



Казимов А.Э.^{1,2}, Высочанская С.О.³, Петрова Д.А.², Малиновская А.Д.², Жернов Ю.В.^{2,3}

Разработка видоспецифичных праймеров и зондов *in silico* для выявления пародонтопатогенов

¹ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», 115682, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, Москва, Россия;

³Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды имени А.Н. Сысина, ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, 119121, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. В последние десятилетия профилактика инфекций, ассоциированных с развитием рака, смещается в сторону адресных систем контроля, основанных на количественной гигиенической донозологической оценке риска. Особое значение приобретает риск-ориентированный подход к мониторингу микробиоты полости рта, поскольку хронический дисбиоз и воспаление, вызываемые пародонтопатогенами, вносят вклад в канцерогенез слизистой оболочки полости рта.

Цель работы — осуществить *in silico* подбор видоспецифичных праймеров и зондов для мультиплексной ПЦР в реальном времени, которые после последующей клинической валидации могут быть использованы для количественной гигиенической донозологической оценки риска развития рака слизистой оболочки полости рта и других воспалительных процессов у здоровых людей.

Материалы и методы. В работе использованы полные геномные последовательности *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* и *Prevotella intermedia* из базы данных NCBI RefSeq. Консервативные участки генома идентифицированы с помощью Mauve v2.4.0, сравнительный анализ с родственными таксонами проведён с использованием BLASTn. Подбор видоспецифичных праймеров и зондов осуществлён в Geneious Prime® 2020.2.5 с учётом оптимальных параметров для ПЦР в реальном времени. Специфичность праймеров проверена *in silico* с помощью NCBI Primer-BLAST.

Результаты. Разработаны наборы праймеров и зондов для детекции четырёх ключевых пародонтопатогенов, включая два независимых набора для *P. gingivalis* (*rgpA* и *16S rPHK*), а также праймеры для *P. intermedia*, *T. forsythia* и *T. denticola*. Использование флуоресцентных меток (FAM, JOE, ROX, Cy5) позволяет реализовать четырёхплексную ПЦР для одновременной количественной оценки бактериальной нагрузки. Включение локуса *rgpA* обеспечивает углублённую донозологическую оценку патогенного потенциала микробиоты.

Ограничения исследования. Исследование ограничено анализом *in silico* специфичности праймеров. Работа представляет собой этап подбора и теоретического обоснования праймеров и зондов, предназначенных для создания тест-системы. Требуется дальнейшая клиническая валидация на образцах пациентов для подтверждения чувствительности и специфичности в реальных условиях, а также для установления корреляции между выявленными уровнями пародонтопатогенов и риском развития злокачественных новообразований слизистой оболочки полости рта.

Заключение. Подобранная мультиплексная ПЦР-панель после обязательной клинической валидации может стать основой для ранней диагностики, мониторинга и гигиенической донозологической оценки риска развития рака слизистой оболочки полости рта. Внедрение риск-ориентированного подхода и количественной ПЦР-диагностики позволит реализовать персонализированные стратегии профилактики и контроля болезней полости рта.

Ключевые слова: пародонтопатогены; микробиота полости рта; мультиплексная ПЦР; гигиеническая донозологическая диагностика

Соблюдение этических стандартов. Для данного исследования не требовалось заключение комитета по биомедицинской этике.

Для цитирования: Казимов А.Э., Высочанская С.О., Петрова Д.А., Малиновская А.Д., Жернов Ю.В. Разработка видоспецифичных праймеров и зондов *in silico* для выявления пародонтопатогенов. Гигиена и санитария. 2026; 105(6): 690–695. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2026-105-6-690-695> <https://elibrary.ru/sbkose>

Для корреспонденции: Жернов Юрий Владимирович, e-mail: YZhernov@cspfmmba.ru

Вклад авторов: Казимов А.Э. — концепция и дизайн исследования, сбор материала и обработка данных, написание текста; Высочанская С.О. — сбор материала и обработка данных, написание текста; Петрова Д.А. — сбор материала и обработка данных, написание текста; Малиновская А.Д. — сбор материала и обработка данных, написание текста; Жернов Ю.В. — концепция и дизайн исследования, сбор материала и обработка данных, написание текста. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех её частей.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело финансовой поддержки.

Поступила: 30.03.2026 / Поступила после доработки: 21.05.2026 / Принята к печати: 18.06.2026 / Опубликована: 31.07.2026

Aleksandr E. Kazimov^{1,2}, Sonya O. Vysochanskaya³, Daria A. Petrova², Anastasia D. Malinovskaya², Yury V. Zhernov^{2,3}

Development of species-specific primers and probes *in silico* for the detection of periodontal pathogens

¹Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal medical and biological agency of Russia, Moscow, 115682, Russian Federation;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119048, Russian Federation;

³A.N. Sysin Research Institute of Human Ecology and Environmental Hygiene, Center for Strategic Planning of the Federal medical and biological agency of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation

ABSTRACT

Introduction. In recent decades, the prevention of infections associated with cancer development has shifted toward targeted control systems based on quantitative hygienic prenosological risk assessment. A risk-oriented approach to oral microbiota monitoring is of particular importance, since chronic dysbiosis and inflammation caused by periodontal pathogens contribute to the carcinogenesis of the oral mucosa.

Objective. To perform *in silico* selection of species-specific primers and probes for multiplex real-time PCR that, after subsequent clinical validation, could be used for quantitative hygienic prenosological risk assessment of oral mucosal cancer and other inflammatory diseases in healthy persons.

Materials and Methods. Complete genome sequences of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, and *Prevotella intermedia* were retrieved from the NCBI RefSeq database. Conserved genomic regions were identified using Mauve v2.4.0, and comparative analysis with related taxa was performed using BLASTn. Species-specific primers and probes were designed in Geneious Prime® 2020.2.5 considering optimal parameters for real-time PCR. Primer specificity was assessed *in silico* using NCBI Primer-BLAST.

Results. Primer and probe sets were developed for the detection of four key periodontal pathogens, including two independent sets for *P. gingivalis* (*rgpA* and 16S rRNA), as well as primers for *P. intermedia*, *T. forsythia*, and *T. denticola*. The use of fluorescent labels (FAM, JOE, ROX, Cy5) enables four-plex PCR for simultaneous quantitative assessment of bacterial load. Inclusion of the *rgpA* locus provides an in-depth prenosological evaluation of the pathogenic potential of the microbiota.

Limitations. The study is limited to *in silico* analysis of primer specificity. This work represents a stage of selection and theoretical justification of primers and probes intended for the creation of a test system. Further clinical validation on patient samples is required to confirm sensitivity and specificity under real-world conditions, as well as establish a correlation between the detected levels of periodontal pathogens and the risk of developing malignant neoplasms of the oral mucosa.

Conclusion. The selected multiplex PCR panel, after mandatory clinical validation, may become a basis for early diagnosis, monitoring, and hygienic prenosological risk assessment of oral mucosal cancer. Implementation of a risk-oriented approach and quantitative PCR diagnostics will enable personalized strategies for the prevention and control of oral diseases.

Keywords: periodontopathogens; oral microbiota; multiplex PCR; hygienic prenosological diagnostics

Compliance with ethical standards. This study did not require approval from a biomedical ethics committee.

For citation: Kazimov A.E., Vysochanskaya S.O., Petrova D.A., Zhernov Yu.V. Development of species-specific primers and probes *in silico* for the detection of periodontal pathogens. *Gigiena i Sanitariya / Hygiene and Sanitation, Russian journal*. 2026; 105(6): 690–695. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2026-105-6-690-695> <https://elibrary.ru/sbkose> (In Russ.)

For correspondence: Yury V. Zhernov, e-mail: YZhernov@cspfmiba.ru

Contributions: Kazimov A.E. — concept and design of the study, collection and processing of material, writing text; Vysochanskaya S.O. — collection and processing of material, writing text; Petrova D.A. — collection and processing of material, writing text, text editing; Malinovskaya A.D. — collection and processing of material, writing text; Zhernov Yu.V. — concept and design of the study, collection and processing of material, writing text. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received: March 30, 2026 / Revised: May 25, 2026 / Accepted: June 18, 2026 / Published: July 31, 2026

Введение

В последние два десятилетия профилактика вирус-, бактериально- и грибково-обусловленных форм рака смещается от универсальных санитарных мероприятий к адресным системам контроля, основанным на количественной гигиенической донозологической оценке риска. Именно риск-ориентированный подход позволяет выстроить гибкую, экономически оправданную и научно обоснованную систему мониторинга, приоритетно фокусируясь на наиболее значимых микробных факторах канцерогенеза. Этот метод обеспечивает научно обоснованный мониторинг ещё до появления клинических признаков болезни.

Полость рта человека заселена богатым микробиомом, включающим более 1000 видов бактерий из филумов *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes* и др. Эти микроорганизмы участвуют в поддержании гомеостаза, метаболизме и защите от патогенов [1]. Основная масса видового состава (более 75%) нормальной микрофлоры полости рта представлена микроорганизмами с преимущественно анаэробным типом дыхания. При дисбиозе микробного сообщества развивается хроническое вос-

паление: нарушается целостность эпителия, активируются продукция провоспалительных цитокинов и деструкция тканей. Это способствует развитию кариеса, пародонтита, слизистых дисплазий, рака слизистой оболочки полости рта, а также влияет на отдалённые хронические неинфекционные болезни (сердечно-сосудистые, диабет и др.) [1]. Формирование орофарингеальной микробиоты начинается при рождении и продолжается в течение жизни. Необходимо отметить, что микробиота полости рта частично может передаваться от человека к человеку контактно-бытовым путём, становясь микробным фактором, который требует гигиенической донозологической оценки. Передача может осуществляться различными способами: через поцелуи, использование общих предметов личной гигиены (зубных щёток, полотенец), а также через капли слюны при разговоре и кашле [2].

Медикаментозные вмешательства могут существенно изменять орофарингеальный микробиоценоз. Некоторые препараты провоцируют пародонтальные изменения. Так, длительный приём фенитоина, циклоспорина и блокаторов кальциевых каналов вызывает гиперплазию дёсен, а глюкокортикостероида дексаметазона — усиленную резорбцию

костной ткани [3, 4]. Системная антибиотикотерапия приводит к нарушению кишечной микробиоты и опосредованно к изменению состава микробов во рту: потеря разнообразия микробов и рост устойчивых штаммов усугубляют воспаление пародонта [5]. Химиолучевая терапия при опухолях головы и шеи также значительно сокращает разнообразие ротовой микробиоты и изменяет её структуру. Например, после химиолучевой терапии отмечается уменьшение численности *Porphyromonadaceae* и *Prevotellaceae* при одновременном росте *Lactobacillaceae* [3].

Для слизистой оболочки полости рта применение риск-ориентированного подхода стало особенно актуальным: в настоящее время активно обсуждается роль микробного фактора — предиктора развития как первичных злокачественных опухолей этой локализации, так и рецидивов [6]. Хронический дисбиоз микробного сообщества сопровождается постоянным воспалением и нарушением иммунного надзора. При дисбиозе усиливается сигнализация через NF- κ B/STAT3, активно выделяются цитокины (IL-6, TNF- α и др.) и металлопротеиназы, что стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток и локальную иммуносупрессию [7]. Нарушение баланса микробов изменяет соотношение Th17/Treg-клеток, уменьшает эффективность распознавания патогенов через TLR-пути и может подавлять цитотоксические NK/T-лимфоциты [8]. Эти процессы создают фон для канцерогенеза: бактериальные токсины и метаболиты (например, ацетальдегид) повреждают ДНК клеток, а постоянная активация провоспалительных каскадов препятствует апоптозу диспластических клеток [7].

Ключевыми пародонтопатогенами являются представители «красного комплекса» — *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* и *Tannerella forsythia*. Эти бактерии часто встречаются совместно в глубоких зубодесневых карманах и играют ключевую роль в деструкции пародонта у восприимчивых лиц [9]. Присутствие данных микроорганизмов ассоциировано с предраковыми изменениями слизистой и развитием рака полости рта. В тканях плоскоклеточной карциномы ротоглотки существенно повышена доля *P. gingivalis* и *T. denticola*, а также других анаэробов (*Fusobacterium*, *Prevotella intermedia* и др.) [10–13].

Prevotella intermedia в норме распространена в десневых карманах, но обнаруживается в повышенных концентрациях уже на ранних этапах канцерогенеза слизистой оболочки полости рта [13]. Современные исследования показали, что этот микроорганизм также ассоциирован с развитием рака слизистой оболочки полости рта. Следовательно, первоочередная задача санитарного надзора заключается не в сплошном контроле всей микробиоты, а в ориентировании диагностических мероприятий на узкий круг канцерогенных видов, что представляется экономически обоснованным и клинически целесообразным.

P. gingivalis, *T. denticola*, *T. forsythia* и *P. intermedia* вызывают хроническое воспаление в полости рта, что приводит к продукции провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6 и TNF- α , а также к активации металлопротеиназ (MMP-8, MMP-9) и ремоделированию внеклеточного матрикса [7]. Хроническое воспаление способствует мутагенезу, ангиогенезу и нарушению процессов апоптоза, создавая условия для злокачественной трансформации клеток [14]. *P. gingivalis* обладает выраженным антиапоптотическим действием. Этот микроорганизм ингибирует апоптоз эпителиальных клеток посредством активации сигнальных путей Jak1-Stat3 и модуляции экспрессии микроРНК (например, повышение экспрессии miR-203), что способствует выживанию и пролиферации клеток с повреждённым геномом [14, 15]. *T. denticola* выделяет химотрипсиноподобную протеиназу (Td-CTLP), которая активирует металлопротеиназы, способствует инвазии опухолевых клеток и разрушению внеклеточного матрикса [16]. Кроме того, указанные бактерии продуцируют летучие соединения серы, органические кислоты и ацетальдегид, обладающие генотоксическим и канцерогенным действием [15]. *P. intermedia* и другие представители «красного

комплекса» способны разрушать иммуноглобулины и компоненты комплемента, что способствует иммуносупрессии и хронизации воспаления [17, 18]. *T. forsythia* индуцирует апоптоз клеток и продуцирует ферменты, коррелирующие с клинической тяжестью воспаления и канцерогенезом. Все перечисленные бактерии способны изменять локальный иммунитет, снижая противоопухолевую защиту и способствуя выживанию мутированных клеток [7, 8]. В ряде исследований приводятся данные о повышенном содержании *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* и *T. denticola* в слюне и опухолевой ткани пациентов с плоскоклеточным раком слизистой оболочки полости рта по сравнению со здоровыми добровольцами [14, 19]. Метаанализы и экспериментальные исследования подтверждают, что наличие этих бактерий ассоциировано с более высокой частотой предопухолевых изменений и злокачественных трансформаций эпителия полости рта. Так, показано, что присутствие *P. gingivalis* увеличивает риск плоскоклеточной карциномы слизистой оболочки полости рта примерно в 1,36 раза [20].

Ранняя диагностика и точная идентификация пародонтопатогенов имеют важное гигиеническое значение. Это позволяет своевременно оценить микробиологический профиль полости рта у пациентов из группы риска, выявить предрасположенность к развитию злокачественных изменений и рецидивов опухоли, а также осуществлять целенаправленный микробиологический контроль и профилактику, включая коррекцию микробиоты и санацию полости рта до и после лечения. Использование ПЦР-панели снижает стоимость диагностики при одновременном росте выявляемости опасных колонизаций. Это высвобождает ресурсы для таргетированной санации и сокращает осложнения, связанные с образованием биоплёнок.

Выявление указанных микроорганизмов в клинической практике сопряжено с рядом трудностей. Традиционные микробиологические (культуральные) методы обладают низкой чувствительностью и специфичностью, не позволяя обнаруживать труднокультивируемые или облигатно-анаэробные виды, требуют значительного времени для получения результата. Для эффективного выявления пародонтопатогенов необходимы современные методы диагностики. К таким методам предъявляются требования быстроты получения результата, высокой чувствительности и специфичности для всех ключевых пародонтопатогенов, возможности количественной гигиенической донозологической оценки бактериальной нагрузки, а также автоматизации и стандартизации процесса для широкого внедрения в клиническую практику. Совокупность перечисленных преимуществ делает полимеразную цепную реакцию (ПЦР) методом выбора для выявления пародонтопатогенных микроорганизмов.

В настоящее время в мировой и отечественной практике разработаны коммерческие тест-системы для ПЦР-детекции пародонтопатогенов. Среди зарубежных наборов следует выделить micro-IDent[®]plus11 (Hain Lifescience, Германия) для идентификации 11 видов пародонтопатогенных бактерий после двух ПЦР-раундов и последующей обратной гибридизации, набор Carpegen[®] Perio Diagnostik (Carpegen GmbH, Германия) для количественной ПЦР в реальном времени шести пародонтопатогенов, набор ParoCheck[®] Kit 20 (Greiner Bio-One, Германия) для детекции 20 бактериальных видов, а также набор AID PeriodontitisPlus Kit (AID Diagnostika, Германия) для идентификации 12 основных маркерных бактерий пародонтита, а также генотип интерлейкина-1 и аллель HLA-DR4 [21–23]. В Российской Федерации наибольшее распространение получил набор реагентов «Мультиидент-5» (ООО «НПФ «Генлаб», Россия), предназначенный для одновременной детекции методом ПЦР ДНК пяти пародонтопатогенов (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *T. forsythia* и *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) [24]. Однако данный набор базируется на классической ПЦР-амплификации с регистрацией результатов электрофорезом, что позволяет получать лишь качественную или полуколичественную картину патогенной микрофлоры и несёт риск конта-

Последовательности праймеров целевых видов пародонтопатогенов

Primer sequences of target periodontal pathogen species

Название Name	Последовательность Sequence	Температура плавления Melting temperature Tm, °C; IDT OligoAnalyzer	Длина продукта, п.н. Product length, b.p.
<i>P. gingivalis</i> rgpA F	GTGTCTGAAACCGCCAAAG	61.2	91
<i>P. gingivalis</i> rgpA R	AAGTGCCGACCTATACAGAAG	61.3	91
<i>P. gingivalis</i> rgpA P	FAM-CGTGATAGAATGGGAAGCGTAGG-BHQ1	64.1	91
<i>P. gingivalis</i> 16S F	ATACTGCGACTGACACTGAAG	61.7	179
<i>P. gingivalis</i> 16S R	ATTCCTTTGAGTTTCACCGTTG	61.6	179
<i>P. gingivalis</i> 16S P	FAM-CAGGTGGATTACTTAACGCTTTCGC-BHQ1	65.6	179
<i>P. intermedia</i> 16S F	CTAATCAGACGCATCCCCATC	62.1	82
<i>P. intermedia</i> 16S R	CCTAATACCCGATGTTGTCCAC	62.3	82
<i>P. intermedia</i> 16S P	JOE-CACCGATGAATCTTTGGTCCACG-BHQ1	65.2	82
<i>T. forsythia</i> 16S F1	CCGTTGAAACTGGTAGTCTTG	60.8	132
<i>T. forsythia</i> 16S R1	CGTGCTTCAGTGTCAGTTATAC	60.9	132
<i>T. forsythia</i> 16S P1	ROX-TAGATGAAGTAGGCGGAATGCGTG-BHQ2	66.0	132
<i>T. forsythia</i> 16S F2	CGAGGGTAGCAATACCTGTC	61.4	81
<i>T. forsythia</i> 16S R2	CGGGTTATCCCTCTGTTGC	62.1	81
<i>T. forsythia</i> 16S P2	ROX-CAGGTTACATACGCGTTACTACC-BHQ2	64.5	81
<i>T. denticola</i> 16S F1	GTAAGGGTATGTAGGCGGTTAG	62.1	86
<i>T. denticola</i> 16S R1	TCAAGTCAAGCAGTACCCAATG	62.6	86
<i>T. denticola</i> 16S P1	Cy5-TAAGCCTGGTGTGAAATCTACGAGC-BHQ3	66.1	86

минации ампликонами из-за пост-ПЦР обработки [25]. Также в России разработан набор ParodontoScreen (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) для количественного ПЦР-анализа в реальном времени оппортунистических микроорганизмов, населяющих полость рта [26]. Все перечисленные системы имеют прикладной клинический характер и направлены на диагностику пародонтита, но не являются нацеленным инструментом для гигиенической донозологической оценки риска развития злокачественных новообразований слизистой оболочки полости рта.

Цель настоящего исследования — подбор *in silico* видоспецифичных праймеров и зондов для мультиплексной ПЦР в реальном времени, которые после клинической валидации могли бы использоваться для количественной гигиенической донозологической оценки риска развития рака слизистой оболочки полости рта и других воспалительных патологий у здоровых людей.

Материалы и методы

Получение и подготовка геномов. Полные геномные последовательности *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* и *Prevotella intermedia*, находящиеся в открытом доступе, были получены из базы данных NCBI RefSeq (при помощи Entrez query вида *Porphyromonas gingivalis* [Organism] AND «complete»[All Fields]). Геномы были отформатированы для совместимости с инструментами выравнивания с помощью BioPython v1.78.

Определение консервативных участков. Консервативные участки генома всех четырёх целевых видов были идентифицированы с помощью Mauve v2.4.0 [1] с параметрами по умолчанию (автоматическим выбором seed weight, порога оценки LCB и минимального балла LCB). Использовался алгоритм progressiveMauve, с помощью которого были извлечены локально коллинеарные блоки (LCB), которые являются общими внутри исследуемых геномов для данного вида. Регионы, имеющие высококонсервативную последовательность, были сохранены для дальнейшего анализа.

Сравнительный анализ с родственными таксонами. Консервативные LCB сравнивали с геномами филогенетически родственных видов (например, *Porphyromonas gulae* и других *Porphyromonas* spp., *Treponema pallidum*, *Treponema socranskii*, *Treponema vincentii*, *Tannerella buccae* и *Prevotella nigrescens*) с помощью BLASTn v2.12.0 [27]. Последовательности с высокой идентичностью ($\geq 85\%$) с нецелевыми видами были исключены с целью обеспечения уникальности для целевых патогенов.

Разработка праймеров. Работа с полученными последовательностями и подбор видоспецифичных праймеров в сохранённых областях проводились с использованием Geneious Prime® 2020.2.5 (Biomatters Ltd.). Параметры включали: размер ампликона 80–180 bp, длину праймеров 18–22 bp, температуру плавления T_m плюс 58–62 °C ($\Delta T_m \leq 0.5$ °C), содержание GC 40–60% и стабильность 3'-конца $\Delta G \geq -9$ ккал/моль. Для зонда длина была выбрана в диапазоне 23–28 bp и T_m , превышающая минимум на 4–5 °C среднюю T_m для пары праймеров. Вторичные структуры, образование димеров и температура плавления оценивались с использованием встроенных инструментов Geneious и IDT OligoAnalyzer [28].

Проверка специфичности *in silico*. Специфичность праймеров оценивали с помощью программы NCBI Primer-BLAST [29] по базе данных NT. Праймеры, дающие непредусмотренные ампликоны (в том числе с нецелевыми организмами), подвергали итеративной переделке до подтверждения специфичности.

Результаты

В рамках исследования были подобраны следующие наборы праймеров для каждого из четырёх целевых видов: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* и *Prevotella intermedia* (см. таблицу).

В рамках проведённого исследования были разработаны специфические последовательности праймеров для детекции и идентификации ключевых видов пародонтопатогенов.

Для *Porphyromonas gingivalis* созданы два независимых набора праймеров: один нацелен на ген *rgpA*, второй — на консервативный участок 16S рРНК. Оба набора демонстрируют высокую специфичность с температурой плавления праймеров в диапазоне плюс 61,2–61,7 °С и длиной ампликонов 91 и 179 пар нуклеотидов (п.н.). Для *Prevotella intermedia* и *Tannerella forsythia* разработаны праймеры, амплифицирующие участки 16S рРНК с длиной продуктов 82 и 132 п.н. соответственно. Для детекции *Treponema denticola* создан набор с длиной ампликона 86 п.н. и температурой плавления плюс 62,1–62,6 °С.

Полученные последовательности зондов обеспечивают возможность применения четырёхплексной ПЦР с использованием флуоресцентных меток (FAM, JOE, ROX, Cy5) и соответствующих тушителей сигнала (BHQ1, BHQ2, BHQ3). Использование зондов, меченных разными флуорофорами с неперекрывающимися спектрами эмиссии, позволяет проводить количественную оценку полибактериальной нагрузки в режиме реального времени у здоровых людей.

Подобранный набор праймеров и зондов после экспериментальной и клинической валидации может стать основой для точной идентификации и количественной оценки патогенных микроорганизмов, что открывает новые возможности для донозологической диагностики и мониторинга состояния микробиоты полости рта.

Обсуждение

В рамках реализации риск-ориентированного подхода к гигиенической оценке состояния микробиома полости рта проведены подбор *in silico* и теоретическое обоснование расширенной панели генетических мишеней для ПЦР-диагностики. Разработанный набор праймеров и зондов к консервативным участкам гена 16S рРНК представителей «красного комплекса» *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* и бактерии *P. intermedia* как нормофлоры десневых карманов, ассоциированной со злокачественными новообразованиями слизистой оболочки полости рта, представляет собой инструмент для молекулярной диагностики, позволяющий проводить комплексную оценку микробиоты полости рта у здоровых людей и своевременно выявлять риски для здоровья. Наряду с консервативными участками гена 16S рРНК *P. intermedia* в качестве диагностического маркера определён

локус *rgpA* *P. gingivalis*. Использование гена *rgpA*, кодирующего аргинин-специфический гингипаин А, позволяет проводить углублённую донозологическую оценку патогенного потенциала микробиоты [30]. Поскольку *RgpA* оказывает прямое протеолитическое действие на коллаген I в тканях пародонта, это способствует разрушению соединительной ткани [31, 32], вызывает активацию провоспалительного каскада через рецепторы, активируемые протеазами (PARs) с выделением провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, TNF-α), и нарушает иммунный ответ и апоптоз клеток, способствуя канцерогенезу [32–34]. Таким образом, включение праймеров к гену *rgpA* в панель мониторинга позволяет перейти от детекции бактерий к идентификации ключевой детерминанты их патогенности. Данный подход после валидации на клинических образцах обеспечит научно обоснованное прогнозирование рисков развития локальных воспалительных процессов и системных осложнений, формируя базу для персонализированных превентивных стратегий в гигиене и здравоохранении.

Заключение

Таким образом, нами осуществлён подбор *in silico* видоспецифичных праймеров и зондов для мультиплексной ПЦР в реальном времени с целью определения состава пародонтопатогенной микробиоты (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *P. intermedia*) у здоровых лиц. На данном этапе этот набор праймеров рассматривается как основа для будущей тест-системы, которая после обязательной клинической валидации (определения специфичности, чувствительности, испытаний на клинических образцах) сможет применяться для диагностики и контроля лечения таких состояний, как кариес, пародонтит, слизистые дисплазии, а также для гигиенической донозологической оценки риска развития рака слизистой оболочки полости рта. Риск-ориентированная парадигма подчёркивает, что диагностика должна быть настолько же избирательной, насколько многообразен микробиом полости рта. Разработка и клиническая валидация количественной ПЦР-панели является ключом к управлению рисками онкологической заболеваемости слизистой оболочки полости рта. Таким образом, принцип «больше риска — больше внимания» станет технологически реализуемым и экономически оправданным инструментом здравоохранения.

Литература

(п.п. 1–18, 21–23, 26–34 см. References)

- Григорьевская З.В., Терещенко И.В., Казимов А.Э., Багирова Н.С., Петухова И.Н., Мудунов А.М. и др. Микробиота полости рта и ее значение в генезе рака орофарингеальной зоны. *Злокачественные опухоли*. 2020; 10(3S1): 54–9. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2020-10-3s1-54-59> <https://elibrary.ru/zjbyge>
- Царев В.Н., Николаева Е.Н., Земляная Н.Ю., Воронцова Н.И., Шеремет О.К., Иванова Н.В. Набор реагентов для определения ДНК пародонтопатогенных микробов *Prevotella intermedia sensu stricto*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции. Патент РФ № 2306341; 2007. <https://elibrary.ru/fyimsu>
- Волков А.Н. Апробация тест-системы для одновременного ПЦР-анализа пяти пародонтопатогенных микроорганизмов в биологическом образце. *Медицина в Кузбассе*. 2014; 13(4): 14–8. <https://elibrary.ru/tebxzh>
- Irfan M., Delgado R.Z.R., Frias-Lopez J. The oral microbiome and cancer. *Front. Immunol.* 2020; 11: 591088. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.591088> <https://elibrary.ru/tuvryr>
- Valles-Colomer M., Blanco-Míguez A., Manghi P., Asnicar F., Dubois L., Golzato D., et al. The person-to-person transmission landscape of the gut and oral microbiomes. *Nature*. 2023; 614(7946): 125–35. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05620-1> <https://elibrary.ru/uvrduq>
- Mäkinen A.I., Pappalardo V.Y., Buijs M.J., Brandt B.W., Mäkitie A.A., Meurman J.H., et al. Salivary microbiome profiles of oral cancer patients analyzed before and after treatment. *Microbiome*. 2023; 11(1): 171. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01613-y> <https://elibrary.ru/sewhao>
- Tungare S., Paranjpe A.G. Drug-induced gingival overgrowth. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls; 2022.
- Yuan X., Zhou F., Wang H., Xu X., Xu S., Zhang C., et al. Systemic antibiotics increase microbiota pathogenicity and oral bone loss. *Int. J. Oral Sci.* 2023; 15(1): 4. <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00212-1> <https://elibrary.ru/ccqbw1>
- Devaraja K., Aggarwal S. Dysbiosis of oral microbiome: a key player in oral carcinogenesis? a critical review. *Biomedicine*. 2025; 13(2): 448. <https://doi.org/10.3390/biomedicine13020448> <https://elibrary.ru/zeabny>
- Sharma T., Gupta A., Chauhan R., Bhat A.A., Nisar S., Hashem S., et al. Cross-talk between the microbiome and chronic inflammation in esophageal cancer: potential driver of oncogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 2022; 41(2): 281–99. <https://doi.org/10.1007/s10555-022-10026-6> <https://elibrary.ru/dngtja>
- Wang X., He X., Zhong B. Oral microbiota: the overlooked catalyst in cancer initiation and progression. *Front. Cell Dev. Biol.* 2025; 12: 1479720. <https://doi.org/10.3389/fcell.2024.1479720> <https://elibrary.ru/bzurhz>
- Rôças I.N., Siqueira J.F. Jr., Santos K.R., Coelho A.M. “Red complex” (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 2001; 91(4): 468–71. <https://doi.org/10.1067/moe.2001.114379>
- Xiao L., Zhang Q., Peng Y., Wang D., Liu Y. The effect of periodontal bacteria infection on incidence and prognosis of cancer: A systematic

Original article

- review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99(15): e19698. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000019698> <https://elibrary.ru/qrlat>
11. Wang B., Deng J., Donati V., Merali N., Frampton A.E., Giovannetti E., et al. The roles and interactions of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in oral and gastrointestinal carcinogenesis: a narrative review. *Pathogens*. 2024; 13(1): 93. <https://doi.org/10.3390/pathogens13010093> <https://elibrary.ru/ghxrxs>
 12. Lafuente Ibáñez de Mendoza I., Maritxalar Mendia X., García de la Fuente A.M., Quindós Andrés G., Aguirre Urizar J.M. Role of *Porphyromonas gingivalis* in oral squamous cell carcinoma development: A systematic review. *J. Periodontol Res.* 2020; 55(1): 13–22. <https://doi.org/10.1111/jre.12691>
 13. Castañeda-Corzo G.J., Infante-Rodríguez L.F., Villamil-Poveda J.C., Bustillo J., Cid-Arregui A., García-Robayo D.A. Association of *Prevotella intermedia* with oropharyngeal cancer: A patient-control study. *Heliyon*. 2023; 9(3): e14293. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14293> <https://elibrary.ru/jnyjfm>
 14. Li T.J., Hao Y.H., Tang Y.L., Liang X.H. Periodontal pathogens: a crucial link between periodontal diseases and oral cancer. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 919633. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.919633> <https://elibrary.ru/izovoy>
 15. Whitmore S.E., Lamont R.J. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog.* 2014; 10(3): e1003933. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003933>
 16. Nieminen M.T., Listyariyah D., Hagström J., Haglund C., Grenier D., Nordström D., et al. *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase may contribute to orodigestive carcinogenesis through immunomodulation. *Br. J. Cancer*. 2018; 118(3): 428–34. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.409>
 17. Jansen H.J., Grenier D., Van der Hoeven J.S. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral. Microbiol. Immunol.* 1995; 10(3): 138–45. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1995.tb00134.x>
 18. Potempa M., Potempa J., Kantyka T., Nguyen K.A., Wawrzonek K., Manandhar S.P., et al. Interpain A, a cysteine proteinase from *Prevotella intermedia*, inhibits complement by degrading complement factor C3. *PLoS Pathog.* 2009; 5(2): e1000316. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000316> <https://elibrary.ru/yaukhk>
 19. Grigorevskaya Z.V., Tereshchenko I.V., Kazimov A.E., Bagirova N.S., Petukhova I.N., Mudunov A.M., et al. The microbiota of the oral cavity and its significance in the genesis of cancer of the oropharyngeal zone. *Zlokhachestvennye opukholi*. 2020; 10(3S1): 54–9. <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2020-10-3s1-54-59> <https://elibrary.ru/zjbyge> (in Russian)
 20. Vyhnalova T., Danek Z., Gachova D., Linhartova P.B. The role of the oral microbiota in the etiopathogenesis of oral squamous cell carcinoma. *Microorganisms*. 2021; 9(8): 1549. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081549> <https://elibrary.ru/vkxuwv>
 21. Haffajee A.D., Yaskell T., Torresyap G., Teles R., Socransky S.S. Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. *J. Clin. Periodontol.* 2009; 36(8): 642–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01434.x>
 22. Santigli E., Leitner E., Wimmer G., Kessler H.H., Feierl G., Grube M., et al. Accuracy of commercial kits and published primer pairs for the detection of periodontopathogens. *Clin. Oral Investig.* 2016; 20(9): 2515–28. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1748-9> <https://elibrary.ru/xthyeh>
 23. PCR detection of periodontitis pathogens. AID PeriodontitisPlus PCR Kit – detection of the 12 major periodontitis marker pathogens. Available at: <https://aid-diagnostika.com/en/kits/molecular-biologic-assay/infectious-diseases/other-pathogens/parodontitisplus>
 24. Tsarev V.N., Nikolaeva E.N., Zemljanaja N.Ju., Vorontsova N.I., Sheremet O.K., Ivanova N.V. Kit for determination of parodont pathogen bacteria *Prevotella intermedia sensu stricto*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* by using polymerase chain reaction. Patent RF No. 2306341; 2007. (in Russian)
 25. Volkov A.N. Approbation of test system for simultaneous PCR analysis of five parodontopathogenic microorganisms in biological sample. *Meditsina v Kuzbasse*. 2014; 13(4): 14–8. <https://elibrary.ru/tebxzh> (in Russian)
 26. DNA-Technology. ParodontoScreen; 2026. Available at: <https://dna-technology.com/equipmentpr/pcr-kits-microbiome-composition-screening/parodontoscreen>
 27. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10: 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
 28. Integrated DNA Technologies. OligoAnalyzer™: Primer analysis tool. Available at: <https://iddna.com/calc/analyzer>
 29. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134v> <https://elibrary.ru/nwqkwq>
 30. Aleksijević L.H., Aleksijević M., Škrlec I., Šram M., Šram M., Talapko J. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors and clinical significance in periodontal disease and coronary artery diseases. *Pathogens*. 2022; 11(10): 1173. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101173> <https://elibrary.ru/wevbjn>
 31. Zhang R., Yang J., Wu J., Sun W.B., Liu Y. Effect of deletion of the *rgpA* gene on selected virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Sci.* 2016; 11(3): 279–86. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2016.03.004>
 32. Chen W.A., Dou Y., Fletcher H.M., Boskovic D.S. Local and Systemic Effects of *Porphyromonas gingivalis* Infection. *Microorganisms*. 2023; 11(2): 470. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020470> <https://elibrary.ru/imlbie>
 33. Shahoumi L.A., Saleh M.H.A., Meghail M.M. Virulence factors of the periodontal pathogens: tools to evade the host immune response and promote carcinogenesis. *Microorganisms*. 2023; 11(1): 115. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010115> <https://elibrary.ru/gdtbla>
 34. Li F., Ma C., Lei S., Pan Y., Lin L., Pan C., et al. Gingipains may be one of the key virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* to impair cognition and enhance blood-brain barrier permeability: An animal study. *J. Clin. Periodontol.* 2024; 51(7): 818–39. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13966> <https://elibrary.ru/zpkplh>

Сведения об авторах

Казимов Александр Эрчинович, зав. отделением патологии головы и шеи ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, 115682, Москва, Россия. E-mail: mr.kazimov@yandex.ru

Высоцанская Соля Олеговна, лаборант лаб. разработки новых методов молекулярной диагностики заболеваний человека Центра постгеномных технологий ФГБУ ЦСП ФМБА России, 119121, Москва, Россия. E-mail: SVysochanskaia@cspfmbaru

Петрова Дарья Андреевна, студент, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского (ИКМ) Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета), 119435, Москва, Россия. E-mail: PetrovaB2B@yandex.ru

Малиновская Анастасия Денисовна, студент, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского (ИКМ) Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета), 119435, Москва, Россия. E-mail: malinovskaya@gymnasia23.ru

Жернов Юрий Владимирович, доктор мед. наук, профессор РАН, директор НИИ ЭЧигОС им. А.Н. Сысина, ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва, Россия. E-mail: YZhernov@cspfmbaru

About the authors

Aleksandr E. Kazimov, head, Department of head and neck pathology, Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, 115682, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-7117-9453> E-mail: mr.kazimov@yandex.ru

Sonya O. Vysochanskaya, laboratory assistant, Laboratory for the development of new methods for molecular diagnostics of human diseases, Center for Postgenomic Technologies, Center for Strategic Planning and Management of Medical and Biological Health Risks, Moscow, 119121, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0002-1180-0690> E-mail: SVysochanskaia@cspfmbaru

Daria A. Petrova, student, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119048, Russian Federation, <https://orcid.org/0009-0009-4201-4762> E-mail: PetrovaB2B@yandex.ru

Anastasia D. Malinovskaya, student, N.V. Sklifosovsky Institute of Clinical Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119048, Russian Federation, <https://orcid.org/0009-0004-1558-8369> E-mail: malinovskaya@gymnasia23.ru

Yury V. Zhernov, DSc (Medicine), professor, director, A.N. Sytin Research Institute of Human Ecology and Environmental Hygiene, Centre for Strategic Planning of the Federal medical and biological agency, Moscow, 119121, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0001-8734-5527> E-mail: YZhernov@cspfmbaru