

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Янушевич О.О., Царёв В.Н., Балмасова И.П., Николаева Е.Н., Царёва Т.В., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В.

ПЕРВЫЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО НАБОРА ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НОВОГО ПАРОДОНТОПАТОГЕНА *FILIFACTOR ALOCIS* И ЕГО АССОЦИИ С *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*

ФГБОУ ВО Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова Минздрава РФ, 127006, Москва, Россия

*В последние годы отмечается глобальный рост генерализованного пародонтита средней и тяжёлой степени, особенно среди пациентов в наиболее работоспособном возрасте, спектр возможных патогенов постоянно увеличивается. Это определяет необходимость создания новых молекулярно-генетических систем для ПЦР-диагностики и их апробацию в клинической работе врача-стоматолога. Проведена сравнительная оценка выявления ключевых пародонтопатогенных видов *P. gingivaqlis* и *F. alocis* при разных формах пародонтита по степени прогрессирования с использованием нового набора ранее патентованных генетических праймеров. Установлена более высокая частота выявления пародонтопатогенов у пациентов группы С с выраженной тенденцией к прогрессированию (93 и 100% соответственно). Ассоциация *P. gingivalis* и *F. alocis* при хроническом пародонтите степени В отмечена в 20% случаев, а у степени С – в 93% случаев. Не отмечено одновременного наличия обоих пародонтопатогенов у здоровых людей. ПЦР с заявленными олигонуклеотидными праймерами может быть использована для эффективного определения степени прогрессирования пародонтита.*

Ключевые слова: пародонтит, степень прогрессирования; ПЦР, ключевые пародонтопатогены; *P. Gingivaqlis*, *F. alocis*.

Для цитирования: Янушевич О.О., Царёв В.Н., Балмасова И.П., Николаева Е.Н., Царёва Т.В., Подпорин М.С., Ипполитов Е.В. Первый опыт применения отечественного диагностического набора генетических праймеров для выявления нового пародонтопатогена *Filifactor alocis* и его ассоциации с *Porphyromonas gingivalis*. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (12): 744-748. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-12-744-748>

Для корреспонденции: Ипполитов Евгений Валерьевич, д-р мед. наук, проф. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии; e-mail: ippo@bk.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. В работе была использована инфраструктура Уникальной научной установки «Трансгенбанк» (ИБГ РАН).

Поступила 07.11.2022

Принята к печати 14.11.2022

Опубликовано 00.12.2022

Yanushevich O.O., Tsarev V.N., Balmasova I.P., Nikolaeva E.N., Tsareva T.V., Podporin M.S., Ippolitov E.V.

THE FIRST EXPERIENCE OF USING A DOMESTIC DIAGNOSTIC SET OF GENETIC PRIMERS TO IDENTIFY A NEW PERIODONTAL PATHOGEN *FILIFACTOR ALOCIS* AND ITS ASSOCIATION WITH *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*

A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 127006, Moscow, Russia

*In recent years, there has been a global increase in generalized periodontitis of moderate and severe degree, especially among patients at the most working age, and the range of possible pathogens is constantly increasing. This determines the need to create new molecular genetic systems for PCR diagnostics and their approbation in the clinical work of a dentist. A comparative assessment of the identification of key periodontopathogenic species *P. gingivaqlis* and *F. alocis* in different forms of periodontitis according to the degree of progression using a new set of previously patented genetic primers was carried out. A higher frequency of detection of periodontal pathogens was established in patients of group C with a pronounced tendency to progression (93 and 100%, respectively). The simultaneous presence of *P. gingivalis* and *F. alocis* in chronic periodontitis of grade B was noted in 20% of cases, and in grade C – in 93% of cases. However, there was no simultaneous presence of both periodontal pathogens in healthy people. PCR with the claimed oligonucleotide primers can be used to effectively determine the degree of periodontitis progression.*

Key words: periodontitis; degree of progression; PCR; key periodontopathogens; *P. gingivaqlis*; *F. alocis*.

For citation: Yanushevich O.O., Tsarev V.N., Balmasova I.P., Nikolaeva E.N., Tsareva T.V., Podporin M.S., Ippolitov E.V. The first experience of using a domestic diagnostic set of genetic primers to identify a new periodontopathogen *Filifactor alocis* and its association with *Porphyromonas gingivalis*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (12): 744-748 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-12-744-748>

For correspondence: Ippolitov Evgeny Valeryevich, – Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology; e-mail: ippo@bk.ru

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interest.

Acknowledgment. The study was carried out using the unique scientific facility Transgenebank (The Institute of Gens Byology, RAN).

Received 07.11.2022

Accepted 14.11.2022

Published 00.12.2022

Введение. Воспалительные заболевания пародонта (гингивит, пародонтит), особенно лёгкой и средней степени, широко распространены во всем мире – частота встре-

чаемости этой патологии составляет от 50 до 80% и более, в зависимости от региона [1, 2]. В последние годы отмечается глобальный рост генерализованного пародонтита

средней и тяжёлой степени, особенно среди пациентов в наиболее работоспособном возрасте 30–40 лет и старше [1, 3]. Становится очевидным, что медико-социальное значение воспалительных заболеваний пародонта в последние годы значительно возросло, проблема активно обсуждается на конгрессах, проводимых под эгидой ВОЗ, других международных и региональных организаций [4].

Методы лабораторной диагностики воспалительных заболеваний пародонта, используемые в клинической практике, в значительной части основаны на применении импортных диагностических систем, что представляет значительные трудности в условиях санкционного режима проводимого основными производителями этих систем по отношению к Российской Федерации и требуют безотлагательного решения вопросов, связанных с импортозамещением [5].

В настоящее время признается полимикробная природа пародонтита, воспалительный ответ организма человека на пародонтопатогенные бактерии считается решающим фактором в развитии и прогрессировании заболевания. Мета-анализ, проведённый в рамках международного проекта Human Microbiome Project показал, что над- и поддесневые зубные отложения (биоплёнка) представлены 14 таксонами микроорганизмов, которые являются самыми многочисленными как по частоте выявления, так и в количественном выражении в составе биоплёнки десны: *Actinomyces*, *Aggregatibacter*, *Capnocytophaga*, *Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Rothia*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Wolinella* [6].

Наряду с бактериями, в состав здорового микробиома ротовой полости человека входят грибы. Хотя микотическая нагрузка у здоровых людей в норме оценивается на несколько порядков ниже, чем бактериальная, однако детальное изучение синергических взаимоотношений грибов с бактериями подтверждает важную роль представителей родов *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Aspergillus* и ряда других грибов при формировании микробной биоплёнки пародонта и зубов [7].

Роль разных видов пародонтопатогенных бактерий в развитии воспалительного процесса при пародонтите неоднозначна и является предметом многочисленных дискуссий [4, 8]. В последние годы с учётом многофакторной природы пародонтита для прогноза течения заболевания стали применять исследование микробиома зубодесневой борозды с обнаружением в её составе бактерий пародонтопатогенной группы различной степени патогенетической значимости [9, 10].

В научной литературе получило широкое распространение понятие о ключевом пародонтопатогене, роль которого отводится пигментообразующим облигатно-анаэробным бактериям вида *Porphyromonas gingivalis* из-за их способности модифицировать нормальный состав микробиоты полости рта до более патогенного, что ускоряет потерю костной массы альвеолярной кости и развитие системных эффектов, в том числе, на сосудистое русло. Для *P. gingivalis* характерно использование механизмов, позволяющих ему ослаблять или обманывать иммунную систему хозяина, поскольку пародонтопатоген обладает очень широким спектром факторов вирулентности, включая протеолитические ферменты (гингипаины), капсулу, эндотоксины, фимбрии, нуклеозиддифосфатазину, церамиды [10–12].

С внедрением технологий метагеномного анализа появился ещё один претендент на роль ключевого пародонтопатогена – *Filifactor alocis* – бактерия, трудно культивируемая на искусственных питательных средах, встречающаяся почти исключительно при наличии воспаления тканей пародонта [13, 14], обладающая устойчивостью к оксидативному стрессу и уникальным набором свойств, обеспечивающих их чрезвычайно выраженную способность к формированию микробных ассоциаций с *P. gingivalis* и рядом других пародонтопатогенов [15, 16].

В соответствии с международной классификацией заболеваний пародонта (2017 г.), поддержанной ВОЗ, принято выделять три степени прогрессирования: А – медленное прогрессирование – нет потери прикрепления десны в течение 5 лет, В – средняя скорость прогрессирования – за 5 лет потеря прикрепления менее 2 мм, С – быстрая скорость прогрессирования – потеря прикрепления больше 2 мм за 5 лет [17]. Такой клинический подход позволяет констатировать степень тяжести заболеваний пародонта, но не прогнозировать его прогрессирование.

Перспективным с этой точки зрения является молекулярно-генетический метод, позволяющий выявить фрагменты геномов нескольких видов пародонтопатогенов с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Подобные молекулярно-генетические методы лабораторной диагностики стали применяться в различных странах мира с конца 1990-х годов [18 – 21]. В 2015 г. появилась публикация, в которой в состав большой группы пародонтопатогенов, тестируемых методом моноплексной, но не мультиплексной ПЦР-РВ, входили *P. gingivalis* и *F. alocis* [23]. Принятые в пародонтологии подходы, основывающиеся почти исключительно на клинической оценке стоматологического статуса, они не позволяют выявить начало воспаления и выделить тех пациентов, которые предрасположены к прогрессированию заболевания в дальнейшем, а оценки результатов молекулярной диагностики с учётом новой классификации заболеваний пародонта не проводилось [16, 17].

В связи, с вышеизложенным, мы предложили использовать индикацию ДНК одновременно двух ключевых пародонтопатогенных бактерий *F. alocis* и *P. gingivalis* с помощью мультиплексной ПЦР, праймеры и зонды которых имеют отличия от прототипа структуры, что сокращает время исследований и трудозатраты при идентификации бактерий [22].

Целью исследования служила апробация способа генодиагностики заболеваний пародонта методом мультиплексной ПЦР путём идентификации в поддесневой биоплёнке одновременно двух ключевых пародонтопатогенов *Filifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis* и оценка возможности прогностического использования данного набора для оценки прогрессирования заболевания.

Материал и методы. В исследование включены 46 человек, из которых сформированы 3 группы сравнения. 1-я (основная) группа включала 15 пациентов, у которых хронический пародонтит имел среднюю скорость прогрессирования (степень В); во 2-ю группу исследования входили 15 человек с хроническим пародонтитом быстрой скорости прогрессирования (степень С); 3-я группа служила контролем и содержала 16 условно здоровых лиц, не страдающих хроническим пародонтитом (без признаков воспалительных изменений в тканях десны). Из состава групп

исследования полностью исключены курящие пациенты, поскольку курение способствует включению *F. alocis* в состав микробиома слизистой оболочки полости рта даже у субъектов без признаков заболеваний пародонта [24, 25].

Пациенты первых двух групп наблюдались сотрудниками кафедры пародонтологии и кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А. И. Евдокимова Минздрава России на протяжении не менее 5 лет. Контрольная группа здоровых лиц формировалась из контингента, обращавшегося к стоматологам по поводу санации полости рта. Состав исследуемых групп и план их обследования утверждены межвузовским этическим комитетом, все участники исследования подписали информированное согласие на обработку их персональных данных.

Группы исследования содержали примерно равное число мужчин и женщин в возрасте 45-65 лет. Стоматологический статус больных хроническим пародонтитом оценивался в соответствии с Международной классификацией заболеваний пародонта 2017 г. Критериями разграничения средней и быстрой (В и С) степени прогрессирования заболевания при генерализованном характере поражения служили: В – потеря прикрепления десны (индекс CAL) за 5 лет менее 2 мм, С – потеря прикрепления за 5 лет 2 и более мм [17, 26].

Взятие биологического материала проводили утром натощак до использования зубной щётки и других средств гигиены. В области зубодесневой борозды стоматологическими аппликаторами № 30 отбирали образцы биоплёнок в стерильные пластиковые пробирки типа Eppendorf, содержащие 0,5 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. ДНК выделяли методом ускоренной рибоподготовки с помощью коммерческого набора реагентов «Реалекс» (ООО «НПФ «Генлаб», Москва) согласно инструкции.

Для сочетанной идентификации *F. alocis* и *P. gingivalis* методом мультиплексной ПЦР на основе последовательностей, находящихся в составе генов 16S рРНК соответствующих бактерий и входящих в базу данных генетических последовательностей GenBank [27], синтезированы олигонуклеотидные праймеры, получены флуоресцентно

меченные зонды для обнаружения в биологическом материале бактерий видов *F. alocis* и *P. gingivalis* и сформирован набор реагентов для воспроизведения мультиплексной ПЦР [22]. Характеристики олигонуклеотидных праймеров и зондов, входящих в состав набора реагентов мультиплексной ПЦР для описанного способа генодиагностики заболеваний пародонта, представлены в таблице.

Анализ и интерпретацию результатов проводили с помощью программного обеспечения прибора CFX 96 («Bio-Rad», США). Детекцию осуществляли по каналам ROX, HEX, Cy5. По каналу ROX идентифицировали образцы, содержащие ДНК *P. gingivalis*, каналу HEX – ДНК *F. alocis* при наличии положительной реакции по каналу Cy5 (внутренний положительный контроль биологического материала – ДНК человека).

Статистическая обработка результатов проводилась на основе пакета статистических программ SPSS, версия 23, с использованием приёмов описательной, сравнительной статистики и путём построения Рос-кривых.

Результаты. Частота встречаемости *F. alocis*, *P. gingivalis* и ассоциации этих бактерий в группах больных хроническим пародонтитом степеней В и С и в контроле представлена на рис. 1. Частота обнаружения *F. alocis* при хроническом пародонтите степени В составила 87%, в то время как у здоровых людей с интактным пародонтом (десны без признаков воспаления и потери прикрепления) эти бактерии не регистрировали. При хроническом пародонтите степени С наличие *F. alocis* было отмечено во всех случаях (100%).

Частота встречаемости *P. gingivalis* при хроническом пародонтите степени В составляла 40% и была достоверно (в 2,2 раза) ниже, чем *F. alocis*. При хроническом пародонтите степени С частота регистрации *P. gingivalis* оказалась максимальной – на уровне 93% и статистически достоверно не отличалась от таковой для *F. alocis*. У здоровых людей с интактным пародонтом *P. gingivalis* обнаруживали в 19% случаев, что статистически достоверно ниже, чем в группах пациентов с хроническим пародонтитом.

Одновременное наличие *P. gingivalis* и *F. alocis* при хроническом пародонтите степени В отмечено в 20% случаев, то есть достоверно реже (соответственно, в 4,4 и в 2 раза), чем для каждого из тестируемых пародонтопатогенов в отдельности, хотя у больных хроническим пародонтитом степени С частота встречаемости обоих пародонтопатогенов при использовании мультиплексной ПЦР оставалась на том же высоком уровне – в 93% случаев. Не отмечено одновременного наличия обоих пародонтопатогенов у здоровых людей.

Апробация оригинальных тест-систем для идентификации *P. gingivalis* и *F. alocis* методом мультиплексной ПЦР показала возможность их использования для дифференцированного подхода к диагностике хронического пародонтита степеней В и С.

Для подтверждения диагностического значения теста в каждом конкретном случае выполнялось построение ROC-кривых, отражающих состояние линейной регрессии между чувствительностью и специфичностью теста в группах 1 и 2 пациентов при сравнении с контролем. Результаты построения ROC-кривых с определением критерия их количественной оценки в виде площади под ROC-кривой – AUC – представлены на рис. 2, а, б.

Диагностическое значение определения *F. alocis* для

Набор видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и зондов для одновременной идентификации в биоматериале *Filifactor alocis* и *Porphyromonas gingivalis*

№	Название	5'-3' последовательность	Длина п.н.	pmol/реакцию
Filifactor alocis (Fa-RT), 126 п.н.				
1	FaF1	gca ggt ggt tta aca agt tag tgg	24	6
2	FaR1	ata tct acg cat ttc acc gct aca	24	6
3	FaZ1	FAM-gag tgc agg aga gga aag tgg aat tcc t-BHQ1	28	3
Porphyromonas gingivalis (PGI-RT), 118 п.н.				
4	P.g.f2	agb mam tac cga tgt ggg ttg cgc	24	10
5	P.g.r2	ggt gaa aac cgt ctt ccc ttc gg	23	10
6	P.g.z	ROX-tcg tta tgg cac tta agc cga ca-BHQ2	23	10
Внутренний контроль на ДНК человека (ВКЧ-RT), 87 п.н.				
7	112.f	aat gtg taa ctc gac cct gca cc	23	10
8	112.g	ctg gga cct ctt cca gga agt ctt	24	10
9	112.z	CY5-gct cac tct gtt cag cag tga aac tct-BHQ2	27	5

оценки степени прогрессирования хронического пародонтита с помощью мультиплексной ПЦР по данным построения ROC-кривой, в отличие от *P. gingivalis*, максимально высокое (AUC 0,9-1,0) независимо от быстроты прогрессирования хронического пародонтита.

Построение ROC-кривых для определения диагностической значимости обнаружения *P. gingivalis* в биологическом материале из зубодесневой борозды показало, что у больных хроническим пародонтитом степени В при сравнении с контролем величина AUC составляла 0,6, то есть не соответствовала высокой диагностической значимости. При хроническом пародонтите степени С AUC в результате построения ROC-кривой по величине (0,873) соответствовала высокой диагностической значимости.

Построение ROC-кривых для ассоциации *P. gingivalis* и *F. alocis* при хроническом пародонтите степени В в сравнении с контролем не подтвердило высокой диагностической значимости (AUC=0,6), при хроническом пародонтите степени С AUC не только оценена как очень

высокая (0,932), но и в условиях наших исследований была максимальной.

Обсуждение. В соответствии с целью исследования по апробации оригинального способа генодиагностики заболеваний пародонта методом мультиплексной ПЦР путём идентификации в поддесневой биоплёнке ключевых пародонтопатогенов *F. alocis* и *P. gingivalis*, характеризующих степень прогрессирования пародонтита, особого обсуждения заслуживает целесообразность выполнения этих исследований и возможность использования для этого мультиплексной ПЦР тест-системы.

Этиологическая роль *P. gingivalis* как ключевого пародонтопатогена, способного модифицировать нормальный состав микробиоты полости рта до более патогенного и участвовать в развитии системных эффектов заболеваний пародонта не подвергается сомнению [6, 9–11]. Что касается этиологического значения *F. alocis*, то будучи трудно распознаваемой и трудно культивируемой бактерией, которая, по всей видимости, может быть причислена к ключевым пародонтопатогенам, то до конца её значение в этом аспекте продолжает оставаться открытым [10, 16, 24, 25].

Известно, что *F. alocis* демонстрирует сильную корреляцию с заболеваниями пародонта и не обнаруживается у здоровых лиц [28]. Благодаря выраженной протеазной активности и способности к участию в метаболизме аргинина *F. alocis* не только колонизирует пародонтальные ткани, но и непосредственно влияет на формирование сообщества пародонтопатогенных микроорганизмов [28]. Наиболее выраженный синергизм проявляется при взаимодействии *F. alocis* с «ключевым» пародонтопатогеном – *P. gingivalis*, ассоциация этих возбудителей не только взаимно повышает инвазивные свойства, но и значительно усиливает процессы формирования биоплёнки в целом [28, 29], что и побудило нас к созданию праймеров и зондов для мультиплексной ПЦР на основе ассоциации данных пародонтопатогенов.

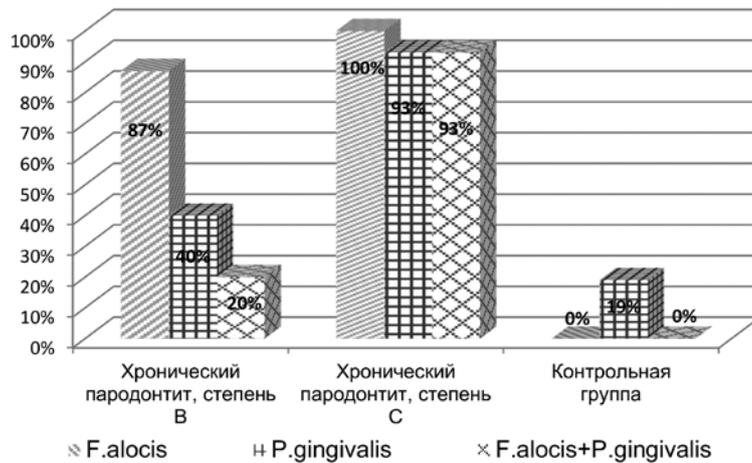


Рис. 1. Частота встречаемости *F. alocis*, *P. gingivalis* и их ассоциации в группах больных хроническим пародонтитом и в контроле.

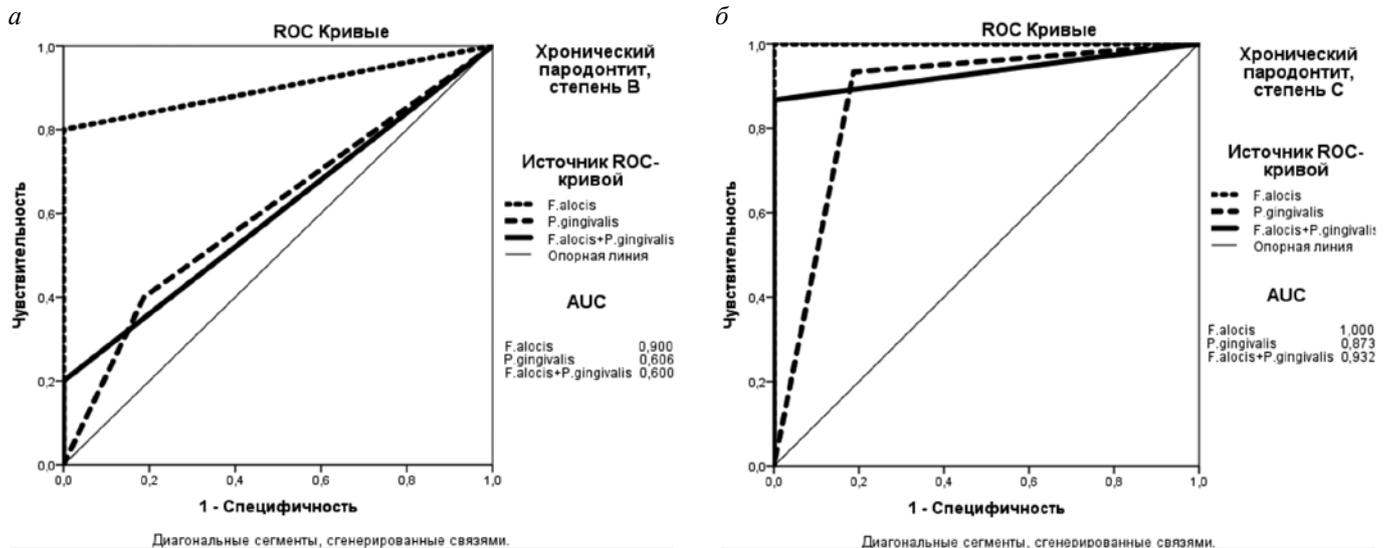


Рис. 2. ROC-кривые диагностической значимости результатов мультиплексной ПЦР в величинах площади под кривой (AUC) по идентификации *F. alocis*, *P. gingivalis* и ассоциации этих бактерий в группе больных хроническим пародонтитом степеней В (а) и С (б).

F. alocis является новым членом микробиома пародонта, и в настоящее время предлагается использовать его в качестве диагностического индикатора заболеваний пародонта [30]. Из-за отсутствия генетических инструментов для изучения *F. alocis*, мало что известно о его вирулентности.

Предлагаемая нами тест-система для генодиагностики заболеваний пародонта и подтверждение её диагностической и прогностической значимости открывает новые перспективы для исследования этой категории патологических состояний с выраженными системными эффектами.

Заключение. Одним из актуальных направлений пародонтологии и связанных с ней системных заболеваний, является исследование этиологической роли ассоциации пародонтопатогенных бактерий *F. alocis* и *P. gingivalis*. Расшифровка молекулярно-генетических механизмов взаимного влияния этих бактерий, оценка патогенетического и диагностического значения формирования названной ассоциации требуют специального методического обеспечения. Предложена тест-система, предназначенная для идентификации *F. alocis* и *P. gingivalis* методом мультиплексной ПЦР, показана её диагностическая и прогностическая эффективность при хроническом пародонтите различной степени тяжести в соответствии с международной классификацией заболеваний пародонта (2018 г.).

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-4, 6, 7, 9, 11, 13-15, 17-21, 23-30 см. REFERENCES)

1. Кузьмина Э.М., Янушевич О.О., Кузьмина И.Н. Стоматологическая заболеваемость населения России. Эпидемиологическое стоматологическое обследование. М.: МГМСУ; 2019.
5. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алёшкин В.А. Состояние и тенденция развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(80):61-5.
8. Царёв В.Н., Николаева Е.Н., Ипполитов Е.В. Пародонтопатогенные бактерии как основные факторы возникновения и развития пародонтита. *Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии*. 2017; (5):101-12. DOI:10.36233/0372-9311-2017-5-101-112.
10. Балмасова И.П., Царёв В.Н., Янушевич О.О., Маев И.В., Мкртумян А.М., Арутюнов С.Д. Микроэкология пародонта. Взаимосвязь локальных и системных эффектов. М.: Практическая медицина, 2021. ISBN 978-5-98811-665-3.
12. Локтионов А.Л., Конопля А.И., Лунев М.А., Караулов А.В. Иммунные и окислительные нарушения в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта. *Иммунология*. 2015; 36 (5): 319-28.
16. Балмасова И.П., Царёв В.Н., Арутюнов С.Д., Бабаев Э.А. *Filifactor alocis* и его роль в этиологии хронического пародонтита. *Стоматология*. 2020; 99 (3): 78-82.
22. Царёв В.Н., Шеремет О.К., Николаева Е.Н., Воронцова Н.И., Янушевич О.О., Балмасова И.П. и др. Способ оценки прогрессирования хронического пародонтита и набор реагентов для его осуществления. Патент РФ № 2777783 C1; 2022.

REFERENCES

1. Kuz'mina E.M., Yanushevich O.O., Kuz'mina I.N. Dental morbidity of the Russian population. Epidemiological dental examination. Moscow: Moskovskiy gosugarstvennyi mediko-stomatologicheskii universitet; 2019. (in Russian)
2. Kassebaum N.J., Bernabé E., Dahiya M., Bhandari B., Murray C.J., Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J. Dent. Res.* 2014; 93(11):1045-53. DOI:10.1177/0022034514552491.
3. Kōnōnen E., Gursøy M., Gursøy U.K. Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *J. Clin. Med.* 2019; 8(8):1135. Published 2019 Jul 31. DOI:10.3390/jcm8081135.
4. Tonetti M.S., Jepsen S., Jin L., Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: a call for global action. *J. Clin. Periodontol.* 2017; 44 (5): 456-62.
5. Dyatlov I. A., Mironov A. Yu., Shepelin A. P., Alyoshkin V. A. The state and trends of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federa-

- tion and the problem of import substitution. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2015; 60(8):61-5. (in Russian)
6. Rafiei M., Kiani F., Sayehmiri K., Sayehmiri F., Tavirani M., Dousti M. et al. Prevalence of anaerobic bacteria (*P. gingivalis*) as major microbial agent in the incidence periodontal diseases by meta-analysis. *J. Dent. (Shiraz)*. 2018; 19 (3): 232-42.
7. Koo H., Andes D.R., Krysan D.J. Candida-streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS Pathog.* 2018; 14: e1007342. DOI:10.1371/journal.ppat.1007342.
8. Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Ippolitov E.V. Periodontopathogenic bacteria of the main factors of emergence and development of periodontitis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, immunobiologii*. 2017; (5):101-12. DOI:10.36233/0372-9311-2017-5-101-112. (in Russian)
9. Bui F.Q., Almeida-da-Silva C.L.C., Huynh B., Trinh A., Liu J., Woodward J. et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *J. Biomed. Sci.* 2019; 42 (1): 27-35.
10. Балмасова И.П., Tsarev V.N., Yanushevich O.O., Mayev I.V., Mkrtyunyan A.M., Arutyunov S.D. Microecology of periodontal disease. The relationship of local and systemic effects. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2021. ISBN 978-5-98811-665-3. (in Russian)
11. Cekici A., Kantarci A., Hasturk H., Van Dyke T.E. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease // *J Periodontol* 2000. 2014; 64 (1): 57-80.
12. Loktionov A.L., Konoplya A.I., Lunev M.A., Karaulov A.V. Immune and oxidant disorders in the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. *Immunologiya*. 2015; 36 (5): 319-28. (in Russian)
13. Hiranmayi K.V., Sirisha K., Ramoji Rao M.V., Sudhakar P. Novel pathogens in periodontal microbiology. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2017; 9 (3): 155-63.
14. Moffatt C.E., Whitmore S.E., Griffen A.L., Leys E.J., Lamont R.J. *Filifactor alocis* interactions with gingival epithelial cells. *J. Mol. Oral Microbiol.* 2011; 26 (6): 365-73.
15. Wang Q., Wright C.J., Dingming H., Uriarte S.M., Lamont R.J. Oral community interactions of *Filifactor alocis* in vitro. *PLoS One*. 2013; 8 (10): e76271.
16. Балмасова И.П., Tsarev V.N., Arutyunov S.D., Babaev E.A. *Filifactor alocis* and its role in the etiology of chronic periodontitis. *Stomatologiya*. 2020; 99 (3): 78-82. (in Russian)
17. Caton J.G., Armitage G., Berglundh T., Chapple I.L.C., Jepsen S., Kornman K.S. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J. Periodontol.* 2018; 89 (Suppl. 1): 1-8.
18. Xiao S., Zhang T., Liu X., Liu Y. Multiple PCR fast detecting method for oral cavity pathogen. Patent CN101270381A, China; 2008
19. Gokyu M., Hamaide E., Ikeda Y., Izumi Y., Kobayashi H., Matsuura T., Morita I., Nagao M., Takahashi Y. Oligonucleotide set for detecting periodontal disease bacteria, and detection method of periodontal disease bacteria. Patent JP2016192950A, Japan; 2016
20. Guillot E., Menard C., Mouton C. Detection of periodontal pathogens including *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Patent CA2228836A1, Canada; 1999
21. Shin E.S., Song K.H. Primers and probes for detecting bacteria related to periodontal disease and method of detecting the same and use thereof. Patent KR20150129484A, Korea; 2015
22. Tsarev V.N., Sheremet O.K., Nikolaeva E.N., Vorontsova N.I., Yanushevich O.O., Балмасова И.П. et al. Method for assessing the progression of chronic periodontitis and a set of reagents for its implementation. Patent RF № 2777783 C1; 2022. (in Russian)
23. Al-Ahimi A., Taiyeb-Ali T., Jaafar N., Al-hebshi N.N. Qat Chewing and Periodontal Pathogens in Health and Disease: Further Evidence for a Prebiotic-Like Effect. *J. Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 291305.
24. Aruni A.W., Chioma O., Fletcher H.M. *Filifactor alocis*: The newly discovered kid on the block with special talents. *J. Dent. Res.* 2014; 93 (8): 725-32.
25. Aruni A.W., Mishra A., Dou Y., Chioma O., Hamilton B.N., Fletcher H.M. *Filifactor alocis* – a new emerging periodontal pathogen. *J. Microbes Infect.* 2015; 17 (7): 517-30.
26. Graetz C., Mann L., Krois J., Salzer S., Kahl M., Springer C. et al. Comparison of periodontitis patients' classification in the 2018 versus 1999 classification. *J. Clin. Periodontol.* 2019; 46(9): 908-17.
27. Benson D.A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D.J., Ostell J. et al. GenBank. *J. Nucleic Acids Research*. 2013; 41 (D1): D36-D42.
28. Schulz S., Porsch M., Grosse I., Hoffmann K., Schaller H.G., Reichert S. 2019. Comparison of the oral microbiome of patients with generalized aggressive periodontitis and periodontitis-free subjects. *Arch. Oral Biol.* 2019; 99:169-76.
29. Aruni A.W., Roy F., Fletcher H.M. *Filifactor alocis* has virulence attributes that can enhance its persistence under oxidative stress conditions and mediate invasion of epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Infect. Immun.* 2011; 79 (10): 3872-86.
30. Aja E., Mishra A., Dou H., Fletcher H.M. Role of the *Filifactor alocis* hypothetical protein FA519 in oxidative stress resistance. *J. Microbiol. Spectr.* 2021; 9 (3): e0121221.