

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Ильин В.К.¹, Соловьёва З.О.¹, Гизингер О.А.², Шеблаева А.С.¹, Быстрова О.В.³, Ловцевич С.М.³, Бородин И.П.⁴

СРАВНЕНИЕ МЕТОДА ПЦР ДИАГНОСТИКИ И МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ МИКРОБНЫХ МАРКЁРОВ ПРИМЕНИТЕЛЬНО К ОЦЕНКЕ МИКРОБИОТЫ ПОЛОСТИ РТА

¹ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, 123007, Москва, Россия;

²ФГАБУ ВО Российский университет дружбы народов, Медицинский институт, 117198, Москва, Россия;

³ООО «Институт аналитической токсикологии», 143441, Московская область, Россия;

⁴ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия

Для оперативной диагностики, в том числе зубочелюстной системы, необходима разработка быстрых информативных методов оценки видового и количественного состава микрофлоры покровных тканей пародонта и ротоглотки. Использование классического бактериологического метода занимает до 5 суток, в результате чего срок получения необходимой информации значительно откладывается, что затрудняет проведение оперативных лечебных мероприятий. Поиск средств и методов оперативного микробиологического контроля является актуальным. Работа посвящена обоснованию применения технологии МСММ (масс-спектрометрии микробных маркёров) в качестве средства микробиологического контроля пародонта и других биотопов ротоглотки.

Ключевые слова: пародонт; метод масс-спектрометрии микробных маркёров; метод полимеразной цепной реакции.

Для цитирования: Ильин В.К., Соловьёва З.О., Гизингер О.А., Шеблаева А.С., Быстрова О.В., Ловцевич С.М., Бородин И.П. Сравнение метода ПЦР диагностики и метода масс-спектрометрии микробных маркёров применительно к оценке микробиоты полости рта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (8): 484-488. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-484-488>

Для корреспонденции: Шеблаева Анна Сергеевна, науч. сотр. лаб. микробной экологии человека; e-mail: anna@sheblaeva.ru

Финансирование. Публикация выполнена при поддержке Программы стратегического академического лидерства РУДН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.02.2022

Принята к печати 25.04.2022

Опубликовано 00.08.2022

Ilyin V.K.¹, Solovieva Z.O.¹, Gizinger O.A.², Sheblaeva A.S.¹, Byistrova O.A.³, Lovtsevich S.M.³, Borodin I.P.⁴

COMPARISON OF PCR DIAGNOSTIC METHOD AND MASS SPECTROMETRY OF MICROBIAL MARKERS METHOD AS APPLIED TO THE EVALUATION OF ORAL MICROBIOTA

¹Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, 123007, Moscow, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) 117198, Moscow, Russia;

³Institute of Analytical Toxicology, 125466, Krasnogorsk, Moscow region, Russia;

⁴Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia

Rapid informative methods for assessing the species and quantitative composition of the microflora of the periodontal and oropharyngeal covering tissues are necessary for operative diagnostics, including those of the dentofacial system. The use of classical bacteriological methods, including seeding, incubation, counting and identification of microorganisms takes up to 5 days, resulting in a significant delay in obtaining the necessary information, which makes it difficult to carry out operative treatment measures. Therefore, the search for means and methods of operative microbiological control is urgent. The present work is devoted to substantiation of MSMM (mass spectrometry of microbial markers) technology application as a means of microbiological control of periodontal and other oropharyngeal biotopes.

Key words: periodontium; microbial marker mass spectrometry method; polymerase chain reaction method.

For citation: Ilyin V.K., Solovieva Z.O., Gizinger O.A., Sheblaeva A.S., Byistrova O.A., Lovtsevich S.M., Borodin I.P.

Comparison of pcr diagnostic method and mass spectrometry of microbial markers method as applied to the evaluation of oral microbiota. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (8): 484-488 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-8-484-488>

For correspondence: Sheblaeva A.S., Researcher, Laboratory of human microbial ecology, Institute of Biomedical Problems; e-mail: anna@sheblaeva.ru

Information about authors:

Ilyin V.K., <https://orcid.org/0000-0003-3896-5003>;

Solovieva Z.O., <https://orcid.org/0000-0002-6159-1313>;

Gizinger O.A., <https://orcid.org/0000-0001-9302-0155>;

Sheblaeva A.S., <https://orcid.org/0000-0003-4083-9612>;

Byistrova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-6829-8147>;

Lovtsevich S.M., <https://orcid.org/0000-0001-8090-5851>;

Borodin I.P., <https://orcid.org/0000-0002-0231-9600>.

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

Acknowledgment. This paper has been supported by the RUDN University Strategic Academic Leadership Program.

Received 04.02.2022

Accepted 25.04.2022

Published 00.08.2022

Введение. Пародонт первым отвечает на условия стресса и снижения иммунной реактивности организма в виде воспаления полости рта, что, в дальнейшем, может привести к расшатыванию зубов и их потере, нарушению архитектоники полости рта [1].

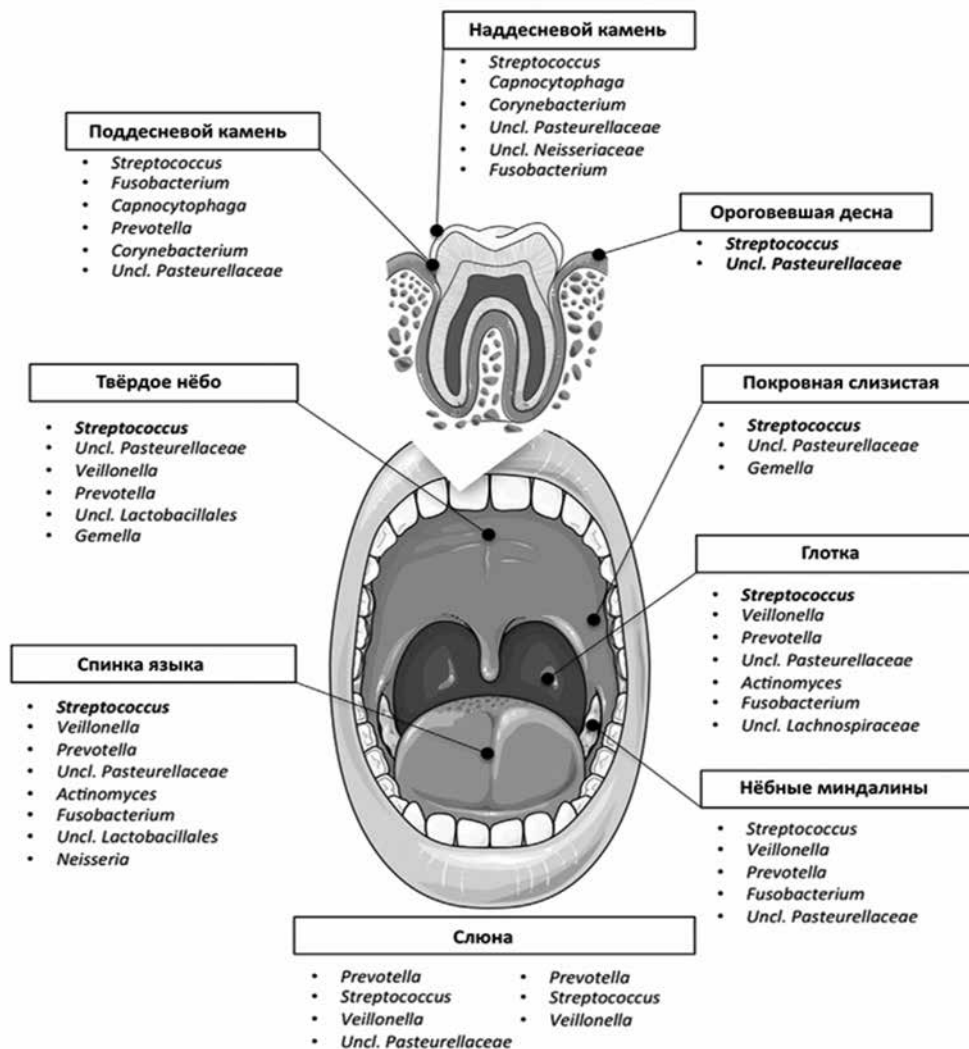
Воспалительные реакции в области пародонта – явление достаточно частое и встречается среди 80-100% населения независимо от территории проживания [2]. Следствием воспаления пародонта может быть нарушение микробиоценоза полости рта. Микробиоценоз полости рта является сложной динамической системой, где организм хозяина и микробы адаптированы друг к другу и при наличии хронического воспалительного процесса, явлений оксидативного стресса это взаимодействие может быть нарушено. Другими значимыми причинами нарушения микробиоценоза полости рта могут быть кариесогенные процессы, механическое и химическое отбеливание для улучшения внешнего вида, удаление зубов, хронические заболевания желудочно-кишечного тракта, заболевания верхних дыхательных путей как в анамнезе так и в текущий период времени, профессио-

нальные вредности, наличие у больных профессий, связанных с нервно-эмоциональным напряжением (космонавты, моряки дальнего плавания, подводники, жители Заполярья) и т. д. [3-6].

Микрофлора полости рта традиционно подразделяется на аутохтонную и аллохтонную. Аутохтонная микрофлора принимает участие в метаболических процессах организма [7]. В 2016 г. описан состав микробиоты полости рта, наиболее часто встречающейся у >80% людей [12] (см. рисунок).

По современным представлениям основными «провокаторами» или индукторами дисбиотических процессов полости рта, приводящими к заболеваниям пародонта, являются: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* [8-10] *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces* spp., *Candida* spp., условно патогенные микроорганизмы (УПМ):

Видовой состав микрофлоры содержимого пародонтальных карманов при обострении хронического генерализованного пародонтита представлен в табл. 1 [11].



Ключевая микробиота полости рта, установленная в рамках инициативы Human Microbiome Project. Курсивом выделены таксоны, распространённые у >75% людей и составляющие >10% всех бактерий сообщества.

Streptococcus sanguis, *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Corynebacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Prevotella* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces viscosus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Candida glabrata* [11].

Таблица 1

Видовой состав микрофлоры содержимого пародонтальных карманов

Вид	Количество штаммов, абс.	Удельный вес, %	Частота встречаемости, %
Стрептококки			
<i>S. mitis</i>	31	17,21±1,12	61,35±1,56
<i>S. mutans</i>	30	16,67±1,34	62,48 ± 1,45
<i>S. agalactis</i>	26	14,44±1,22	50,80±1,45
<i>S. salivarius</i>	23	12,78±1,34	47,64±1,14
<i>S. sanguis</i>	17	9,44±1,56	34,39±1,04
Стафилококки			
Коагулазоположительные	11	6,11±1,56	22,22±1,09
Коагулазоотрицательные	10	5,56±1,26	23,75±1,56
Дрожжеподобные грибы	21	11,68±1,33	41,79±1,76
Коринебактерии	11	6,11±1,65	23,45±1,89
Всего	180	100	

Для индикации и последующей идентификации микроорганизмов используется культуральный метод диагностики [14], иммунологические и биохимические методы идентификации [15]. Каждая из методик, используемых в диагностике, имеет свои преимущества и ограничения, определяющие её выбор и место в конкретной диагностической стратегии. Базовыми требованиями к любому методу индикации микроорганизмов являются: простота взятия биоматериала, быстрая обработка и валидный результат, то есть точность выполнения преаналитического, аналитического и постаналитического лабораторного этапов.

Для идентификации микроорганизмов часто применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), с помощью которой даже небольшое количество исследуемого материала, содержащего генетический материал ДНК, РНК можно идентифицировать путём амплификации [16]. ПЦР позволяет с высокой точностью, до 10 копий на 1 мл биоматериала, определять пародонтопатогены в образцах биоматериала. Проблема заключается в том, что при исследовании методом ПЦР, часто, приходится сужать перечень микроорганизмов для идентификации, оптимизируя временные и финансовые затраты на проведение анализа, исходя из возможностей тест-систем производителя.

Для идентификации пародонтопатогенов начал использоваться метод масс-спектрометрии микробных маркеров (МСММ), ранее показавший эффективность в гастроэнтерологии, хирургии и трансплантологии, отоларингологии, кардиологии, урологии, гинекологии и др. [17-25], где обосновано его применение и доказана информативность и целесообразность его использования. Метод МСММ можно отнести к молекулярно-биологическим исследованиям, однако целевыми молекулярными соединениями для диагностических целей являются специфические генетически детерминированные компоненты клеточных стенок микроорганизмов. Метод МСММ имеет высокую (до 98%) чувствительность, даёт возможность валидации результатов и анализа микроорганизмов, полученных из любого биоматериала. В отличие от метода ПЦР МСММ имеет меньше ограничений по отбору и транспортировке

проб, нарушение которых может приводить к ложноположительным и ложноотрицательным результатам анализа. Ограничение применения метода МСММ связано со сходством строения клеточных стенок микроорганизмов и необходимостью специфических маркеров для видовой дифференциации, с учётом вышеозначенного обстоятельства, в то время как метод ПЦР обладает специфичностью в пределах 98,5%.

В отличие от метода ПЦР, метод МСММ является одновременно и скрининговым, так как позволяет одновременно определять 57 микроорганизмов в одной пробе одновременно [26], и экспрессным, поскольку полный спектр микроорганизмов может быть доступен через 2 ч после поступления биоматериала в лабораторию. Представляется обоснованным применение метода МСММ для изучения микробного сообщества для идентификации патогенных микроорганизмов и УПМ резидентной микрофлоры, и для обоснованного назначения дополнительных исследований с использованием метода ПЦР.

Цель исследования – сравнение эффективности, специфичности и чувствительности методов ПЦР и МСММ для изучения видового и количественного состава микробиоты полости рта.

Материал и методы. Исследование проведено на базе Медицинского института РУДН в 2021 г. в соответствии с решением Комитета по этике Медицинского института РУДН от 17 марта 2021 г. (выписка из протокола № 5). В исследование включены 20 лиц, разнородных по гендерному составу: 10 мужчин (50%) и 10 женщин (50%) в возрасте от 27 до 65, отмечены хронические заболевания в стадии компенсации: гипертония – у 1 обследуемого (5%), заболевания ЖКТ – у 1 (5%). Исследование проведено на основании добровольного информированного согласия в соответствии с основами законодательства РФ «Об охране здоровья граждан, правил проведения клинической практики в РФ».

При отборе проб для проведения тестирования методом ПЦР использован стерильный стоматологический бумажный пин, с его помощью отбирались пробы в области десневой борозды нижних зубов с язычной стороны. При отборе проб методом МСММ использованы одноразовые стерильные зонды с тампоном в пробирке без среды, пробы отбирались в той же области, то есть с области десневой борозды нижних зубов с язычной стороны. ДНК микроорганизмов выделили с помощью набора реагентов «Пробоподготовка универсальная» (ООО НПФ «Генлаб», Россия). Амплификация маркеров пародонтопатогенных бактерий *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia (Bacteroides forsythus)*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, проведена в термоциклере «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия) с помощью мультипраймерного ПЦР набора «Мультидент-5» (ООО НПФ «Генлаб», Россия).

Исследование методом МСММ проведено с использованием газового хроматографа масс-спектрометра (ГХ-МС) «МАЭСТРО» (ООО «Интерлаб», Россия). Микробные маркеры извлечены из зонд-тампонов, подвергнуты кислую метанолизу при температуре 80° С в течение 45 мин (0,4 мл 1,2 МНСI/MeOH) с последующей экстракцией гексаном (1 часть смеси x 400 мкл гексана) с последующим высушиванием и дериватизацией полученных продуктов обработкой 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)-трифторацетамида при 80° С в течение 5 минут. Полученная смесь проанализирована на ГХ-МС системе в

программируемом режиме разделения компонентов в температурном градиенте [135-320]° C со скоростью подъёма температуры на 7° C в минуту на колонке с фазой из 5% фенилметилполисилоксана (30 мх0,25ммх0,25 мкм). Ионизацию проводили электронным ударом, при параметрах удара 70 эВ, детектирование в режиме селективных ионов. В ходе исследования методом ПЦР и МСММ детектированы: *Prevotella* spp., *Candida* spp., *Porphyromonas gingivalis*. Все полученные данные проанализированы путём вычислений в строгом соответствии с зарегистрированной медицинской технологией для данной процедуры (Разрешение Росздравнадзора ФС 2010/038 от 24.02.2010 г.). Качественные и количественные показатели подвергнуты статистической обработке с использованием методов непараметрического анализа. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 365. Статистический анализ проведён с использованием свободной программной среды статистических вычислений R (v.3.5.1). В связи с тем, что методы ПЦР и МСММ используют разные шкалы и пороговые значения для выделения клинически значимых результатов, проведена нормализация статистических данных с округлением до половины порядка для выравнивания количественных показателей. Поскольку метод МСММ имеет более низкие пороги чувствительности, в некоторых случаях это было причиной положительных результатов метода МСММ при отрицательных результатах метода ПЦР. Для сравнения относительных показателей, характеризующих связанные совокупности данных, использован критерий Мак-Немара, что продиктовано необходимостью независимости наблюдений в силу использования одних и тех же испытуемых, учёт признака выполняется на одних и тех же субъектах. Критерий Мак-Немара рассчитывался по формуле:

$$Q = \frac{b-c}{b+c},$$

где: Q – значение критерия Мак-Немара, b – число исследуемых с отрицательным результатом при первом наблюдении и положительным – при втором (в нашем случае результатом являлось количество проб в выборке, превышающих клинически значимое пороговое значение), c – число исследуемых с положительным результатом при первом наблюдении и отрицательным – при втором. Значения Q критерия Мак-Немара интерпрети-

ровались путём сравнения с табличными критическими значениями с принятым уровнем значимости $p=0,05$. Нулевая гипотеза H_0 проверяла существование статистически значимых различий между двумя выборками.

Результаты и обсуждение. У 20 добровольцев-волонтеров взяты пробы биоматериала из полости рта, утром, натощак, с соблюдением правил преаналитического этапа, предположительно содержащих различные микроорганизмы. После прободготовки проведён анализ видового и количественного состава микроорганизмов методами ПЦР и МСММ.

Метод ПЦР показал наличие *Prevotella* spp. в количестве, превышающем клинически значимый порог, у 3 из 20 добровольцев-волонтеров (15%). Методом МСММ детектирована *Prevotella* spp. в количестве, превышающем клинически значимый порог у 5 обследуемых из 20 (20%), $p<0,05$. Наличие *Porphyromonas gingivalis* в пробах микробиоты ротовой полости детектировано методом ПЦР в 4-х случаях (20%), методом МСММ в 6-ти случаях (30%), $p<0,05$.

Наличие *Candida* spp. выявлено обоими методами в равном количестве, $p>0,05$. Результаты статистического анализа показали, что для всех исследуемых видов пародонтопатогенных микроорганизмов нулевую гипотезу о независимости результатов исследований методами ПЦР и МСММ можно отвергнуть с высоким уровнем значимости $p>0,05$. В табл. 2 «ПЦР+» – количество проб в выборке, превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом ПЦР; «ПЦР-» – количество проб в выборке, не превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом ПЦР; «МСММ+» – количество проб в выборке, превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом МСММ; «МСММ-» – количество проб в выборке, не превышающих клинически значимое пороговое значение, полученное методом МСММ; Q – Значение распределения χ^2 для использования с критерием Мак-Немара с поправкой mid-P [23], p – критический уровень значимости при проверке статистической гипотезы.

При статистической обработке экспериментальных данных метод МСММ показал себя как более чувствительный при обнаружении пародонтопатогенов полости рта при сравнении с методом ПЦР, что позволяет рекомендовать его для диагностических алгоритмов и при проведении исследований в области стоматологии и микробиологии.

Заключение. Метод МСММ является эффективным для изучения видового и количественного состава микробиоты полости рта. Чувствительность МСММ не уступает методу ПЦР в индикации, идентификации и количественном анализе пародонтопатогенных микроорганизмов. Результаты, полученные методом МСММ, могут быть с большой достоверностью использованы в клинической практике.

Таблица 2

Таблица сопряжённости и результаты статистического анализа

Вид	ПЦР+/ПЦР-	МСММ+	МСММ-	Статистические показатели
<i>Prevotella</i> spp.	ПЦР+	2	1	Q=0.025, p=0.671
	ПЦР-	3	14	
<i>Candida</i> spp.	ПЦР+	0	2	Q=0, p=1
	ПЦР-	2	16	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ПЦР+	1	3	Q=0.125, p=0.7237
	ПЦР-	5	11	

Примечание. ПЦР+/ ПЦР- см. в тексте статьи, Q – значение распределения χ^2 для использования с критерием Мак-Немара с поправкой mid-P.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 7, 10, 14, 22
 см. REFERENCES)

- Стрельникова Н.В., Антонова А.А., Шаповаленко Е.С., Кислая А.И., Саргсян А.Г., Щегольская О.В. и др. Роль микробиологической идентификации условно-патогенных микроорганизмов слизистой оболочки языка при хронических пародонтиах. В кн.: Актуальные проблемы стоматологии детского возраста и ортодонтии. Сборник научных статей IX региональной научно-практической конференции с международным участием по детской стоматологии. Хабаровск; 2019:175-83.

3. Гизингер О.А., Штетинин С.А. Мониторинг микрофлоры поверхности глоточной миндалины у детей с хроническим аденоидитом, проживающих на территории Челябинска. *Вестник оториноларингологии*. 2016; 81 (1):33-6.
4. Зеленова Е. Г., Заславская М.И., Салина Е.В., Рассанов С.П. Микрофлора полости рта: норма и патология. Нижний Новгород: Издательство НГМА; 2004.
5. Ильин В. К., Шумилина Г.А., Соловьева З.О., Носовский А.М., Каминская Е.В. Некоторые показатели состояния полости рта и зубов космонавтов при полетах на международной космической станции. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2016; 50 (6): 25-30.
6. Правосудова Н. А., Мельников В. Л. Микробиология полости рта. Учебно-методическое пособие для студентов медицинских вузов. Пенза: ПГУ; 2013.
8. Червинцев В. М., Червинцев Ю.В., Леонтьева А.В., Козлова Е.А., Стулов Н.М., Беляев В.С. и др. Микробиом полости рта у больных пародонтитом, адгезивные и биоплёнообразующие свойства. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(1): 45-51.
9. Ушаков Р. В., Царёв В. Н. Антимикробная терапия в стоматологии. Принципы и алгоритмы. М.: Практическая медицина; 2019.
11. Мирсаева Ф. З., Ханов Т.В., Кузнецова Т.Н., Буйлова О.В. Видовой состав микрофлоры в содержимом пародонтальных карманов при обострении хронического генерализованного пародонтита. *Проблемы стоматологии*. 2018; 14(3):29-36.
12. Гладин Д. П., Королюк А. М., Дробот И. В., Козлова Н. С., Анненкова И. Д. Полимеразная цепная реакция в микробиологии. *Российские биомедицинские исследования*. 2021; 6(3): 36-46.
13. Годков М. А., Осипов Г.А., Федосова Н.Ф., Лядов К.В. Возможности масс-спектрометрии микробных маркеров в лабораторном мониторинге дисбиозов и инфекций. *Справочник заведующего КДЛ*. 2011; 7: 35-44.
15. Адеишвили П.С., Полеско И.В., Осипов Г.А., Федосова Н.Ф., Гусева Н.А., Колтунов И.Е. и др. Исследование микробиоценоза ротоглотки методом масс-спектрометрии микробных маркеров у детей с инфекционным мононуклеозом. *Детские инфекции*. 2012; 11(1):12-6.
16. Власов А. А. Саликова С.П., Гриневич В.Б., Быстрова О.В., Осипов Г.А., Мешкова М.Е. Микробиота кишечника и системное воспаление у пациентов с хронической сердечной недостаточностью. *Кардиология*. 2020; 60(5): 74-82.
17. Крымцева Т. А., Осипов Г. А., Бойко Н. Б., Соколов Я. А., Демина А. М., Радюшина Т. В. и др. Минорные жирные кислоты биологических жидкостей урогенитальных органов и их значимость в диагностике воспалительных процессов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2003; (2): 92-101.
18. Винницкая Е.В., Лазебник Л.Б., Осипов Г.А., Дроздов В.Н. Спонтанный бактериальный перитонит и системная воспалительная реакция у больных циррозом печени. *Терапевтический архив*. 2011; 83(2): 47-52.
19. Аврамов А.А., Ловтсевич Н.В., Осипов Г.А. Мониторинг инфекционно-воспалительного процесса у реанимационных пациентов методом масс-спектрометрии микробных маркеров в крови и ликворе. *Поликлиника*. 2019; (4-1):31-9.
20. Фёдорова Е.П., Осипов Г.А., Истомин О.А., Захаров Д.Д., Быстрова О.В. Установление расширенного состава микробного сообщества эндометрия при патологиях и значение данных в практике акушера-гинеколога. *Поликлиника*. 2021; (3): 34-9.
21. Осипов Г.А., Быстрова О.В., Ловтсевич С.М. Современный методический подход к неинвазивной оценке микробиологического статуса человека методом масс-спектрометрии микробных маркеров. Комплексный подход коррекции нарушения микробиологического статуса. *Терапевт*. 2020; (10): 53-9.
3. Gizinger O.A., Shchetinin S.A. Monitoring of the microflora of the surface of the pharyngeal tonsil in children with chronic adenoiditis living in the territory of Chelyabinsk. *Vestnik otorinolaringologii*. 2016; 81 (1): 33-6. (in Russian)
4. Zelenova E. G., Zaslavskaya M.I., Salina E.V., Rassanov S.P. Oral microflora: norm and pathology. Nizhnyy Novgorod: Izdatel'stvo NGMA; 2004. (in Russian)
5. Il'in V. K., Shumilina G.A., Solov'eva Z.O., Nosovskiy A.M., Kaminskaya E.V. Some indicators of oral and dental health of astronauts during flights on the international space station. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2016; 50 (6): 25-30. (in Russian)
6. Pravosudova N. A., Mel'nikov V. L. Oral Microbiology. Textbook for students of medical universities [Mikrobiologiya polosti rta. Uchebno-metodicheskoe posobie]. Penza: Penzenskiy gosudarstvennyi universitet; 2013. (in Russian)
7. Cafiero C., Matarasso S. Predictive, preventive, personalised and participatory periodontology: the 5Ps age has already started. *EPMA Journal*. 2013; 4(1): 1-29.
8. Chervinets V. M., Chervinets Yu.V., Leont'eva A.V., Kozlova E.A., Stulov N.M., Belyaev V.S. et al. Oral microbiome of periodontitis patients, adhesive and biofilm-forming properties. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2021; 66(1): 45-51. (in Russian)
9. Ushakov R. V., Tsarev V. N. Antimicrobial therapy in dentistry. Principles and algorithms. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2019. (in Russian)
10. Sampaio-Maia, B., Caldas, I. M., Pereira, M. L., Pérez-Mongiovi, D., Araujo, R. The oral microbiome in health and its implication in oral and systemic diseases. *Advances in applied microbiology*. 2016; 97:171-210.
11. Mirsaeva F. Z., Khanov T.V., Kuznetsova T.N., Buylova O.V. Species composition of microflora in the contents of periodontal pockets in exacerbation of chronic generalized periodontitis. *Problemy stomatologii*. 2018; 14(3):29-36. (in Russian)
12. Gladin D.P., Korolyuk A.M., Drobot I. V., Kozlova N.S., Annenkova I.D. Polymerase chain reaction in microbiology. *Rossiyskie biomeditsinskie issledovaniya*. 2021; 6(3): 36-46. (in Russian)
13. Godkov M. A., Osipov G.A., Fedosova N.F., Lyadov K.V. Possibilities of mass spectrometry of microbial markers in laboratory monitoring of dysbiosis and infections *Spravochnik zaveduyushchego KDL*. 2011; 7: 35-44. (in Russian)
14. Ilyin V.K., Moukhamediya L.N., Osipov G.A., Batov A. S., Soloviova Z.O., Mardanov R. M. et al. Non-cultural methods of human microflora evaluation for the benefit of crew medical control in confined habitat. *Acta Astronautica*. 2011; 68(9-10): 1529-36.
15. Adeishvili P. S., Polesko I.V., Osipov G.A., Fedosova N.F., Guseva N.A., Koltunov I.E. et al. Study of oropharyngeal microbiocenosis by mass spectrometry of microbial markers in children with infectious mononucleosis. *Detskie infektsii*. 2012; 11(1):12-6. (in Russian)
16. Vlasov A. A. Salikova S.P., Grinevich V.B., Bystrova O.V., Osipov G.A., Meshkova M.E. Gut microbiota and systemic inflammation in patients with chronic heart failure. *Kardiologiya*. 2020; 60(5): 74-82. (in Russian)
17. Krymteva T. A., Osipov G. A., Boyko N. B., Sokolov Ya. A., Demina A. M., Radyushina T. V. et al. Minor fatty acids in urogenital body fluids and their significance in the diagnosis of inflammatory processes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2003; (2): 92-101. (in Russian)
18. Vinnitskaya E.V., Lazebnik L.B., Osipov G.A., Drozdov V.N. Spontaneous bacterial peritonitis and systemic inflammatory response in patients with liver cirrhosis. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2011; 83(2): 47-52. (in Russian)
19. Avramov A.A., Lovtsevich N.V., Osipov G.A. Monitoring of infectious and inflammatory process in intensive care patients by mass spectrometry of microbial markers in blood and cerebrospinal fluid. *Poliklinika*. 2019; (4-1):31-9. (in Russian)
20. Fedorova E.P., Osipov G.A., Istomin O.A., Zakharov D.D., Bystrova O.V. Establishment of the expanded composition of the endometrial microbial community in pathologies and significance of the data in obstetrician-gynecologist practice. *Poliklinika*. 2021;(3): 34-9. (in Russian)
21. Osipov G.A., Bystrova O.V., Lovtsevich S.M. Modern methodological approach to noninvasive assessment of human microecological status by mass spectrometry of microbial markers. A comprehensive approach to the correction of microecological status disorders. *Terapevt*. 2020; (10): 53-9. (in Russian)
22. Fagerland M. W., Lydersen S., Laake P. The McNemar test for binary matched-pairs data: mid-p and asymptotic are better than exact conditional. *BMC medical research methodology*. 2013; 13(1): 1-8.

REFERENCES