



Белорусский государственный медицинский
университет
3-я кафедра терапевтической стоматологии



Дифференцированный микробиологический тест в диагностике состояния периодонта

*Д-р мед. наук, профессор Л.Н.Дедова
Канд. биол. наук, П.А.Семижон*

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обозначить последовательность подготовительных мероприятий при разработке дифференцированного микробиологического теста в диагностике пациентов с болезнями периодонта

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Проведены микробиологические исследования содержимого периодонтальных карманов 450 пациентов в возрасте 18-65 лет и старше с хроническим генерализованным периодонтитом качественным и количественным выявлением периопатогенных *T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* методом ПЦР в режиме «реального времени».

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. Выделение ДНК из образцов клинического материала

Выделение ДНК из проб клинического материала осуществляют с использованием зарегистрированных в установленном порядке и разрешенных к применению коммерческих наборов реагентов, позволяющих выделить тотальную ДНК методом преципитации. Выделенные образцы ДНК могут храниться при $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение года.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3. Проведение количественной ПЦР в режиме «Реального времени»

Для количественного определения каждого возбудителя в исследуемом образце используется по два контрольных образца (стандарта). Перечень используемых олигонуклеотидов (праймеров) и контрольных образцов.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица 1. Структура праймеров для проведения количественной ПЦР для выявления ДНК *T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
PG-F:	GCGCTCAACGTTTCAGCCT
PG-R:	CACGAATTCCGCCTGCC
PG_FAM:	FAM-GGCAGTTTCAACGGC-BHQ
TF-F:	TGAAAGTTTGTTCGCTTAACGATAAAA
TF-R:	TCGTGCTTCAGTGTCAGTTATACCT
TF_ROX:	ROX-CATTCGCCTACTTCATC-BHQ2
TD-F:	CTTCCGCAATGGACGAAAGT
TD-R:	CAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA
TD_By-5:	By5-GTAAAATTCTTTTGCAGATGAAG-BHQ2

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

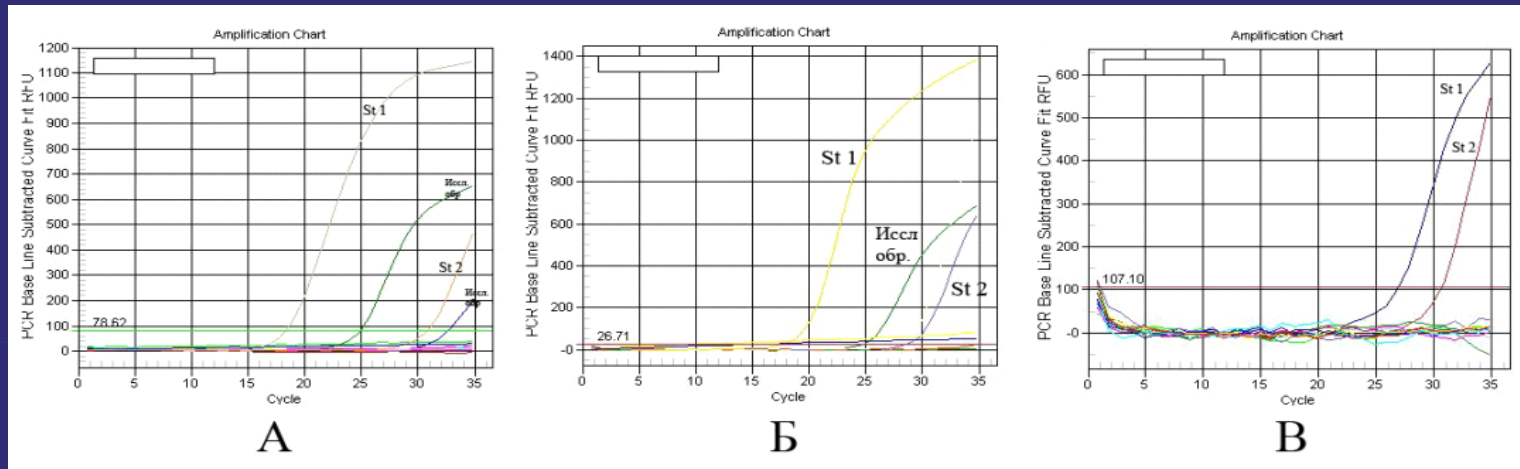
Таблица 2. Контрольные образцы (стандарты) для проведения количественной ПЦР

№	Наименование стандартного образца	Стандарт 1 (ГЭ/мл)*	Стандарт 2 (ГЭ/мл)*
1	pJET1.2/blunt/PG	$3,5 \cdot 10^7$	$3,5 \cdot 10^3$
2	pJET1.2/blunt/BF	$2,6 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^3$
3	pJET1.2/blunt/TD	$1,3 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^3$

*- могут быть использованы другие концентрации стандартных образцов.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. В результате проведения ПЦР амплифицируются специфические фрагменты ДНК, накопление которых регистрируется по нарастанию флуоресценции: по каналу Cy5 - для *T. denticola* и стандартных образцов pJET1.2/blunt/TD (B), по каналу FAM - для *P. gingivalis* и стандартных образцов pJET1.2/blunt/PG (A), по каналу ROX - для *B. Forsythus* и стандартных образцов pJET1.2/blunt/BF (Б).



Анализ кривых флуоресценции в результате постановки количественной ПЦР для выявления *T. denticola*, *P. gingivalis*, *B. forsythus*

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2. Анализ и интерпретацию результатов проводят с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР с детекцией в режиме «реального времени». Образец учитывается как положительный на наличие ДНК *T. denticola*, если для этого образца получено значение порогового цикла «Ct» по каналу Cy5 меньше либо равное 35; образец учитывается как положительный на наличие ДНК *P. gingivalis*, если для этого образца получено значение «Ct» по каналу FAM меньше либо равное 35; образец учитывается как положительный на наличие ДНК *B. forsythus*, если для этого образца получено значение «Ct» по каналу ROX меньше либо равное 35. Данные о количественном содержании каждого из возбудителей рассчитываются автоматически относительно контрольных образцов (стандартов).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3. Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения:

При соблюдении перечня указанных показаний, а также точном использовании техники выполнения манипуляций, изложенных в настоящей инструкции, осложнения и побочные эффекты исключены.

Проведение молекулярно-генетических исследований подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биоматериала, транспортировка, хранение и пробоподготовка; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что в свою очередь, приводит к неверной интерпретации результатов.

Причины ложноположительных результатов: перекрестная контаминация от образца к образцу в процессе пробоподготовки и на стадии выделения ДНК; загрязненные в результате предыдущих исследований реагенты, необработанный инструментарий.

Причины появления ложноотрицательных результатов: деградация исследуемой ДНК, несоблюдение технологии выделения нуклеиновых кислот, несоблюдение технологии подготовки ПЦР смеси, наличие ингибиторов ПЦР, использование реагентов с истекшим сроком годности, не соответствующий режим амплификации (неисправность оборудования).

Пути устранения: выделить ДНК повторно, строго следуя инструкции, соблюдая холодовую цепь; на всех этапах исследования необходимо использование одноразовой стерильной пластиковой посуды и наконечников во избежание внесения ингибиторов реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Использование в стоматологии молекулярно-биологического метода (ПЦР) повышает эффективность исследований, направленных на выявление в клиническом материале пациентов периопатогенных бактерий. Использование метода количественной ПЦР дает возможность прогнозировать стабилизацию или развитие болезней пародонта, выявлять заболевание до проявления выраженных воспалительно-деструктивных признаков или других патологических процессов, а также определяет роль периопатогенов в прогрессировании заболевания. В среднем срок получения результата составляет до 2-х суток.
2. Разработанный алгоритм подготовительных мероприятий открывают возможность в разработке дифференцированного микробиологического теста в диагностике пациентов с болезнями пародонта