

Т.Н. Модина¹,
д.м.н., профессор кафедры челюстно-
лицевой хирургии и стоматологии
Института усовершенствования врачей

Е.В. Мамаева²,
д.м.н., профессор

А.К. Абдрахманов³,
главный врач

Б.Р. Гильфанов²,
студент V курса стоматологического
факультета

О.Н. Ильинская⁴,
д.б.н., профессор, зав. кафедрой
микробиологии Института
фундаментальной медицины и биологии

¹ НМХЦ им. Н.И. Пирогова

² Казанский государственный медицинский университет

³ ООО «Камил-Дент», Казань

⁴ Казанский федеральный университет

Идентификация грибов рода *Candida* при воспалительных заболеваниях пародонта

Резюме. Использование современных методов микробиологической диагностики позволяет определять чувствительность грибов рода *Candida* и идентифицировать их, в том числе используя метод прямого белкового профилирования MALDI-TOF масс-спектрометрии, а назначаемые антимикотические препараты должны являться частью современного комплексного лечения воспалительных заболеваний пародонта, которые позволяют стабилизировать микробиоценоз и снизить воспалительные явления в тканях пародонта.

Ключевые слова: пародонт, грибы рода *Candida*, масс-спектрометрия

Summary. Using of modern methods of microbiological diagnostics allows determining the sensitivity of *Candida albicans* fungi and identifying them, including using the direct protein profiling method MALDI-TOF mass spectrometry, and prescribed antimycotic drugs should be part of the modern complex treatment of inflammatory periodontal diseases, which will stabilize the microbiocenosis and reduce inflammatory phenomena in periodontal tissues.

Key words: periodontal, *Candida*, mass spectrometry

Воспалительные заболевания пародонта, к сожалению, являются неотъемлемой частью современной действительности. Эта патология особенно актуальна для лиц молодого возраста, у которых ткани пародонта не являются окончательно сформированными и длительно находятся в состоянии физиологического напряжения [1–5]. Современные диагностические технологии позволяют прояснить этиологию и патогенез заболеваний пародонта, способствуют повышению эффективности лечения и улучшают качество жизни пациентов [6]. Для определения субгингивальных микроорганизмов используются такие подходы, как фазово-контрастная микроскопия, бактериальные посеы, иммунологические и ферментные тесты, а также ПЦР-диагностика [7–12]. Качество данных методов оценивается их чувствительностью и специфичностью. Как правило, золотым стандартом микробиологической диагностики является метод бактериальных посевов [11]. В то же время с развитием методов анализа ДНК для идентификации микрофлоры применяются и более современные подходы.

Известно, что нарушение состава резидентной микрофлоры выражается прежде всего в уменьшении нормальной микрофлоры и увеличении числа условно-патогенной и патогенной микрофлоры, при этом среди представителей условно-патогенных микроорганизмов дрожжеподобные грибы *Candida* клинически наиболее значимы [13, 14].

Концентрация грибов *Candida* в микрофлоре рта по сравнению с нормой увеличивается в экологически

неблагоприятных районах. Авторы отмечают, что изменение бактериоценоза рта является следствием стресса, нерационального приема антибиотиков и антисептиков, что приводит к быстрому изменению количественного и видового состава микрофлоры с преобладанием определенных видов микробов, в том числе грибов *Candida* [15–19]. По мнению многих исследователей, концентрация грибов *Candida* в микрофлоре рта по сравнению с нормой увеличивается при отсутствии адекватной тактики ведения лечебных мероприятий. Лишаясь конкурентов и антагонистов, грибы получают возможность к ускоренному росту, адгезии и колонизации.

В содержимом пародонтальных карманов *Candida spp.* выявляются у 23,3% пациентов в количествах от 10^3 до 10^8 КОЕ/мл, у 10,9% пациентов — в виде псевдомицелия, прорастающего в десневой эпителий [20]. Установлено, что грибковая флора в пародонтальных карманах выявляется в основном при рефрактерных формах пародонтита [21]. Предполагается, что некоторые бактерии сдерживают колонизацию *Candida*, а некоторые, напротив, коагрегируют, усиливая их патогенность [22–25]. Кандидассоциированному пародонтиту посвящено отдельное исследование и доказана роль грибов *Candida* в формировании указанной патологии [26]. Важно, что на фоне увеличения концентрации грибов *Candida* до этиологически значимых цифр в составе микробиоценоза происходит рост представителей патогенной флоры и уменьшение распространенности нормофлоры [27].

Все вышесказанное определило цель нашего исследования — идентификацию дрожжеподобных грибов *Candida* методом масс-спектрометрии MALDI-TOF, выделенных у молодых людей 18–19 лет с интактным пародонтом, хроническим генерализованным катаральным гингивитом (ХГКГ) и хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) легкой степени тяжести.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Согласно возрастной классификации ВОЗ, подростковый возраст охватывает период с 10 до 19 лет, поэтому в процессе проведения исследования была выбрана группа лиц в возрасте 18–19 лет. Критериями выбора данной возрастной группы явились, с одной стороны — завершение формирования постоянных зубов, тканей пародонта и снижение влияния симпатической иннервации на рост челюстей (18 лет), с другой — окончание пубертатного периода (19 лет).

Критерии включения в исследуемые группы:

- возраст 18–19 лет;
- отсутствие заболеваний (условно здоровые, не состоящие на учете в других медицинских организациях, люди);
- отсутствие вредных привычек;
- отсутствие беременности и неиспользование гормональной контрацепции;
- чистота по антибиотикам и антисептикам в течение 3 месяцев;
- отсутствие мукогингивальной патологии;
- отсутствие ортодонтической патологии;
- соответствие состояния тканей пародонта клиническим и рентгенологическим признакам интактного пародонта, ХГКГ, а также ХГП легкой степени тяжести;
- письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Критерием формирования групп явилась оценка состояния тканей пародонта обследованных — вид пародонтологического статуса. Обследовано 90 молодых людей случайно поделенных на 3 группы:

- I — 34 человека с интактным пародонтом;
- II — 30 человек с ХГКГ;
- III — 26 человек с ХГП легкой степени тяжести.

Комплекс диагностических мероприятий включал анализ микроорганизмов, выделенных из зубодесневой борозды у молодых людей I и II группы или из пародонтального кармана у пациентов III группы. Заборы проводили после проведения тщательной профессиональной гигиены рта. Удаляя наддесневые отложения стерильными кюретками, их осушали стерильным ватным шариком. Стерильным пинцетом вводили стерильную же ватную турунду в исследуемый участок на 10–20 секунд, не касаясь слизистой оболочки рта, поверхности эмали или коронки зуба. Далее исследуемый материал помещали в стерильный пластиковый контейнер и хранили в морозильной камере при температуре -25°C .

Исследование проводили в соответствии с инструкцией по экспериментам с участием человека в качестве субъекта, согласно с требованиями этического комитета Казанского ГМУ.

Для выявления грибов *Candida* проводили посев, с подсчетом их числа и идентификацией, используя метод прямого белкового профилирования MALDI-TOF масс-спектрометрии Bruker Daltonik MALDI Biotyper (Германия). Масс-спектрометрия — это физический метод измерения массы ионов исследуемого вещества, позволяющий проводить масс-спектрометрический анализ белковой фракции микробной клетки. Прямое белковое профилирование с помощью MALDI-TOF — новый динамично развивающийся метод протеомной характеристики микроорганизмов, который можно использовать для быстрой идентификации и внутривидовой классификации грибов рода *Candida* или определения их видовой принадлежности.

Метод прямого белкового профилирования MALDI-TOF позволяет определять различную вероятность идентификации микроорганизмов. Так, высокая вероятность идентификации вида определялась при значениях логарифмических показателей от 3,300 до 3,000 у.е.; гарантированная идентификация рода (возможная идентификация вида) — от 2,000 до 2,299 у.е.; возможная идентификация рода — от 1,700 до 1,999 у.е.; ненадежная идентификация — от 0 до 1,699 у.е.

DSM — бактериальные культуры из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ). CBS — Центральное бюро культур грибов — секция формирования коллекции карантинных грибов и их родственных видов Института биоразнообразия грибов Королевской Академии гуманитарных и точных наук Нидерландов. ATCC — Американская коллекция типовых культур. UKE — Университетский медицинский центр им. Эппендорфа (Гамбург, Германия).

Определение видовой принадлежности грибов рода *Candida* провели в междисциплинарном центре протеомных исследований кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При идентификации грибов рода *Candida* высокая вероятность не определялась ни в одном случае, равно как и ненадежная. Во всех группах для *Candida* гарантировано определяли родовую (с возможной видовой) принадлежность либо вероятную родовую принадлежность (см. таблицу).

Наиболее уверенно с результатом 2,060 у.е. определяли штамм CBS 1905 NT у молодых людей I группы. Важно, что CBS 1905 NT с различными показателями идентификации встречался во всех трех группах, что характеризует этот штамм как представителя основной фракции микробного сообщества.

Видовая принадлежность выделенных грибов рода *Candida*

Группа	Штамм	Показатель идентификации
I	CBS 1905 NT	2,060
II	CBS 1905 NT	2,192
III	CBS 1905 NT	2,127
II	VA_17248_07 04 UKE	2,098
III	VA_17248_07 04 UKE	2,037
II—III	ATCC 10231 THL	1,988
II—III	DSM 6659 DSM	1,779

При определении видовой принадлежности грибов рода *Candida* у пациентов II и III группы значения логарифмических показателей вероятности идентификации были статистически недостоверны.

Полученные результаты показывают, что штамм *Candida albicans* CBS 1905 NT присутствует в микрофлоре рта у всех обследованных как при интактном пародонте, так и при воспалительных заболеваниях пародонта.

Штаммы VA_17248_07 04 UKE, ATCC 10231 THL и DSM 6659 выделяли только при наличии воспалительных заболеваний пародонта (II и III группа). При этом для штамма VA_17248_07 04 UKE показатель идентификации соответствовал гарантированному определению родовой принадлежности с возможным определением вида. Для двух других штаммов — ATCC 10231 THL и DSM 6659 — имелась лишь вероятность идентификации рода с недостоверным различием между II и III группой.

Таким образом, грибы *Candida albicans* можно считать маркерами микробного происхождения хронического катарального гингивита и хронического генерализованного пародонтита легкой степени тяжести. При этом они либо находятся в ассоциации с воспалительными заболеваниями пародонта, либо инициируют развитие оральных кандидозов, влияющих на течение воспалительных заболеваний пародонта, с формированием более тяжелых клинических форм.

ВЫВОДЫ

Использование прямого белкового профилирования MALDI-TOF позволило провести идентификацию грибов рода *Candida* и определить их видовую принадлежность, что научно обосновывает использование в протоколах лечения воспалительных заболеваний пародонта антимикотических препаратов. Направленное действие антимикотиков и их использование в комплексе с другими антимикробными средствами позволит создать наилучшие условия для более качественного лечения воспалительных заболеваний пародонта и повысит его эффективность.

С этой целью возможно использование лекарственных средств различных форм (официальные или неофициальные) и поколений [28]:

- поливалентные антибиотики (макролиды) натамицин (пимафуцин), нистатин, леворин, микогептин;
- азольные соединения I поколения для местного применения (клотримазол, амиказол, изоконазол), II поколения только для местного применения (певарил), а также III (низорал, оксиконазол) и IV поколения (флуконазол/дифлюкан, интраконазол/орунгал, фторконазол);
- анилиновые красители (метиленовый синий, генциановый фиолетовый, фулорцин, риванол);
- препараты йода (йодиол, йокс, йодопирон, бетадин);
- антисептики широкого спектра действия (уротропин, стопангин, гексорал/гексетидин, тетраборат натрия, гексорал, пиралвекс, тантум верде, артрадонт);
- антисептики растительного происхождения (багульник, семена укропа, семена петрушки, тимьян, розмарин, гвоздика, гуава).

На сегодняшний день препаратами абсолютно нового поколения являются Амфотерицин В, Фунгизон, Амбизом, Вифенд, Вориконазол, Ноксафил, Канастен, Тридерм, Ороназол.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Лепехина О.А. Гигиенические аспекты в этиологии заболевания пародонта у детей г. Воронежа. — *Системный анализ и управление в биомедицинских системах*. — 2011; 1: 77—81.
2. Мамаева Е.В. Пародонтологический статус и функциональное состояние организма у подростков: дис. ... д.м.н. — М., 2007. — 145 с.
3. Модина Т.Н. Патогенетические критерии диагностики и лечения различных форм быстропрогрессирующего пародонтита: дис. ... д.м.н. — М., 2002. — 298 с.
4. Цунеккер Д.А. Особенности хронического гипертрофического гингивита у подростков 13—15 лет: дис. ... к.м.н. — Казань, 2013. — 131 с.
5. Shishniashvili T.E. Periodontal tissue pathology in pubertal children (pupils). — *Georgian Med News*. — 2012; 204: 22—6.
6. Орехова Л.Ю., Жаворонкова М.Д., Суборова Т.Н. Современные технологии бактериологического исследования пародонтальных пространств. — *Пародонтология*. — 2013; 2: 9—13.
7. Savitt E.D., Strzempko M.N., Vaccaro K.K., Peros W.J., French C.K. Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. — *J Periodontol*. — 1988; 59 (7): 431—8.
8. Loesche W.J. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. — *J Periodontol*. — 1992; 63 (12 suppl): 1102—9.
9. Savitt E.D., Keville M.W., Peros W.J. DNA probes in the diagnosis of periodontal microorganisms. — *Arch Oral Biol*. — 1990; 35 (suppl): 153S-159S.

- 10. Behl Y., Siqueira M., Ortiz J., Li J., Desta T., Faibish D., Graves D.T.** Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. — *J Immunol.* — 2008; 181 (12): 8711—8.
- 11. Boutaga K., van Winkelhoff A.J., Vandembroucke-Grauls C.M., Savelkoul P.H.** Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. — *J Clin Microbiol.* — 2003; 41 (11): 4950—4.
- 12. Takamatsu N., Yano K., He T., Umeda M., Ishikawa I.** Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. — *J Periodontol.* — 1999; 70 (6): 574—80.
- 13. Зеленова Е.Г., Заславская М.И., Салина Е.В., Рассанов С.П.** Микрофлора полости рта: норма и патология: Учебное пособие. — Нижний Новгород: НГМА, 2004. — 158 с.
- 14. Ушаков Р.В., Царев В.Н.** Микрофлора полости рта и ее роль в развитии стоматологических заболеваний. — *Стоматология для всех.* — 1998; 3 (4): 22—5.
- 15. Haffajee A.D.** Systemic antibiotics: to use or not to use in the treatment of periodontal infections. That is the question. — *J Clin Periodontol.* — 2006; 33 (5): 359—61.
- 16. Кравцова Е.О.** Колонизация микроорганизмами слизистой оболочки полости рта людей, живущих в неблагоприятной экологической обстановке: дис. ... д.м.н. — Волгоград, 1995. — 146 с.
- 17. Мелехов С.В., Колесникова Н.В., Овчаренко Е.С.** Состояние местного иммунитета и микробиоценоза полости рта у больных хроническим генерализованным пародонтитом. — *Пародонтология.* — 2013; 1 (73): 3—9.
- 18. Усманова И.Н., Герасимова Л.П., Кабирова М.Ф., Лебедева А.И., Туйгунов М.М.** Клинико-морфологические изменения тканей пародонта, обусловленные наличием дрожжеподобных грибов рода *Candida* у лиц молодого возраста. — *Пародонтология.* — 2015; 3 (76): 62—6.
- 19. Чепуркова О.А., Чеснокова М.Г., Недосеко В.Б., Комлева А.С.** Распространенность грибковой флоры и особенности микробиоценоза у лиц с интактным пародонтом и с хроническими воспалительными заболеваниями пародонта. — *Пародонтология.* — 2009; (1): 60—5.
- 20. Царев В.Н., Ушаков Р.В.** Антимикробная терапия в стоматологии: руководство. — 2-е изд. — М.: МИА, 2006. — 144 с.
- 21. Ньюман М.** Антимикробные препараты в стоматологической практике (пер. с англ.). — М.: Азбука, 2004. — 304 с.
- 22. de Miranda C.M., van Wyk C.W., Basson N.J.** Growth interaction between *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius*: in vitro and in vivo studies. — *J Dent Assoc S Afr.* — 1992; 47 (6): 253—6.
- 23. Grimaudo N.J., Nesbitt W.E., Clark W.B.** Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species. — *Oral Microbiol Immunol.* — 1996; 11 (1): 59—61.
- 24. Grimaudo N.J., Nesbitt W.E.** Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Fusobacterium* species. — *Oral Microbiol Immunol.* — 1997; 12 (3): 168—73.
- 25. Jenkinson H.F., Lala H.C., Shepherd M.G.** Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. — *Infect Immun.* — 1990; 58 (5): 1429—36.
- 26. Чепуркова О.А.** Кандидассоциированный пародонтит: диагностика, лечение: дис. ... д.м.н. — Омск, 2014. — 272 с.
- 27. Токмакова С.И., Бондаренко О.В., Куклина Н.В., Прокофьев В.В., Шестун К.Б., Киселева К.В.** Чувствительность к антимикотическим препаратам у пациентов с кандидозом полости рта. — *Проблемы стоматологии.* — 2014; (1): 26—8.
- 28. Шумский А.В., Железняк В.А.** Оральный кандидоз. — Самара: СамГМУ, 2008. — 199 с.