результати наведено у вигляді середнього значення ( $M \pm SE$ ) та відсотка виявлення мікроорганізмів. У таблиці подано середнє значення (СЗ) резуль-



**Мал. 4.** Зміна кількості мікроорганізмів (КУО/зразок) періімплантної борозни навколо цирконій оксидних опорних елементів імплантатів за даними бактеріальних посівів

татів посівів серед пацієнтів, у яких виявили конкретні мікроорганізми (у табл. зірочкою позначені результати, де мікроорганізм висіювали лише в одного пацієнта). Під час першого відвідування ПЛР у реальному часі показала найбільше середнє значення у *P. gingivalis* ( $3,2 \pm 0,6$ ), під час другого та третього відвідувань – у *C. albicans* ( $2,3 \pm 0,8$  та  $3,9 \pm 0,1$  відповідно). Серед досліджуваних пацієнтів при всіх трьох відвідуваннях *P. intermedia* мало найменше середнє значення. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* виявили лише на цирконій оксиді під час другого відвідування. У процесі проведення бактеріальних посівів найбільше СЗ на першому відвідуванні спостерігали – у *Candida* ( $(1,4 \pm 1,2) \times 10^8$ ), на другому відвідуванні – у *Str. viridans* ( $(7,6 \pm 6,2) \times 10^7$ ), на третьому відвідуванні – у *S.epidermidis* ( $(1,0 \pm 0,8) \times 10^7$ ). Найбільшу різницю при визначенні відсотка виявлення мікроорганізмів за допомогою ПЛР показали *T. forsythensis* (41,9%), *T. denticola* (48,3%) та *P. intermedia* (50,0%), де при порівнянні відвідувань 1 і 2 визначали значно меншу кількість мікроорганізмів навколо цирконій оксиду, ніж навколо зубів. Порівнюючи 2 і 3 відвідування, кількість деяких організмів періімплантної борозни навколо цирконій оксидних абатментів значно збільшилась, а саме: *T. forsythensis* –

на 50,0%, *T. denticola* – на 93,3%, *C. albicans* – на 69,6%. Бактеріальні посіви показали, що кількість *Ent. cloacal* та *Str. viridans* збільшилась навколо оксиду цирконію порівняно із зубом у 3,2 та 2,2 раза відповідно. Проте на третьому відвідуванні кількість *Str. viridans* навколо цирконій оксидних абатментів зменшилась на 95,9%.

Порівняння кількості виявлення мікроорганізмів при ПЛР в реальному часі (мал. 2) показало, що на другому відвідуванні, коли біоматеріал забирали з періімплантної борозни навколо цирконій оксидних абатментів, було виявлено значно меншу кількість бактерій, ніж на зубі під час першого відвідування. Проте, на третьому відвідуванні кількість цих мікроорганізмів навколо цирконій оксиду зростала і була близькою до показників, які отримували навколо зубів під час першого відвідування. Однак, результати ПЛР відповідали нормі згідно зі стандартними показниками. Лише у двох пацієнтів виявили підвищену кількість пародонтопатогенів.

Загальна бактеріальна маса мала найбільші значення серед показників на першому відвідуванні (мал. 3), тобто у біоматеріалі, який забирали з пародонтальної кишені навколо зуба. Під час другого відвідування навколо цирконій оксидних опорних структур імплантатів її показники зменшувались,

але через три місяці на третьому відвідуванні знову підвищувались, проте відповідали нормі. КВМ під час усіх відвідувань становило не менше 2,5, що теж відповідало нормі.

Аналіз даних бактеріальних посівів показав (мал. 4), що кількість бактерій, висіяних навколо цирконій оксиду, була значно меншою, ніж навколо зуба у тих самих пацієнтів, що продемонстровано на прикладі таких мікроорганізмів, як *S. epidermidis*, *C. albicans*

та *St. saprophyticus*. *Ent. cloacal* та *Str. viridans* утворили більше колоній на цирконій оксиді під час другого відвідування порівняно із показниками навколо зуба. Проте, під час третього відвідування кількість колоній цих бактерій значно зменшилась.

## ВИСНОВКИ

Результати бактеріальних посівів та полімеразної ланцюгової реакції в ре-

альному часі, де кількісно оцінювали загалом 15 видів бактерій, показали незначну інтенсивність утворення біоплівки на цирконій оксидних опорних елементах імплантатів порівняно із показниками навколо зубів. Кількість виявлених пародонтопатогенів, які спричиняють запалення періімплантних тканин, не перевищувала норми. Результати цього дослідження підтверджують позитивні гігієнічні властивості цирконій оксиду.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Волінська Т.Б. Клінічний досвід застосування тестової системи Стоматофлор для оцінки мікробіоти пародонтальної кишені методом ПЛР у режимі реального часу / Т.Б. Волінська, О.В. Бондарчук // Імплантологія. Пародонтологія. Остеологія. – 2016. – № 2. – С. 84–89.
2. Готь С.-Р.Р. Методика визначення пародонтопатогенів навколо оксид-цирконієвих і титанових абатментів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу / С.-Р.Р. Готь, О.Л. Бондарчук, М.М. Угрин // Новини стоматології. – 2018. – №2 (95). – С. 36–39.
3. Потупа О.І. Періімплантатні захворювання. Фактори ризику. Профілактика // Імплантологія Пародонтологія Остеологія. – 2017. – №3 (47). – С. 58–64.
4. Avila-Campos, Mario Julio. "PCR detection of four periodontopathogens from subgingival clinical samples". *Brazilian Journal of Microbiology* 34.1 (2003): 81-84.
5. Bremer, F., Grade, S., Kohorst, P. & Stiesch, M. (2011). In vivo biofilm formation on different dental ceramics. *Quintessence International* 42, 565–574.
6. Degidi M., Artese L., Scarano A., Perrotti V., Gehrke P., Piattelli A. Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol.* 2006; 77(1):73-80.
7. De Oliveira, Greison Rabelo, et al. "Bacterial adhesion and colonization differences between zirconia and titanium implant abutments: an in vivo human study." *Journal of periodontal & implant science* 42.6 (2012): 217-223.
8. Eckert, Martin, et al. "In vivo expression of proteases and protease inhibitor, a serpin, by periodontal pathogens at teeth and implants." *Molecular oral microbiology* 33.3 (2018): 240-248.
9. Linkevicius, T., Pros, D., Apse, P., Pros, D., & Med, H. (2009). Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: A systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 101(2), 143.
10. Linkevicius, T., & Vaitelis, J. The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft peri-implant tissues: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Implants Research*, 2015; 26, 139–147.
11. Scarano A., Piattelli M, Caputi S, Favero GA, Piattelli A. Bacterial adhesion on commercially pure Titanium and Zirconium Oxide discs: an in vivo human study *J Periodontology*. 2004; 75(2).
12. Volpe, Stefano, et al. "Comparison of early bacterial colonization of PEEK and titanium healing abutments using real-time PCR". *Applied Osseointegration Research* 6.2 (2008): 54-56.

## REFERENCES

1. Volinska, T.B., & Bondarchuk, O.V. (2016). Klinichniy dosvid zastosuvannya testovoi systemy Stomatoflor dlia otsinky mikrobioty parodontalnoi kysheni metodom PLR u rezhymi realnoho chasu. *Implantologiya. Parodontologiya. Osteologiya*, no. 2, s. 84–89 (in Ukrainian).
2. Hot, S.-R.R., Bondarchuk, O.L. & Uhryn, M.M. (2018). Metodyka vyznachennia parodontopatohenu navkolo oksyd-tsyroniievykh i tytanovykh abatmentiv za dopomohoiu polimeraznoi lantsiuhovoi reaktsii v rezhymi realnoho chasu. *Novyny stomatologii*, no. 2 (95), s. 36–39 (in Ukrainian).
3. Potupa, O.I. (2017). Periimplantatni zakhvoriuvannia. Faktory ryzyku. Profilaktyka. *Implantologiya Parodontologiya Osteologiya*, no. 3 (47), s. 58–64 (in Ukrainian).
4. Avila-Campos, Mario Julio. "PCR detection of four periodontopathogens from subgingival clinical samples". *Brazilian Journal of Microbiology* 34.1 (2003): 81-84 (in English).
5. Bremer, F., Grade, S., Kohorst, P. & Stiesch, M. (2011). In vivo biofilm formation on different dental ceramics. *Quintessence International* 42, 565–574 (in English).
6. Degidi, M., Artese, L., Scarano, A., Perrotti, V., Gehrke, P., & Piattelli, A. (2006). Inflammatory infiltrate, microvessel density, nitric oxide synthase expression, vascular endothelial growth factor expression, and proliferative activity in peri-implant soft tissues around titanium and zirconium oxide healing caps. *J Periodontol.*, 77(1):73-80 (in English).
7. De Oliveira, Greison Rabelo, & et al. (2012). "Bacterial adhesion and colonization differences between zirconia and titanium implant abutments: an in vivo human study." *Journal of periodontal & implant science*, 42.6: 217-223 (in English).
8. Eckert, Martin, & et al. (2018). "In vivo expression of proteases and protease inhibitor, a serpin, by periodontal pathogens at teeth and implants." *Molecular oral microbiology*, 33.3: 240-248 (in English).
9. Linkevicius, T., Pros, D., Apse, P., Pros, D., & Med, H. (2009). Influence of abutment material on stability of peri-implant tissues: A systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 101(2), 143 (in English).
10. Linkevicius, T., & Vaitelis, J. (2015). The effect of zirconia or titanium as abutment material on soft peri-implant tissues: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Implants Research*, 26, 139–147 (in English).
11. Scarano, A., Piattelli, M, Caputi, S, Favero, GA, & Piattelli, A. (2004). Bacterial adhesion on commercially pure Titanium and Zirconium Oxide discs: an in vivo human study *J Periodontology*; 75(2) (in English).
12. Volpe, Stefano, & et al. (2008). "Comparison of early bacterial colonization of PEEK and titanium healing abutments using real-time PCR". *Applied Osseointegration Research* 6.2: 54-56 (in English).

Стаття надійшла в редакцію 7 вересня 2018 року