

ĐỊNH LƯỢNG VI KHUẨN *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* TRONG VIÊM NHA CHU BẰNG KỸ THUẬT REALTIME PCR

Nguyễn Thị Mai Phương¹, Trần Văn Khánh¹, Nguyễn Trọng Tuệ¹,
Trần Thị Oanh³, Hoàng Đạo Bảo Trâm², Nguyễn Thị Hà¹, Tạ Thành Văn¹

¹Trường Đại học Y Hà Nội,

²Trường Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh, ³Cục Khoa học, Công nghệ và Đào tạo, Bộ Y tế

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá sự thay đổi số lượng vi khuẩn *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) trong khe nướu của bệnh nhân viêm nha chu thể mạn tính và thể tấn công. Kỹ thuật realtime PCR được ứng dụng để định lượng vi khuẩn *P. gingivalis* trong dịch khe nướu tại vị trí lành và vị trí bị bệnh trên 5 bệnh nhân viêm nha chu thể mạn tính, 5 bệnh nhân viêm nha chu thể tấn công, trong dịch khe nướu trên nhóm người bình thường (nhóm chứng). Kết quả cho thấy, trên nhóm viêm nha chu mạn tính và nhóm viêm nha chu tấn công, số lượng *P. gingivalis* ở vị trí bệnh trong dịch khe nướu lần lượt là $25,10 \pm 4,68$ chu kỳ ngưỡng (Ct) và $22,89 \pm 4,63$ Ct, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với ở nhóm chứng là $33,93 \pm 3,17$ Ct và $34,38 \pm 2,96$ Ct ($p < 0,05$ và $p < 0,01$). *P. gingivalis* là vi khuẩn thường gặp trong viêm nha chu ở thể mạn tính và thể tấn công (100%), mặc dù có mặt khá phổ biến trong dịch khe nướu ở người bình thường, số lượng *P. gingivalis* trong dịch khe nướu ở nhóm viêm nha chu cao hơn có ý nghĩa so với ở nhóm chứng ($p < 0,05$).

Từ khóa: qPCR, *P. gingivalis*, viêm nha chu mạn tính, viêm nha chu tấn công

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm nha chu là một bệnh nhiễm khuẩn phá hủy các mô nâng đỡ răng. Bệnh diễn tiến dai dẳng, kéo dài, có khi để lại hậu quả nặng nề, răng lung lay hàng loạt phải nhổ bỏ làm mất chức năng ăn nhai, ảnh hưởng đến sức khỏe và thẩm mỹ. Viêm nha chu khá phổ biến, tuy nhiên tỉ lệ và mức độ bệnh thay đổi tùy theo mỗi nơi. Tại Mỹ, tỉ lệ này là 3 - 7,2% [1]. Ở Việt Nam, theo nghiên cứu của Trần Văn Trường năm 2000, 36,5% nam và 27,5% nữ có túi nha chu [2]. Viêm nha chu (VNC) có rất nhiều dạng khác nhau theo phân loại của Hiệp hội nha chu Mỹ [3] nhưng có 2 loại hay gặp trên lâm sàng ở Việt Nam là viêm nha chu tấn

công và viêm nha chu mạn tính.

Vi khuẩn trong viêm nha chu đa dạng. Mặc dù hệ vi khuẩn vùng miệng có hơn 700 loài, nhưng chỉ có một số loài được cho là tác nhân thường gặp gây viêm nha chu: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*. Đặc biệt, trực khuẩn kỵ khí *P. gingivalis* là một trong những vi khuẩn gây bệnh viêm nha chu quan trọng nhất [3, 4].

Có nhiều phương pháp phát hiện và định danh vi khuẩn như phương pháp nuôi cấy, phương pháp miễn dịch, lai phân tử [3]. Với sự phát triển của công nghệ sinh học kỹ thuật real - time PCR (qPCR) được ứng dụng trong chẩn đoán vi khuẩn gây bệnh nha chu. Đây là một kỹ thuật có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, cho phép xác định nhanh và chính xác DNA của vi khuẩn trong vài giờ. Kỹ thuật qPCR còn giúp định lượng vi khuẩn [5].

Địa chỉ liên hệ: Trần Văn Khánh, bộ môn Bệnh học phân tử, Trường Đại học Y Hà Nội

Email: vankhanh73md@yahoo.com

Ngày nhận: 25/4/2014

Ngày được chấp thuận: 26/06/2014

Thành phần các vi khuẩn trong viêm nha chu mạn tính, viêm nha chu tấn công khác nhau [3,6]. Một số những khác biệt vi khuẩn này có ý nghĩa lâm sàng. Việc xác định và định lượng chính xác các vi khuẩn rất cần thiết trong chẩn đoán nguyên nhân, điều trị, đánh giá đáp ứng điều trị và theo dõi diễn tiến bệnh viêm nha chu. Sự gia tăng số lượng vi khuẩn có thể là yếu tố chỉ ra tình trạng viêm nha chu đang tiến triển. Đề tài được thực hiện với mục tiêu Đánh giá sự thay đổi số lượng vi khuẩn *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) trong khe nướu của bệnh nhân viêm nha chu thể mạn tính và thể tấn công.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

- **Nhóm nghiên cứu:** 10 bệnh nhân viêm nha chu, bao gồm 5 bệnh nhân viêm nha chu mạn tính và 5 bệnh nhân viêm nha chu tấn công

Nhóm chứng (người bình thường)

- 5 người khỏe mạnh, cùng độ tuổi với nhóm bệnh nhân viêm nha chu mạn tính
- 5 người khỏe mạnh, cùng độ tuổi với nhóm bệnh nhân viêm nha chu tấn công

Tiêu chuẩn chọn mẫu nghiên cứu và mẫu chứng

- Tuổi: 18 - 60.
- Còn tối thiểu 20 răng.
- Không có thói quen hút thuốc lá. Không có tiền sử bệnh tim mạch, đái tháo đường, bệnh nội tiết, bệnh chuyển hóa.
- Không sử dụng thuốc kháng sinh, kháng viêm, thuốc tránh thai trong vòng 2 tuần trước khi tham gia nghiên cứu.
- Mẫu nghiên cứu được chẩn đoán xác định viêm nha chu dựa trên lâm sàng và X

quang, không điều trị viêm nha chu trong vòng 3 tháng trước khi tham gia nghiên cứu. Với mẫu chứng: Được loại trừ viêm nha chu trên lâm sàng.

- Tự nguyện đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ

- Đang có áp xe nha chu
- Đang có viêm hay áp xe quanh thân răng cối lớn thứ ba

Bệnh nhân mắc bệnh tâm thần, HIV, bệnh toàn thân mạn tính

- Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu hoặc không lấy được bệnh phẩm

2. Thiết kế nghiên cứu: nghiên cứu cắt ngang, mô tả và phân tích, có nhóm chứng

3. Các bước tiến hành: (1) Hồi bệnh sử và khám lâm sàng, chụp phim toàn cảnh. (2) Lâm bệnh án, đánh giá các chỉ số mảng bám răng (PI), chỉ số nướu (GI), độ sâu túi nha chu (PPD), độ mất bám dính lâm sàng (CAL) (3) Chẩn đoán viêm nha chu, và phân loại viêm nha chu: viêm nha chu mạn tính, viêm nha chu tấn công. (4) Lấy bệnh phẩm dịch khe nướu và mảng bám dưới nướu, ở 3 vị trí (răng cửa trên, răng cửa dưới, răng cối lớn thứ nhất hàm trên).

4. Phương pháp thu thập dữ liệu

4.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán viêm nha chu: dựa vào hai yếu tố chính là có túi nha chu > 3 mm và giảm chiều cao của đỉnh xương ổ (trên phim X quang).

4.2. Tiêu chuẩn phân loại viêm nha chu: viêm nha chu mạn tính với viêm nha chu tấn công dựa vào bệnh sử, lâm sàng và X quang

Bảng 1. Tiêu chuẩn chẩn đoán viêm nha chu mạn tính và viêm nha chu tấn công [3]

Viêm nha chu mạn tính	Viêm nha chu tấn công
- Trên 35 tuổi, nhất là trên 40 tuổi.	- Dưới 35 tuổi, nhất là 20 - 30 tuổi
- Bệnh tiến triển chậm hay vừa, có thể có những đợt tiến triển nhanh	- Mất bám dính và tiêu xương nhanh, rõ

4.3. Chỉ số mảng bám (PI) [3]: chỉ số PI đánh giá độ dày mảng bám trên mặt răng theo Silness & Loe (1964) Cách đánh giá: mặt răng chia thành 4 vùng: mặt ngoài xa, mặt ngoài, mặt ngoài gần và mặt trong; thổi khô các răng trước khi đánh giá chỉ số mảng bám

Bảng 2. Tiêu chuẩn chỉ số mảng bám (PI)

Điểm số	Tiêu chuẩn chỉ số mảng bám (PI) [3]
0	Không có mảng bám.
1	Mảng bám không thấy được bằng mắt thường, nhưng thấy được khi dùng cây đo túi cao trên bề mặt răng từ khe nướu
2	Mảng bám mỏng hay trung bình phủ mặt răng, thấy bằng mắt thường
3	Mảng bám dày, mảnh vụn thức ăn nhiều trong túi nướu

Cho điểm số từ 0 đến 3 ở bốn vùng của một răng theo bảng 2

Điểm PI trung bình ở mỗi răng bằng tổng điểm PI của bốn vùng răng chia cho 4

4.4. Chỉ số nướu (GI) [3]: Đánh giá mức độ viêm nướu theo chỉ số GI của Silness & Loe 1967

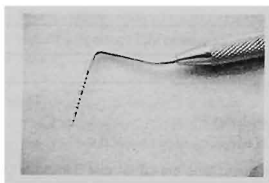
Cách đánh giá: khám mô nướu ở 4 vùng: gai nướu ngoài xa, nướu mặt ngoài, gai nướu ngoài gần và nướu mặt trong (không đánh giá ở răng 8) Cho điểm số từ 0 đến 3 theo bảng 3 và điểm GI trung bình ở mỗi răng bằng tổng điểm GI bốn vùng răng chia cho 4

Bảng 3. Tiêu chuẩn chỉ số nướu (GI)[3]

Điểm số	Tiêu chuẩn chỉ số nướu (GI)
0	Nướu bình thường
1	Nướu đổi màu, không chảy máu khi thăm dò
2	Nướu sưng, đỏ, chảy máu khi thăm dò
3	Nướu sưng đỏ, lở loét, dễ chảy máu tự phát

4.5. Độ sâu túi (PPD) [3]: Là khoảng cách từ đáy túi đến nướu rời. Đo độ sâu của túi nha chu bằng cây đo túi của William (hình 1). Đo khoảng cách từ đáy túi đến bờ nướu rời tại 4 vị trí trên mỗi răng: mặt ngoài xa, mặt ngoài, mặt ngoài gần, mặt trong. Cách đo túi: Đặt cây đo túi William có chia vạch millimet tại 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10 mm, với áp lực nhẹ nhàng đưa vào khe nướu sao cho song song với trục dọc của răng, di chuyển cây đo túi dọc theo chu vi mỗi mặt răng, ghi nhận độ sâu túi tại bốn vị trí.

Kết quả: Độ sâu túi được đọc ở mức vạch trên cây đo túi ngang mức đỉnh nướu rời. Độ sâu túi trung bình của mỗi răng bằng tổng số độ sâu túi của bốn vị trí quanh răng chia cho 4.



Hình 1. Cây đo túi William

4.6. Độ mất bám dính lâm sàng (CAL) [3]: là khoảng cách từ đáy túi đến đường nối men - xê măng. Cách đánh giá: Dùng cây đo túi đo từ đáy túi đến đường nối men - xê măng của răng tại 4 vị trí trên mỗi răng: mặt ngoài xa, mặt ngoài, mặt ngoài gần, mặt trong.



Hình 2. Cách lấy mẫu bệnh phẩm dịch khe nướu

xa, mặt ngoài, mặt ngoài gần, mặt trong.

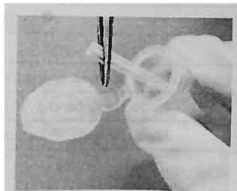
Kết quả: CAL được đọc ở mức vạch trên cây đo túi tại đường nối men-xê măng. CAL trung bình ở mỗi răng bằng tổng CAL tại 4 vị trí quanh răng chia cho 4.

4.7. Phương pháp lấy bệnh phẩm: các vật liệu (gòn cuộn, côn giấy số 30) và dụng cụ đều được khử khuẩn. Bệnh phẩm gồm dịch khe nướu và mảng bám răng dưới nướu, được lấy tại 3 răng: răng 11 hoặc 21, răng 31 hoặc 41, răng 16 hoặc 26. Trong mỗi nhóm răng, chọn răng có túi sâu nhất. Ở mỗi răng, bệnh phẩm được lấy ở mặt răng có túi sâu nhất. Trên bệnh nhân viêm nha chu, răng 1 và răng 6 được lấy bệnh phẩm có thể là răng lành hoặc viêm nha chu. Vị trí lành: độ sâu túi nướu ≤ 3 mm, không chảy máu nướu khi thăm khám, không có sự mất bám dính, không tiêu xương ổ răng. Vị trí bệnh (viêm nha chu): có chảy máu nướu, độ sâu túi nha chu > 3 mm, tiêu xương ổ răng trên phim tia X.

- Lấy bệnh phẩm dịch khe nướu: sau khi lau sạch mảng bám trên nướu và thổi khô, đặt 5 cây côn giấy vô trùng vào đến đáy túi, để trong 10 giây, lấy côn giấy ra và cho vào lọ có nắp đậy (hình 2).

- Lấy mảng bám dưới nướu bằng cây nạo Gracy: phết mảng bám dưới nướu lên 5 cây côn giấy số 30, và cho các côn giấy vào lọ.

Mỗi một vị trí lấy mẫu bệnh phẩm sử dụng một bộ dụng cụ riêng để tránh sự lây nhiễm chéo.



5. Kỹ thuật realtime PCR [5]:

- Mỗi được thiết kế có đồ tương đồng trình tự 100% với DNA genome *rgpA* của *Porphyromonas gingivalis* (Pg).

- Cặp mồi và mẫu dò 16S rDNA đặc hiệu của hệ vi khuẩn miệng cũng được thiết kế. Cặp mồi phổ thông này khuếch đại đoạn gen 16S trong ribosom của các vi khuẩn. Đây là gen được bảo tồn cao trong quá trình tiến hóa của các loài vi khuẩn ở miệng

- Sử dụng Taqman probe cho phản ứng realtime PCR. Đầu dò Taqman probe được gắn chất phát huỳnh quang ở đầu 5' và gắn chất hấp phụ huỳnh quang ở đầu 3'

- Phản ứng realtime PCR được tiến hành ở 2 nồng độ 25 pmol và 50 pmol để chọn nồng độ tối ưu

Thể tích của phản ứng là 50 µl gồm các thành phần PCR buffer, dNTP, Taq polymerase của của hãng QIAamp, dUTP và UNG/Uracil - N - Glycorase (hóa chất chống ngoại nhiễm) của Amersham, mồi và đầu dò đặc hiệu (hãng Invitrogen).

Chu trình nhiệt của phản ứng PCR như sau: Biến tính DNA ở 95°C trong 3 phút; 40 chu kỳ nhiệt gồm giai đoạn biến tính DNA ở 94°C trong 15 giây và giai đoạn vừa bắt cặp vừa kéo dài ở 60°C trong 1 phút.

Quy trình được thực hiện trên hệ thống Realtime PCR của hãng Eppendorf.

Cách tính lượng vi khuẩn Pg theo phương pháp so sánh với chu kỳ ngưỡng (Ct).

$$\text{Tỷ lệ } P. \text{ gingivalis} = \frac{\text{Ct của các vi khuẩn 16S rDNA}}{\text{Ct của Pg}}$$

Theo công thức trên, khi chu kỳ ngưỡng (Ct) phát hiện *P. gingivalis* càng giảm, tỷ lệ Pg càng tăng cho biết số lượng Pg trong bệnh phẩm càng nhiều

Pg âm tính khi đường biểu diễn realtime PCR thấp hơn đường nền.

Pg dương tính khi đường biểu diễn realtime PCR vượt cao hơn đường nền

Giá trị ngưỡng Ct là số chu kỳ mà ở đó đường nền cắt ngang đường biểu diễn khuếch đại. Giá trị này cho biết thông tin về số bản sao ban đầu

Tỷ lệ số lượng Pg trong tổng số các vi khuẩn trong bệnh phẩm.

Nghiên cứu sử dụng thuật toán thống kê áp dụng cho cỡ mẫu nhỏ (Mann - Whitney Wilcoxon test)

Đạo đức nghiên cứu: Nghiên cứu này được tiến hành theo các nguyên tắc về đạo đức trong y khoa. Bệnh nhân được giải thích

rõ về mục tiêu nghiên cứu, được tư vấn và điều trị như mọi bệnh nhân khác. Tiến hành khi được bệnh nhân đồng ý tham gia nghiên cứu. Các thông tin riêng của bệnh nhân được đảm bảo giữ bí mật. Các xét nghiệm qPCR định danh và định lượng vi khuẩn được hỗ trợ chi phí hoàn toàn. Kết quả xét nghiệm được dùng cho chẩn đoán và điều trị nha chu viêm cho bệnh nhân.

III. KẾT QUẢ

1. Viêm nha chu mạn tính

- Tuổi và giới tính. Nhóm viêm nha chu mạn tính và nhóm chứng có n = 5/1 nhóm (gồm 2 nữ và 3 nam), tuổi trung bình là 47 (± 6,1)

Tỷ lệ *P. gingivalis* dương tính ở nhóm viêm nha chu mạn tính 100%, ở nhóm chứng 75%, sự khác biệt giữa 2 nhóm không có ý nghĩa (p = 0,774).

Bảng 3. Đặc điểm lâm sàng và *P. gingivalis* trong viêm nha chu mạn tính

Lâm sàng - P.gingivalis	Viêm nha chu mạn tính		Nhóm chứng	p
	Vị trí lành	Vị trí bệnh		
PI	2,20 ± 0,84	2,60 ± 0,69	0,40 ± 0,51	0,000
	p = 0,344			
GI	1,04 ± 0,05	2,60 ± 0,84	0,13 ± 0,35	0,000
	p = 0,14			
PPD (mm)	1,70 ± 0,84	4,20 ± 1,30	1,13 ± 0,52	0,000
	p = 0,002			
CAL (mm)	1,50 ± 0,50	5,80 ± 1,69	1,07 ± 0,26	0,000
	p = 0,000			
Ct Pg ở dịch khe nướu	35,02 ± 2,89	25,10 ± 4,68	33,93 ± 3,17	0,000
	p = 0,001			
Ct Pg ở màng bám răng	30,69 ± 2,85	22,85 ± 3,28		
	p = 0,001			
Tỷ lệ Pg ở dịch khe nướu	0,53 ± 0,06	0,69 ± 0,14	0,64 ± 0,14	0,000
	p = 0,025			
Tỷ lệ Pg ở màng bám răng	0,50 ± 0,04	0,65 ± 0,10		
	p = 0,009			

Chu kỳ ngưỡng của Pg trong dịch khe nướu ở vị trí bệnh ($25,10 \pm 4,68$) của bệnh nhân viêm nha chu mạn tính thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với chu kỳ ngưỡng của Pg trong dịch khe nướu của nhóm chứng ($33,93 \pm 3,17$) với $p < 0,01$. Ở bệnh nhân viêm nha chu mạn tính, chu kỳ ngưỡng của Pg trong dịch khe nướu và ở màng bám răng tại vị trí bệnh thấp hơn có ý nghĩa so với tại vị trí lành, ($p < 0,01$).

2. Trong viêm nha chu tấn công

- Tuổi và giới tính: Nhóm viêm nha chu tấn công và nhóm chứng có $n = 5/1$ nhóm (gồm 2 nữ và 3 nam), tuổi trung bình $29,6 (\pm 1,68)$.

- Tỷ lệ *P. gingivalis* dương tính là 100% trong nhóm viêm nha chu tấn công và 70% trong nhóm chứng. Sự khác biệt giữa hai nhóm không có ý nghĩa thống kê, ($p = 0,146$).

Bảng 4. Đặc điểm lâm sàng và *P. gingivalis* trong viêm nha chu tấn công

Lâm sàng – <i>P.gingivalis</i>	Viêm nha chu tấn công		Nhóm chứng	p
	Vị trí lành	Vị trí bệnh		
PI	1,40 ± 0,90	1,50 ± 0,85	0,50 ± 0,23	0,000
	p = 0,836			
GI	1,20 ± 0,27	2,20 ± 0,42	0,10 ± 0,40	0,000
	p = 0,000			
PPD (mm)	1,60 ± 0,89	4,20 ± 1,03	1,30 ± 0,63	0,000
	p = 0,000			
CAL (mm)	1,50 ± 0,50	6,10 ± 1,28	1,10 ± 0,83	0,000
	p = 0,000			
Ct Pg ở dịch khe nướu	34,80 ± 1,84	22,89 ± 4,63	34,38 ± 2,96	0,000
	p = 0,001			
Ct Pg ở mảng bám răng	28,88 ± 5,81	22,99 ± 2,93		
	p = 0,020			
Tỷ lệ Pg ở dịch khe nướu	0,58 ± 0,10	0,71 ± 0,11	0,56 ± 0,14	0,011
	p = 0,035			
Tỷ lệ Pg ở mảng bám răng	0,61 ± 0,13	0,70 ± 0,10		
	p = 0,134			

Chu kỳ ngưỡng của *Pg* trong dịch khe nướu ở vị trí bệnh ($22,89 \pm 4,63$) thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với chu kỳ ngưỡng của *Pg* trong dịch khe nướu ở nhóm chứng ($34,38 \pm 2,96$) với $p < 0,05$. Ở bệnh nhân viêm nha chu tấn công, chu kỳ ngưỡng của *Pg* trong dịch khe nướu tại vị trí bệnh thấp hơn có ý nghĩa so với tại vị trí lành, ($p < 0,01$).

IV. BÀN LUẬN

P.gingivalis là loài vi khuẩn thường gặp nhất và với tỉ lệ cao nhất trong viêm nha chu như tỉ lệ 70,9% Ở Thái Lan, *P. gingivalis* chiếm 70,9% trong viêm nha chu [6]. *P. gingivalis* chiếm 84,2% trong viêm nha chu tấn công và 95,3% trong viêm nha chu mạn tính ở Nhật Bản [7]. Mặt khác, *P. gingivalis* liên quan

với viêm nha chu nặng [3], *P. gingivalis* thường được tìm thấy trong những vị trí phá hủy mô nha chu mạnh có túi sâu, trong khi tình huống mới gặp *A. actinomycetemcomitans* trong những túi sâu [3].

Nghiên cứu của Boutaga (2003) cho thấy kỹ thuật qPCR đã phát hiện *P. gingivalis* trong

bệnh viêm nha chu với độ nhạy 100%, độ đặc hiệu 94%, giá trị tiên đoán dương tính 94% và giá trị tiên đoán âm tính 100% [8]. Nghiên cứu khảo sát *P. gingivalis* trong nước bọt ở 7 bệnh nhân viêm nha chu bằng kỹ thuật qPCR, có 1 trường hợp không phát hiện được *P. gingivalis* [9]. Trong một phân tích tổng hợp 5 nghiên cứu, Atieh và cộng sự (2008) kết luận qPCR có độ chính xác cao hơn phương pháp nuôi cấy [10]. Đây là lý do chính nhóm tác giả của bài báo này quyết định khảo sát *P. gingivalis* trong viêm nha chu bằng kỹ thuật qPCR.

Về bộ môi gen *rgpA*, *16S rDNA* và mẫu dò Taqman: Áp dụng qPCR sử dụng hệ thống mẫu dò Taqman với 2 cặp mồi, kết quả cho thấy sự thành công của kỹ thuật qPCR đối với *P. gingivalis*. Cặp mồi khuếch đại gen *rgpA* đặc hiệu của *P. gingivalis* cho kết quả tỉ lệ cao *P. gingivalis* 100% trong viêm nha chu và 72,5% ở người bình thường. Sử dụng cặp mồi khuếch đại gen *16S rDNA* - đặc hiệu cho các vi khuẩn ở miệng để tính tỉ lệ *P. gingivalis* đã tìm thấy sự khác biệt rất có ý nghĩa về số lượng và tỉ lệ *P. gingivalis* trong viêm nha chu so với nhóm chứng ($p < 0,001$). qPCR thực sự là một phương pháp nhạy, chẩn đoán nhanh và chính xác vi khuẩn *P. gingivalis* trong viêm nha chu.

Về phương diện lâm sàng, phân tích tỉ lệ vi khuẩn trong hệ vi khuẩn là cần thiết để đánh giá kết quả điều trị. Lyons và cộng sự (2000) nêu lên tầm quan trọng của định lượng tương đối hơn là xác định số lượng tuyệt đối của một loài vi khuẩn riêng biệt trong một mẫu bệnh phẩm đa khuẩn [8]. Định lượng tương đối đơn giản hơn mà vẫn có giá trị đối với lâm sàng. Bởi vậy, qPCR được sử dụng để định lượng tương đối *P. gingivalis* trong viêm nha chu. Lượng vi khuẩn *Pg* trong mẫu bệnh phẩm được tính theo phương pháp so sánh với chu

kỳ ngưỡng (Ct) và công thức tính tỷ lệ *P. gingivalis* đã được trình bày ở phần đối tượng và phương pháp nghiên cứu. Do vậy, khi chu kỳ ngưỡng (Ct) phát hiện *P. gingivalis* càng giảm, tỉ lệ *Pg* càng tăng cho biết số lượng *P. gingivalis* trong bệnh phẩm càng nhiều.

Nghiên cứu này lựa chọn 5 bệnh nhân viêm nha chu mạn tính và 5 bệnh nhân viêm nha chu tấn công theo chẩn đoán và phân loại của Hiệp hội Nha chu Hoa Kỳ, đồng thời nghiên cứu cũng lựa chọn 2 nhóm chứng (người bình thường) với $n = 5/1$ nhóm cho 2 nhóm nghiên cứu trên và có sự tương đồng về giới, tuổi. Kết quả của nghiên cứu cho thấy: chu kỳ ngưỡng của *P. gingivalis* ở dịch khe nướu và ở mảng bám răng dưới nướu tại vị trí bệnh trong viêm nha chu mạn tính ($25,10 \pm 4,68$; $22,85 \pm 3,28$) và viêm nha chu tấn công ($22,89 \pm 4,63$, $22,99 \pm 2,93$) đều thấp hơn chu kỳ ngưỡng của *P. gingivalis* ở dịch khe nướu trong 2 nhóm đối chứng tương ứng ($33,93 \pm 3,17$, $34,38 \pm 2,96$). Tuy nhiên, sự khác biệt chu kỳ ngưỡng của *P. gingivalis* giữa các nhóm bệnh và các nhóm chứng là khác nhau, sự khác biệt giữa nhóm viêm nha chu mạn tính và nhóm chứng có $p < 0,05$ và sự khác biệt giữa nhóm viêm nha chu tấn công và nhóm chứng có $p < 0,001$. Điều này dẫn đến tỷ lệ *P. gingivalis* tại vị trí bệnh trong viêm nha chu mạn tính ($0,69 \pm 0,14$) cao hơn so với nhóm chứng ($0,64 \pm 0,14$) nhưng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), nhưng tỷ lệ *P. gingivalis* tại vị trí bệnh trong viêm nha chu tấn công ($0,71 \pm 0,11$) cao hơn có ý nghĩa so với nhóm chứng ($0,59 \pm 0,19$) với $p < 0,05$. So sánh số lượng *P. gingivalis* tại vị trí bệnh và vị trí lành trên bệnh nhân viêm nha chu mạn tính và viêm nha chu tấn công cho thấy tỷ số *P. gingivalis* trong dịch khe nướu và mảng bám răng dưới nướu tại vị trí bệnh cao hơn có ý nghĩa so với tại vị trí lành. ($p < 0,05$)

V. KẾT LUẬN

P. gingivalis là vi khuẩn thường gặp trong viêm nha chu ở cả hai thể mạn tính và tấn công (100%), số lượng vi khuẩn trong dịch khe nướu của người bệnh cao hơn so với người bình thường với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê, ($p < 0,05$).

Lời cảm ơn

Đề tài được thực hiện với sự tài trợ kinh phí từ đề tài cấp Bộ "Nghiên cứu quy trình sản xuất bộ sinh phẩm phát hiện vi khuẩn *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* gây bệnh viêm nha chu bằng kỹ thuật PCR", do PGS.TS. Nguyễn Thị Hà làm chủ nhiệm

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Borrell L.N., Crawford N.D (1998). New analysis of periodontitis prevalence. *J Clin Periodontol*, **36**(11), 3239 - 32342
2. Tran Van Truong, Lam Ngoc An, Trinh Dinh Hai et al (2002). National oral health survey of Việt Nam 2000. *Medical Publishing House, Hanoi, Vietnam*.
3. Paul M (2005). Prevalence analysis of putative periodontal pathogens in patients with aggressive periodontitis and healthy elderly A molecular study Dissertation. *Doctor of Medicine. University Medicine Berlin*.
4. OMPI - L'Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (2005). (WO/2005/112992) *P. gingivalis* vaccine

<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?>

WO=2005112992

5. Phạm Hùng Văn (2009). PCR và real-time PCR Các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp *Nhà xuất bản y học, Chi nhánh thành phố Hồ Chí Minh*.

6. Torrungruang K., Bandhaya P., Likittanasombat K et al (2009). Relationship between the presence of certain bacterial pathogens and periodontal status of urban Thai adults. *J Periodontol*, **80**(1), 122 - 129

7. Takeuchi Y., Umeda M., Motoko I et al (2003). Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population *J Periodontol*, **74**(10), 1460 - 1469.

8. Boutaga K., van Winkelhoff A.J., Christina M.J et al (2003). Comparison of real-time PCR and culture for detection *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples *J Clin Periodontol*, **41**(11), 4950 - 4954

9. Lyons S.R., Griffen A.L., Leys E.J (2000). Quantitative real-Time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol*, **38**(6), 2362 - 2365

10. Atieh M.A. (2008). Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol*, **79**(9), 1620 - 1629.

Summary

QUANTIFICATION OF *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* BY REAL - TIME PCR

This study was to quantify *Porphyromonas gingivalis* in chronic and aggressive periodontitis patients in comparison with healthy subjects by qPCR. qPCR has been used to quantify *Porphyromonas gingivalis* in gingival cervical fluid in both diseased sites of periodontal patients and

healthy sites of healthy subjects. The comparison were done in both diseased sites of chronic periodontitis patients *P. gingivalis* 25.10 ± 4.68 Cycle threshold (Ct) and healthy subjects (*P. gingivalis* 33.93 ± 3.17 Ct) respectively ($p < 0.05$). The comparison were in both diseased sites of aggressive periodontitis patients (*P. gingivalis* 22.89 ± 4.63 Ct) and healthy subjects (*P. gingivalis* 34.38 ± 2.96 Ct) respectively ($p < 0.01$). In conclusion, *Porphyromonas gingivalis* was very common in both chronic and aggressive periodontitis patients (100%) and there was a significant difference of *Porphyromonas gingivalis* quantity in comparison with healthy subjects ($p < 0.05$)

Key words: qPCR, *P.gingivalis*, chronic periodontitis, aggressive periodontitis