

УДК 616.311-002-053.8-092-07:575:576.3
DOI <https://doi.org/10.35220/2078-8916-2022-44-2.6>

I.O. Трубка,

доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри стоматології дитячого віку, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, Україна, 04112, itrubka@ukr.net

L.V. Корнієнко,

кандидат медичних наук, доцент, доцент кафедри стоматології дитячого віку, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, Україна, 04112, korniienko_l@ukr.net

З.В. Гостєва,

лікар-стоматолог, приватна стоматологічна клініка «Леодент», бульвар Лесі Українки, 4б, приміщення 77, Святопетрівське, Київська обл., Україна, 08144, gosteva_z@ukr.net

Л. Г. Єрмакова,

кандидат медичних наук, доцент, доцент кафедри стоматології дитячого віку, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, Україна, 04112, ermakova67@ukr.net

I.I. Зінкович,

кандидат медичних наук, доцент, доцент кафедри стоматології дитячого віку, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, Україна, 04112, irynazinkovych@gmail.com

В.С. Стулікова,

кандидат медичних наук, асистент кафедри стоматології дитячого віку, Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ, Україна, 04112, dr.v.stulikova@gmail.com

РЕЗУЛЬТАТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ПАРОДОНТОПАТОГЕНІВ У ПАЦІЄНТІВ МОЛОДОГО ВІКУ ІЗ ШВИДКОПЛІННИМ АГРЕСИВНИМ ПАРОДОНТИТОМ

Мета дослідження. Оцінити частоту визначення пародонтопатогенних мікроорганізмів у хворих на швидко прогресуючий агресивний пародонтит із використанням молекулярно-генетичного методу діагностики. **Методи дослідження.** Обстежено вибірку 61 пацієнтів (40 чоловіків та 21 жінка) із швидкопрогресуючим агресивним пародонтитом. Вік обстежених складав 18–32 роки. Методом полімеразної ланцю-

гової реакції (ПЛР) проведено аналіз вмісту пародонтальних кишень на предмет виявлення видоспецифічних фрагментів ДНК *Porphyromonas gingivalis* (Pgi), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aac), *Treponema denticola* (Td), *Bacteroides forsythus* (Bfo) та *Prevotella intermedia* (Pin). Біологічний матеріал (зіскоби з пародонтальних кишень) забирався відповідно до рекомендації молекулярно-генетичної лабораторії Державного закладу «Референс-центр з молекулярної діагностики Міністерства охорони здоров'я України».

Наукова новизна. Виявлення *Bacteroides forsythus* в монокультурі та в асоціації методом полімеразної ланцюгової реакції у вмісті пародонтальних кишень хворих на швидкопрогресуючий агресивний пародонтит має діагностичне значення. **Висновки.** Таким чином, аналіз мікробного профілю вмісту пародонтальних кишень у пацієнтів із швидкопрогресуючим агресивним пародонтитом із використанням методу молекулярно-генетичної діагностики (тестсистема «Мультидент-5») дозволив визначити ДНК найбільш клінічно значимих пародонтопатогенів в одному біологічному зразку із можливістю як якісної, так і кількісної оцінки результатів дослідження. У хворих із швидкопрогресуючим агресивним пародонтитом у клінічно значущій концентрації достовірно частіше виявлено *Bacteroides forsythus* (Bfo) (60,66%), як у вигляді монокультури (36,06%) так і у складі асоціацій з іншими пародонтопатогенами (24,58%).

Ключові слова: швидкопрогресуючий агресивний пародонтит, пародонтопатогенні мікроорганізми, молекулярно-генетичний метод діагностики.

I.O. Trubka,

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pediatric Dentistry, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, 9 Dorogozhytska street, Kyiv, Ukraine, postal code 04112, itrubka@ukr.net

L.V. Korniienko,

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pediatric Dentistry, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, 9 Dorogozhytska street, Kyiv, Ukraine, postal code 04112, korniienko_l@ukr.net

Z.V. Gosteva,

dentist, private dental clinic "Leodent", 4b Lesi Ukrainki boulevard, apt 77, Sviatopetrivske, Kyiv region, postal code 08144, gosteva_z@ukr.net

L.G. Ermakova,

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pediatric Dentistry, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, 9 Dorogozhytska street, Kyiv, Ukraine, postal code 04112, ermakova67@ukr.net

I.I. Zinkovych,

Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Pediatric Dentistry, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, 9 Dorogozhytska street, Kyiv, Ukraine, postal code 04112, irynazinkovych@gmail.com

V.S. Stulikova,

Candidate of Medical Sciences, Assistant of the Department of Pediatric Dentistry, Shupyk National Healthcare University of Ukraine, 9 Dorogozhytska street, Kyiv, Ukraine, postal code 04112, dr.v.stulikova@gmail.com

RESULTS OF MOLECULAR GENETIC DIAGNOSIS OF PERIODONTAL PATHOGENS IN YOUNG PATIENTS WITH RAPIDLY AGGRESSIVE PERIODONTITIS

Purpose of the study. To estimate the frequency of detection of periodontopathogenic microorganisms in patients with rapidly progressive aggressive periodontitis using the molecular genetic method of diagnosis. **Research methods.** A sample of 61 patients (40 men and 21 women) with rapidly progressive aggressive periodontitis was examined. The age of the subjects was 18–32 years. The content of periodontal pockets was analyzed by polymerase chain reaction to identify species-specific DNA fragments of *Porphyromonas gingivalis* (Pgi), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aac), *Treponema denticola* (Td), *Bacteroides forsythus* (Bfo), and *Prevotella intermedia* (Pin). Biological material (scrapings from periodontal pockets) was taken in accordance with the recommendations of the molecular genetic laboratory of the State Institution "Reference Center for Molecular Diagnostics of the Ministry of Health of Ukraine". **Scientific novelty.** In patients with rapidly progressive aggressive periodontitis, *Bacteroides forsythus* (Bfo) was significantly more often detected in the contents of periodontal pockets in a clinically significant concentration. **Conclusions.** The analysis of the microbial profile of periodontal pockets in patients with rapidly progressive aggressive periodontitis using the method of molecular genetic diagnostics (test system "Multident-5") allowed to determine the DNA of the most clinically significant periodontal pathogens in one biological sample with the possibility of both qualitative and quantitative evaluation of results of research. *Bacteroides forsythus* (Bfo) (60.66 %) was found to be significantly more common in patients with rapidly progressive aggressive periodontitis in clinically significant concentrations, both as a monoculture (36.06 %) and in associations with other periodontal pathogens (24.58 %).

Key words: rapidly progressive aggressive periodontitis, periodontopathogenic microorganisms, molecular genetics method of diagnosis.

Вступ. Хвороби пародонту, поряд з карієсом зубів та його ускладненнями, є найпоширенішими стоматологічними захворюваннями [1].

Нині доведено роль, як етіологічних чинників захворювань пародонту, понад 20 видів бактерій, проте лише для декількох видів виявлено потужні асоціації із прогресуванням захворювання [2]. На Всесвітній робочій нараді клінічних пародонтологів у 1996 році до специфічних патогенних бактерій, що беззаперечно зумовлюють виник-

нення захворювань пародонту, було віднесено *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* та *Porphyromonas gingivalis* [3].

На сьогодні найбільш точним методом діагностики патогенних мікроорганізмів є ПЛР аналіз. На відміну від класичних схем виявлення патогенів, заснованих на бактеріальному посіві біологічного зразка з ураженої ділянки, діагностика ПЛР є короткостроковим і високопродуктивним методом [4], при якому відсутній тривалий та складний етап культивування, що дозволяє скоротити час аналізу до кількох годин [5].

Крім того, можливість мультиплексної ПЛР визначати одночасно кілька збудників в одному біологічному зразку сприяє призначенню адекватного етіотропного лікування [5].

Висока частота виявлення у хворих на пародонтит згаданих вище збудників та їх агресивність спонукали дослідників розробити алгоритми виявлення ДНК саме цієї групи патогенів [6]. Діагностична система «Мультидент-5» (GenLab) дозволяє успішно ідентифікувати одночасно 5 патогенів ротової порожнини людини, які є надійними маркерами пародонтиту [7] та асоційовані з прогресуванням захворювання: *Porphyromonas gingivalis* (Pgi), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aac), *Treponema denticola* (Td), *Bacteroides forsythus* (Bfo) та *Prevotella intermedia* (Pin) [8; 9].

Мета дослідження: оцінити частоту визначення пародонтопатогенних мікроорганізмів у хворих на швидкопрогресуючий агресивний пародонтит із використанням молекулярно-генетичного методу діагностики.

Матеріали і методи дослідження. До дослідження було включено 61 пацієнтів (40 чоловіків та 21 жінка) із встановленим діагнозом «швидкопрогресуючий агресивний пародонтит» (ШАП). Вік обстежених складав 18–32 років за середнього значення $27 \pm 2,3$ років.

Біологічний матеріал (зіскоби з пародонтальних кишень) забирався відповідно до рекомендацій молекулярно-генетичної лабораторії Державного закладу «Референс-центр з молекулярної діагностики Міністерства охорони здоров'я України». Молекулярно-генетична діагностика проведена тест-системою «Мультидент-5» (GenLab).

Молекулярно-генетичне дослідження проводилось шляхом виявлення геномної ДНК п'яти пародонтопатогенних бактерій *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*. Транспортування зраз-

ків в лабораторію відбувалось протягом 3 годин після забору, зі збереженням холодового ланцюга.

На початку роботи проводили пробопідготовку зразків «Муколізином» (AmpliSens). У кожен зразок додавали по 300 мкл Муколізину та інкубували при кімнатній температурі 1–1,5 год. Після цього пробірки центрифугували 1 хв при 12 тис. об/хв, видаляли паперові штифти, знов центрифугували 1 хв при 12 тис. об/хв та відбирали надосадову рідину, надалі використовуючи осад в якості зразка.

Перед початком виділення ДНК суспензію Реалакс ретельно піпетували. Маркували необхідну кількість центрифужних пробірок типу Еппендорф на 1,5 мл, враховуючи негативний контроль (К–). В кожен зразок (з осадом) додавали по 200 мкл Реалакса (піпетували перед кожним внесенням), перемішували за допомогою вортекса. Інкубували зразки в мікротермостаті при 56 °С на протязі 10 хв, струшували на вортексі 5 с і далі інкубували при 99 °С на протязі 10 хв. Після інкубації зразки ретельно вортексували та центрифугували 1 хв при 12 тис. об/хв.

Для постановки ампліфікації використовували набір «Мультидент-5» (GenLab). Маркували необхідну кількість пробірок для ПЛР (на 200 мкл). Для приготування ампліфікаційної суміші в чисту пробірку переносили попередньо пропіпетований Супермікс з розрахунку 21 мкл на 1 зразок та додавали полімеразу з розрахунку по 0,3 мкл на 1 зразок. Суміш розносили по пробіркам, додавали олію для ПЛР і вносили під

олію по 5 мкл відповідного зразка ДНК, ретельно піпетуючи (в К+ вносили готовий «ДНК+ контроль», в К– вносили негативний контрольний зразок виділення). Щільно закривали пробірки та ставили в ампліфікатор Flex Cycler (Analytik Jena, Німеччина) для відповідного температурного режиму ПЛР (табл. 1).

Продукти ампліфікації (амплікони) оцінювали в гель-електрофорезі з використанням камери для горизонтального електрофорезу multiSubMidi (“Cleaver Scientific Ltd”, Велика Британія) та за допомогою системи гель-документації MicroDOC System with UV Transilluminator ClearView (“Cleaver Scientific Ltd”, Велика Британія). Детекцію результатів проводили в 2 % агарозному гелі з використанням в якості барвника бромистого етидію. Інтерпретацію зразків здійснювали оцінюючи наявність чи відсутність відповідних фрагментів ДНК (табл. 2).

Додатково оцінювали інтенсивність світіння фрагментів при електрофоретичному розподілі (рис. 1), де:

«–» – відсутність світіння;

«+» – світіння меншої яскравості від контрольного;

«++» – світіння на рівні контрольного;

«+++» – світіння більшої яскравості від контрольного;

«++++» – дуже яскраве світіння.

Результати дослідження та обговорення. Усі збудники, виявлені з допомогою набору «Муль-

Таблиця 1
Режими ампліфікації фрагментів ДНК

Етап	Температура	Час	Кількість циклів
Передплавлення	95 °С	2 хв	36
Плавлення	95 °С	40 с	
Відпал	61 °С	40 с	
Синтез	72 °С	50 с	
Пролонгація синтезу	72 °С	2 хв	

Таблиця 2
Ампліфікаційні розміри фрагментів ДНК

Збудник	Скорочена назва	Розмір (п. н.)
Prevotellai ntermedia	Pin	1010
Bacteroides forsythus	Bfo	750
Treponema denticola	Td	530
Actinobacillus actinomycetemcomitans	Aac	380
Porphyromonas gingivalis	Pgi	210

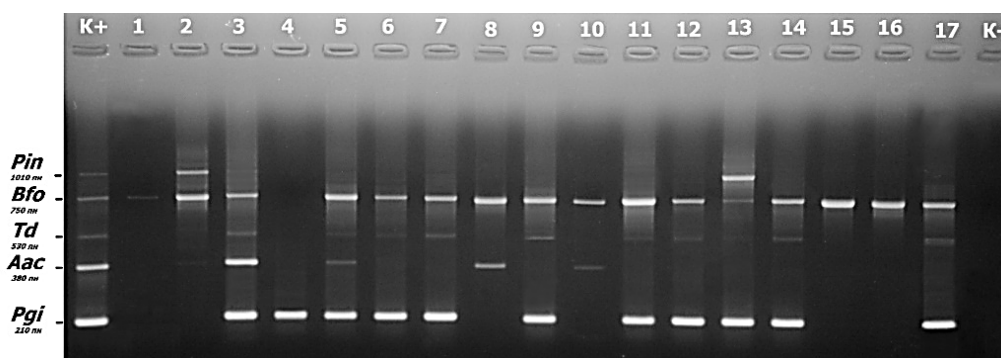


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації

Таблиця 3

Результати молекулярно-генетичної діагностики

Пародонто-патогени	Pin		Bfo		Td		Aac		Pgi	
	61		61		61		61		61	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Яскравість ампліконів										
<i>Не виявлено</i>	53	86,89	5	8,20	25	40,98	50	81,96	15	24,60
+	0	0	4	6,56	9	14,75	5	8,20	4	6,56
++	2	3,27	15	24,60	17	27,87	1	1,65	34	55,73
+++	3	4,92	19	31,15	9	14,75	3	4,92	7	11,46
++++	3	4,92	18	29,51	1	1,65	2	3,27	1	1,65
Позитивний результат	6	9,84	37	60,66	10	16,40	5	8,19	8	13,11

тидент-5», є умовними патогенами та можуть бути присутніми у ротовій порожнині здорових людей без патологічних змін. Клінічно значущі їх концентрації перевищують 10^4 од/мл, нижчі значення відповідають нормі. Яскравість ампліконів у контрольному зразку, а саме ++ (близько 10^4 од/мл) є орієнтовною та відповідає клінічному рівню ДНК збудника в пробі. У тих зразках, де рівень флуоресценції слабший за контроль, можна констатувати наявність збудника на доклінічному рівні. Там, де флуоресценція на рівні контрольної лінії – результат прикордонний. Якщо яскравість смуги амплікону помітно інтенсивніша за контроль (+++ або ++++), відповідь має бути позитивною [5]. Результати молекулярно-генетичної діагностики у 61 пацієнта наведено у таблиці 3.

В результаті проведених лабораторно-діагностичних досліджень визначено, що у клінічно значимих концентраціях (яскравість ампліконів +++ та більше) пародонтопатогени у вигляді монокультур або асоціацій виявлено у 46 досліджених (75,41 %).

Так, монокультури пародонтопатогенів виявлено у 28 обстежених (45,90 %). Серед монокультур найчастіше визначався *Bacteroides forsythus* – 36,06 % випадків (22 обстежених). Питома вага виявлення *Prevotella intermedia* складала 4,92 %, (3 обстежених), а *Actinobacillus actinomycetemcomitans* – 3,27 % (2 обстежених). Найменший відсоток виявлення спостерігався у *Porphyromonas gingivalis* – 1,64 %, а *Treponema denticola* у монокультурі не визначалась.

Також, пародонтопатогени визначались у досліджуваному матеріалі у вигляді асоціацій з двох або трьох мікроорганізмів.

Асоціацію з двох видів мікроорганізмів ми визначили у 16 обстежених (26,23 % випадків), причому найбільш активно вона була представлена комбінацією *Bacteroides forsythus* та *Treponema denticola* – 11,47 % (7 обстежених),

а також *Bacteroides forsythus* та *Porphyromonas gingivalis* – у 4 обстежених (6,55 %).

Асоціація з трьох видів пародонтопатогенів у клінічно значимих концентраціях визначалась у 2 обстежених у вигляді комбінації *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola* та *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (1,64 %), або *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* та *Porphyromonas gingivalis* (1,64 %) (табл. 4).

Таблиця 4

Частота виявлення пародонтопатогенів у пацієнтів із швидкопрогресуючим агресивним пародонтитом

	Частота виявлення (n=61)	
	абс.	%
Монобактерії		
Pin	3	4,92
Bfo	22	36,06
Td	-	-
Aac	2	3,27
Pgi	1	1,64
Асоціації 2 бактерій		
Pin/ Bfo	2	3,27
Bfo/ Td	7	11,47
Bfo/ Pgi	4	6,55
Td/ Pgi	2	3,27
Pin/ Pgi	1	1,64
Bfo/ Aac	1	1,64
Асоціації 3 бактерій		
Bfo/ Td/Aac	1	1,64
Bfo/Aac/Pgi	1	1,64

Результати нашого дослідження узгоджуються із повідомленнями дослідників щодо діагностичної цінності виявлення пародонтопатогенів – представників саме червоного комплексу у пацієнтів із ШАП, а найбільш значущим критерієм діагностики захворювань пародонта та прогнозування їх перебігу є ідентифікація навіть одного або двох видів бактерій першого порядку: *Porphyromonas*

gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides forsythia та їх асоціація або комбінація одного із цих видів із Treponema denticola та Prevotella intermedia. Також, Bacteroides forsythia вважається безумовним індикатором ризику кровоточивості ясен [10].

За результатами нашого дослідження, найчастіше у хворих на ШАП у клінічно значущій концентрації виявлявся Bacteroides forsythia (60,66 %) як у вигляді монокультури (36,06 % випадків), так і у складі асоціацій із двох (21,3 %), або трьох (3,28 %) пародонтопатогенів. Даний мікроорганізм є облигатним анаеробом поверхневий S-шар якого сприяє агрегації та інвазії в епітеліальні клітини та аглютинації еритроцитів, а при спільному культивуванні з макрофагами та епітеліальними клітинами викликає виділення протизапальних цитокінів, хемокінів, простагландинів E [11; 12].

Bacteroides forsythia вважається одним із найбільш сильних бактеріальних маркерів деструктивних захворювань пародонтата і часто культивується у пацієнтів із втратою кісткової тканини [7] та рефрактерними пародонтитами [13].

Такі наукові спостереження корелюються із результатами нашого дослідження, яке демонструє перевагу у біологічних зразках пацієнтів молодого віку із ШАП саме Bacteroides forsythia як у вигляді монокультури, так і у асоціації з іншими пародонтопатогенами.

Висновки. Таким чином, аналіз мікробного профілю вмісту пародонтальних кишень у пацієнтів із ШАП із використанням методу молекулярно-генетичної діагностики (тест система «Мультидент-5») дозволяє визначити ДНК найбільш клінічно значимих пародонтопатогенів у одному біологічному зразку із можливістю як якісної, так і напівкількісної оцінки результатів дослідження. У більшості обстежених пацієнтів із ШАП виявлено Bacteroides forsythia (60,66 %), як у вигляді монокультури (36,06 %) так і у складі асоціацій з іншими пародонтопатогенами (24,58 %).

Література:

1. Белоклицкая Г. Ф., Горголь К. О. Ведущие местные факторы риска в развитии воспалительных заболеваний пародонта у лиц молодого возраста. *Стоматология. Эстетика. Инновации*. 2017. № 1 (2). С. 203–214.
2. Feng Z., Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology* 2000. 2006. № 40 (1). С. 50–76.
3. Offenbacher S., Zambon J. J. Consensus report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Annals of Periodontology*. 1996. № 1. С. 926–932.

4. Лопухов Л. В., Эйдельштейн М. В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000. № 3. С. 96–106.

5. Волков А. Н. Апробация тест-системы для одно-временного ПЦР-анализа пяти пародонтопатогенных микроорганизмов в биологическом образце. *Медицина в Кузбассе*. 2014. № 4 (13). С. 14–18.

6. Ibrahim R. O., Shaker O. The effectiveness of adjunctive systemic antibiotics to non surgical therapy in chronic periodontitis patients. *Journal of American Science*. 2012. V. 8 (12). P. 374–383.

7. Van Winkelhoff A. J., Loos B. G., Van der Reijden W. A. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythia and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology*. 2002. V. 29. P. 1023–1028.

8. Haffajee A. D., Socransky S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology*. 1994. V. 5. P. 78–111.

9. Haffajee A. D., Teles R. P., Socransky S. S. Association of Eubacterium nodatum and Treponema denticola with human periodontitis lesions. *Oral Microbiology and Immunology*. 2006. V. 21. P. 269–282.

10. Царев В. Н., Николаева Е. Н., Ипполитов Е. В. Пародонтопатогенные бактерии – основной фактор возникновения и развития пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017. № 5. С. 101–112.

11. Чухловин А. Б., Матело С. К., Соловьева А. М. Метод ПЦР-детекции пародонтопатогенных бактерий Streptococcus mutans в биологических образцах из ротовой полости. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2007. № 4. С. 35–38.

12. Beck J. D. Slade G. D. Epidemiology of periodontal diseases. *Current Opinion in Periodontology*. 1996. Vol. 3. P. 3–9.

13. Yang H. W., Huang Y. F., Chou M. Y. Occurrence of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontally diseased and healthy subjects. *Journal of Periodontology*. 2004. Vol. 75. № 8. P. 1077–1083.

References:

1. Beloklitskaya, G. F., Gorgol, K. O. (2017). Vedushie mestnye faktory riska v razvitiy vospalitelnyh zabolevanij parodonta u lic mladogo vozrasta [Leading local risk factors in the development of inflammatory periodontal diseases in young people]. *Stomatologiya. Estetika. Innovacii – Dentistry. Aesthetics. Innovation*, 1 (2), 203–214 [in Russian].
2. Feng, Z., Weinberg, A. (2006) Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology* 2000, 40 (1), 50–76.
3. Offenbacher, S., Zambon, J. J. (1996). Consensus report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. *Annals of Periodontology*, 1, 926–932.

4. Lopukhov, L. V., Eidelstein, M. V. (2000). Polimeraznaya serpnaya reakciya v klinicheskoy mikrobiologicheskoy diagnostike. [Polymerase chain reaction in clinical microbiological diagnostics]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya – Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 3, 96–106 [in Russian].
5. Volkov, A. N. (2014). Aprobatsiya test-sistemy dlya odnovremennogo PCR-analiza pyati parodontopatogennykh mikroorganizmov v biologicheskom obrazce. [Approbation of a test system for simultaneous PCR analysis of five periodontopathogenic microorganisms in a biological sample]. *Medicina v Kuzbass – Medicine in Kuzbass*, 4 (13), 14–18 [in Russian].
6. Ibrahim, R. O., Shaker, O. (2012). The effectiveness of adjunctive systemic antibiotics to non surgical therapy in chronic periodontitis patients. *Journal of American Science*, 8, 374–383.
7. Van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., Van der Reijden, W. A. (2002). Porphyromonasgingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *Journal of Clinical Periodontology*, 29, 1023–1028.
8. Haffajee, A. D., Socransky, S. S. (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology*, 5, 78–111.
9. Haffajee, A. D., Teles, R. P., Socransky, S. S. (2006). Association of Eubacterium nodatum and Treponema denticola with human periodontitis lesions. *Oral Microbiology and Immunology*, 21, 269–282.
10. Tsarev, V. N., Nikolaeva, E. N., Ippolitov, E. V. (2017) Parodontopatogennye bakterii – osnovnoj faktor vzniknoveniya i razvitiya parodontita. [Periodontopathogenic bacteria – the main factor in the occurrence and development of periodontitis]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii – Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 5, 101–112 [in Russian].
11. Chukhlovin, A. B., Matelo, S. K., Solovieva, A. M. (2007). Metod PCR-detekcii parodontopatogennykh bakteriji Streptococcus mutans v biologicheskikh obrazcah iz rotovoj polosti. [Method for PCR detection of periodontopathogenic bacteria Streptococcus mutans in biological samples from the oral cavity]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika – Clinical laboratory diagnostics*, 4, 35–38 [in Russian].
12. Beck, J. D., Slade, G. D. (1996) Epidemiology of periodontal diseases. *Current Opinion in Periodontology*, 3, 3–9.
13. Yang, H. W., Huang, Y. F., Chou, M. Y. (2004). Occurrence of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontally diseased and healthy subjects. *Journal of Periodontology*, 75 (8), 1077–1083.