



VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS

Odontologijos studijų programa

Odontologijos institutas

Justė Gladkauskaitė, V kursas, 2 grupė

VIENTISŪJŲ STUDIJŲ MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**Pacientų, turinčių seilėtekio sutrikimus ir sergančių periodonto liga, seilių
mikrobiotos sudėties ir atsparumo priešmikrobiniams junginiams genų
paplitimo tyrimas**

**Saliva Microbiota Composition and the Prevalence of Antimicrobial Resistance
Genes in Patients with Periodontal Diseases and Salivary Flow Disorders**

Darbo vadovė

Odontologijos instituto direktorė

Prof. dr. (HP) Alina Pūrienė

Prof. dr. Vilma Brukienė

Darbo konsultantė

Prof. dr. Eglė Lastauskienė

Vilnius, 2024 m.

Studento elektroninio pašto adresas: juste.gladkauskaite@mf.stud.vu.lt

TURINYS

SANTRUMPOS	3
SANTRAUKA	4
SUMMARY	6
IVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1. Burnos mikrobiota	8
1.1.1 Burnoje esančios mikroorganizmų buveinės	8
1.1.2. Burnos mikrobiotos sudėties pokyčiai	9
1.1.3. Išorinių veiksnių įtaka burnos mikrobiotai	10
1.1.4. Nesergančių periodonto ligomis, sveikų individų burnos mikrobiotos sudėtis	10
1.1.5. Seilių mikrobiotos sudėties ir kserostomijos ryšys	11
1.2. Periodonto ligos ir jų ryšys su burnos ertmės mikroorganizmais	12
1.3. Atsparumas antibakterinėms medžiagoms	14
1.3.1. Atsparumo priešmikrobiniams junginiams problema	14
1.3.2. Atsparumo antibiotikams plitimo priežastys	15
1.3.3. Savybinis-vidinis ir įgytas bakterijų atsparumas antibakteriniams preparatams	17
1.3.4. Genetinės mutacijos	17
1.3.5. Horizontalioji genų pernaša	18
1.3.6. Atsparumo antimikrobinėms medžiagoms genai	19
2. MEDŽIAGA IR METODAI	21
2.1. Tyrimo eiga, vietos ir tiriamoji populiacija	21
2.2. Klinikinis ištyrimas ir anketinė apklausa	22
2.3. Genominės DNR išskyrimas ir metagenomo sekvenavimas	23
2.4. Atsparumą antibiotikams koduojančių genų nustatymas	24
2.4.1. Polimerazės grandininė reakcija	24
2.4.2. Elektroferezės metodas	26
2.5. Statistinė analizė	26
3. REZULTATAI	27
3.1. Tyrimo dalyvių klinikinis ištyrimas ir genominės DNR išskyrimas	27
3.2. Atsparumo priešmikrobiniams junginiams paplitimas seilėse	28
3.3. Metagenomo sekvenavimas	29
3.3.1. Tiriamųjų apklausos duomenys, klinikinis ištyrimas ir jų paskirstymas į grupes	29
3.3.2. Metagenomo sekvenavimo analizės rezultatai	31
4. REZULTATŲ APTARIMAS	34
5. INTERESŲ KONFLIKTAI	42
6. IŠVADOS	42
PADĖKA	43
LITERATŪROS SĄRAŠAS	43

SANTRUMPOS

PGR – polimerazės grandininė reakcija

DNR – dezoksiribonukleininė rūgštis

rRNR – ribosominė ribonukleininė rūgštis

Bp – bazių pora

CPI_m – modifikuotas periodonto būklės indeksas (angl. *the modified Community Periodontal Index*)

BOP – kraujavimas po zondavimo (angl. *bleeding on probing*)

OTU – taksonominiai vienetai (angl. *operational taxonomic units*)

AAM – atsparumas antimikrobinėms medžiagoms

MRSA – meticilinui atsparus *Staphylococcus aureus*

ESAC-Net – Europos antimikrobinių medžiagų suvartojimo stebėjimo tinklas

SD – standartinis nuokrypis

PSO – pasaulio sveikatos organizacija

SANTRAUKA

Pavadinimas. Pacientų, turinčių seilėtekio sutrikimus ir sergančių periodonto liga, seilių mikrobiotos ir atsparumo priešmikrobiniais junginiams genų paplitimo tyrimas.

Problemos aktualumas ir darbo tikslas. Seilės yra gausiai mikroorganizmais apgyvendinta terpė, jungianti visas burnos buveines. Žinoma, jog periodontitą sukelia ne pavieniai mikroorganizmai, o jų disbiozė. Nenagrinėta, kokia mikrobiota vyrauja lietuvių, sergančių periodonto ligomis, seilėse. Įvairūs seilių mikroorganizmai gali turėti atsparumo priešmikrobiniais junginiams genus ir, dėl savo gebėjimo horizontaliu būdu keistis genetinė medžiaga, sukelti grėsmę burnos ir kitų organizmo sričių gydymui. Šio darbo tikslas – įvertinti asmenų, turinčių seilėtekio sutrikimus ir sergančių periodonto liga, seilių mikrobiotos sudėtį bei nustatyti atsparumo priešmikrobiniais junginiams genų paplitimą.

Medžiaga ir metodai. Klinikinio ištyrimo metu atlikta nestimuluota pilna sialometrija ir anketinė apklausa. Tiriamieji paskirstyti į grupes pagal jų periodonto būklę, įvertintą modifikuotu periodonto būklės CPI indeksu. Seilių bakterijų nustatymui atliktas metagenomo sekvenavimas naudojant 16S rRNR geno V3 ir V4 amplikonus. Mikrobiotos sudėtis palyginta tarp grupių, sudarytų remiantis periodonto ligų indeksu. Taikant polimerazės grandininės reakcijos ir elektroforezės metodus atlikta atsparumo priešmikrobiniais junginiams genų analizė. Statistinė analizė atlikta naudojant IBM SPSS 29.0 programinį paketą.

Rezultatai. Visų 55 tiriamųjų seilėse nustatytas bent vienas atsparumo priešmikrobiniais junginiams genas. Labiausiai paplitę ($n=54$, 98,2 proc.) *bla_{TEM}* ir *tetM* genai. Metagenomo sekvenavimo analizė atlikta 34 tiriamųjų seilėse. Iš jų: 13 (38,2 proc.) sirgo gingivitu (CPI_m 1), 12 (35,3 proc.) turėjo 4-5 mm periodonto kišenes (CPI_m 3), 9 (26,5 proc.) turėjo 6 mm ir gilesnes periodonto kišenes (CPI_m 4). Palyginus grupes tarpusavyje genčių lygmenyje CPI_m 4 grupėje dominavo *Prevotella*, CPI_m 3 – *Streptococcus*, CPI_m 1 – *Leptotrichia* ir *Neisseria*. Pacientų, turinčių gilesnes nei 4 mm kišenes, seilėse aptiktas didesnis periodonto patogenų, tokių kaip *Treponema*, *Porphyromonas*, santykinis kiekis lyginant su sergančiais gingivitu. CPI_m 4 grupėje nustatyta santykinai daugiau: *Filifactor*, *Selenomonas*, *Fusobacterium*, o CPI_m 3 grupėje – *Haemophilus* genties bakterijų.

Išvados. Skirtingos periodonto būklės tiriamųjų seilių mikrobiotos taksonominis santykinis gausumas reikšmingai nesiskyrė, tačiau grupėse, turinčiose gilesnes nei 4 mm periodonto kišenes, rastas didesnis periodonto patogenų gausumas. Nustatyti kliniškai svarbūs atsparumo priešmikrobiniais junginiams genai, galintys lemti atsparumą vaistams ir nesėkmingą gydymą. Tolimesni tyrimai yra reikalingi norint įgyti visapusišką supratimą apie seilių mikrobiotos ypatumus bei atsparumo priešmikrobiniais junginiams genų paplitimo tendencijas.

Raktiniai žodžiai: seilių mikrobiota, 16S rRNR geno metagenomo sekvenavimas, periodonto ligos, periodontitas, atsparumas antibiotikams, atsparumo antimikrobiniais junginiais genai.

SUMMARY

Title. Saliva Microbiota Composition and the Prevalence of Antimicrobial Resistance Genes in Patients with Periodontal Diseases and Salivary Flow Disorders.

Relevance of the problem and aim of the work. Saliva, rich in microorganisms, links all areas of the mouth. It is known that periodontitis is not caused by individual microorganisms, rather by their dysbiosis. However, the saliva microbiota of Lithuanians with periodontal diseases has not been analysed yet. Various saliva microorganisms might exhibit antimicrobial resistance genes and complicate the treatment of oral and systemic diseases. Therefore, this thesis aims to analyse the saliva microbiota composition of individuals with periodontal diseases and salivary flow disorders and to establish the prevalence of antimicrobial resistance genes.

Material and methods. During clinical examinations, unstimulated whole saliva sialometry and a questionnaire survey were conducted. Metagenome sequencing using the 16S rRNA gene was employed to identify saliva bacteria. The data on microbiota composition was compared between groups, formed according to the modified Community Periodontal Index. The polymerase chain reaction and electrophoresis methods were applied to analyse the antimicrobial resistance genes. IBM SPSS 29.0 software was used for the statistical analysis.

Results. Study revealed that the saliva of all 55 tested contained at least one antimicrobial resistance gene. The most prevalent (n=54, 98,2%) were the *bla_{TEM}* and *tetM* genes. Metagenome analysis of the saliva of 34 individuals showed that 13 (38,2%) suffered with gingivitis (CPI_m 1), 12 (35,3%) had periodontal pockets of 4-5 mm (CPI_m 3), 9 (26,5%) exhibited the periodontal pockets of 6 mm and deeper (CPI_m 4). Group comparison at the genera level revealed dominant bacteria: *Prevotella* in CPI_m 4, *Streptococcus* in CPI_m 3, both *Leptotrichia* and *Neisseria* in CPI_m 1. The saliva of individuals in CPI_m 3 and CPI_m 4 groups had higher relative quantities of *Treponema* and *Porphyromonas* compared to those with gingivitis. Lastly, CPI_m 4 showed relatively higher presence of *Filifactor*, *Selenomonas*, and *Fusobacterium*, while CPI_m 3 – *Haemophilus*.

Conclusions. The taxonomic relative abundance of saliva microbiota in individuals with different periodontal conditions did not differ significantly; however, in the groups with the periodontal pockets deeper than 4 mm, substantial abundance of periodontal pathogens was found. Antimicrobial resistance genes, potentially causing resistance to medication and treatment failure, were identified. However, further research is needed so that a complete and comprehensive understanding on the qualities of saliva microbiota and the prevalence of resistant genes would be formed.

Keywords: saliva microbiota, 16S rRNA metagenome sequencing, periodontal diseases, periodontitis, antibiotic resistance, antimicrobial resistance genes.

IVADAS

Problema ir jos aktualumas

Tradiciškai burnos mikroorganizmai tiriami kultivuojant, t.y. auginant bakterijas specifinėse mitybinėse terpėse, tačiau didelė dalis mikroorganizmų negali būti tradiciškai kultivuojami (1). Progresuojančios metagenomo sekvenavimo technologijos leidžia atskleisti vis daugiau informacijos apie žmogaus burnos mikrobiotą (2). Žinoma, kad ji skiriasi priklausomai nuo tiriamo mėginio paėmimo lokalizacijos (pavyzdžiui, seilių, liežuvio ar gleivinės nuograndų, minkštojo apnašo) (2–4). Kokia seilių sudėtis vyrauja sergant periodonto ligomis ir turint seilėtekio sutrikimus, pasaulyje iki šiol netirta, tad šis tyrimas galėti suteikti naujų vertingų žinių.

Atsparumas antimikrobinėms medžiagoms tapo viena pagrindinių XXI amžiaus visuomenės sveikatos problemų, keliančių grėsmę kokybiškam gydymui ir efektyviai ligų ir jų komplikacijų prevencijai dėl vis daugėjančių infekcijų, atsparių įprastai naudojamiems antibakteriniams preparatams (5). Kiekvienai antibakterinių preparatų klasei yra išsivystęs bent vienas atsparumo mechanizmas, sumažinantis vaisto veiksmingumą arba jį eliminuojantis (6). Dalis bakterijų turi prigimtinių-savybinių atsparumą, tačiau daugelio kliniškai reikšmingų bakterijų atsparumo antibakterinėms medžiagoms mechanizmų yra įgyti (7). Vienas iš svarbiausių bakterijų evoliucijos veiksmų yra genetinės informacijos pasikeitimas tarp dviejų skirtingų ar tos pačios rūšies bakterijų. Būtent horizontalios genų pernašos būdas leidžia bakterijoms perduoti atsparumo antibiotikams genus net ir kitos rūšies bakterijoms (8). Jau XX a. viduryje pastebėta, kad dėl horizontalios genų pernašos sparčiai vystosi įvairių atsparių antibiotikams mikroorganizmų padermės (9).

Seilėse esančių bakterijų atsparumas antibakteriniams preparatams kelia grėsmę ne tik burnos, bet ir kitų organizmo sričių infekcijų gydymui. Seilės yra įvairių mikroorganizmų, įskaitant ir bakterijas, kurios gali turėti antibiotikų atsparumo genus, rezervuaras. Žinios apie atsparumo antibiotikams genų buvimą seilių mikroorganizmuose galėtų padėti įgyti gilesnį supratimą apie atsparumo antibakteriniams vaistams mechanizmus, paplitimą specifinėje aplinkoje ir suteiktų galimybę sekti atsparumo plitimo tendencijas populiacijoje. Šios žinios ypatingai svarbios kuriant veiksmingą infekcijų kontrolę ir naujas strategijas, skirtas užkirsti kelią antibiotikų atsparumo plitimui bei esamų antibakterinių preparatų veiksmingumo išsaugojimui.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas: Įvertinti asmenų, turinčių seilėtekio sutrikimus ir sergančių periodonto liga, seilių mikrobiotos sudėtį bei nustatyti atsparumo priešmikrobiniais junginiais genų paplitimą natūraliose mikroorganizmų populiacijose.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti seilių mikroorganizmų skirtumus tipų lygmenyje pagal tiriamųjų modifikuotą CPI indeksą.
2. Įvertinti seilių mikroorganizmų skirtumus genčių lygmenyje pagal tiriamųjų modifikuotą CPI indeksą.
3. Nustatyti atsparumo priešmikrobiniais junginiams genų paplitimą tiriamųjų seilėse.
4. Palyginti atsparumo priešmikrobiniais junginiams genų paplitimą seilėse pagal tiriamųjų modifikuotą CPI indeksą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Burnos mikrobiota

Burnoje nustatyta virš 700 bakterijų rūšių, tai yra antra pagal dydį ir įvairovę mikrobiota po žarnyno. Išplėstoje žmogaus burnos mikrobiomo duomenų bazėje (*angl. the Expanded Human Oral Microbiome Database, eHOMD*) pateikiama informacija apie 772 bakterijų rūšis aptiktas burnoje ir viršutiniuose kvėpavimo takuose, iš kurių apie 70 proc. yra tradiciškai kultivuojamos, o likusi dalis priklauso nekultivuojamų bakterijų grupei (10). Iš visų bakterijų apie 54 proc. priskirti oficialūs pavadinimai, o likę 46 proc. bakterijų pavadinimų neturi: 32 proc. žinomi kaip nekultivuojami filotipai, 14 proc. – kultivuojami (11). Iš dešimtmečių darbo burnos mikrobiologijos srityje žinome, kad burnos mikrobiotą sudaro sudėtinga mikroorganizmų visuma. Nors įvairūs metodai, tarp jų ir atskirų bakterijų padermių auginimas specifinėse mitybinėse terpėse praplėtė turimas žinias, 16S rRNR sekvenavimas suteikė galimybes aptikti nežinomas ir neužauginamas bakterijas (3).

1.1.1 Burnoje esančios mikroorganizmų buveinės

Burna yra kompleksinė, sudėtinga ekosistema, kadangi bakterijos gali gyvuoti ir daugintis tiek ant minkštųjų audinių, tiek ant kietųjų danties audinių, tad liežuvis, dantenu vagelės, žandų gleivinė, kietasis ir minkštasis gomurys, dantų paviršiai yra palanki terpė mikroorganizmams klestėti. Šiose nišose mikroorganizmai gali rasti idealias sąlygas formuoti funkcinės ir struktūrinės kolonijas – bioplėveles, kurias gaubianti ekstraląstelinė polimerinė matrica padidina bakterijų adheziją, jų bendruomenės stabilumą ir apsaugą nuo išorinių poveikių (12). Mikroorganizmų bioplėvelės formuojasi ant liežuvio nugarėlės, žandų gleivinės, dantų paviršių ir dantenu vagelėse (13). Susiformavusi burnos mikrobiota vystosi kartu su šeimininku palaikydama dvipusį simbiotinį ryšį (14). Subalansuotai mikroflorai vežėti padeda stabilios burnos aplinkos sąlygos: 37°C temperatūra

bei seilių pH svyruojanti nuo 6,5 iki 7,5 yra palankios daugumai bakterijų rūšių (2). Be to, seilės atlieka ir kitas svarbias funkcijas, kurios reguliuoja ir palaiko subalansuotą, sveiką burnos mikrobiotą: 1) ant kietųjų ir minkštųjų burnos paviršių iš glikoproteinų suformuoja pelikulę, kuri yra pagrindas pradinei bakterijų adhezijai bei apsauginis difuzinis barjeras, 2) iš burnos pašalina mikroorganizmus ir maisto likučius, pavyzdžiui, rūgštis ir angliavandenius, 3) dėl sudėtyje esančių baltymų, turinčių antibakterinį poveikį (lizocimo, peroksidazės, laktoferino, histatino, imunoglobulinų A ir M) atlieka apsauginę funkciją, slopina patogeninių mikroorganizmų augimą, 4) drėkina mikroorganizmus bei aprūpina juos maisto medžiagoms veikdamos kaip transportavimo terpę (14,15).

Burnoje esantys paviršiai, nors ir sujungti seilėmis, sudaro atskiras buveines ir sukuria iš dalies skirtingas aplinkos sąlygas, tad mikrobiotos sudėtis skiriasi priklausomai nuo lokalizacijos (2–4). Ant liežuvio paviršiaus gausu spenelių su nedideliu kiekiu anaerobinių nišų, todėl aptinkama itin gausi ir įvairi mikroflora, apimanti ir anaerobines bakterijas (2). Žandų ir gomurio gleivinės mikrobiota pasižymi mažiausia bakterijų įvairove, priešingai nei kietieji danties audiniai, ant kurių sparčiai besiformuojantis apnašas pagreitina įvairių bakterijų akumuliacijos procesus (16). Tačiau savaiminio burnos apsivalymo metu, priklausomai nuo seilių tėkmės srauto ir greičio įvairiose nišose, mikrobiotos sudėtis kinta, iš kitos pusės pati seilių sudėtis papildoma gausiais skirtingų lokacijų mikroorganizmais (3). Tad seilėse aptinkami visų burnos buveinių mikroorganizmai, ypač liežuvio nugarinio paviršiaus bakterijos (13). Mažai tikėtina, kad burnoje tam tikri mikroorganizmai bus aptinkami išskirtinai tik vienoje vietoje, kadangi bakterijos, patenka į seiles ir yra išnešiojamos į visas nišas (3). Tad seilės pripažintos kaip visų burnos ekologinių nišų mikroorganizmų rezervuaru (17).

1.1.2. Burnos mikrobiotos sudėties pokyčiai

Atsižvelgus į aplinkos sąlygas bakterijas galima išskirti į dvi pagrindines grupes: aerobines, priklausančias nuo deguonies, ir anaerobines – gyvuojančias aplinkoje, neturinčioje laisvojo deguonies (15). Aerobai sąveikaudami su deguonimi, sukuria aplinką anaerobams klestėti. Pavyzdžiui, bakterijos geba sukurti anaerobinę aplinką 20 µm atstumu nuo deguonies prisotinto bioplėvelės paviršiaus (3). Šių mikroorganizmų tarpusavio koagregacijos dėka formuojasi kolonizacijos, lemiančios bioplėvelės formavimąsi burnoje (15). Bioplėvelės sudėtyje esančios bakterijos tampa mažiau pažeidžiamos ir atsparesnės išoriniams veiksniams. Mikrobinės ekosistemos pusiausvyrą palaikoma tuomet, kai burnos mikroorganizmus tarpusavyje bei su šeimininku jungia simbiotiniai (mutualistiniai ir komensalistiniai) ryšiai (15). Tačiau, pasikeitus aplinkos sąlygoms, dėl patogeninių bakterijų kiekio pagausėjimo, sutrinka simbiotinė sąveika ir įvyksta mikrobiotos svyravimai. Šis procesas, kai pakinta normali mikrobiotos sudėtis ir savybės yra žinomas kaip disbiozė (18). Pasak Peterson ir Round (2014), disbiozė galima apibūdinti trimis skirtingais

kriterijais, kurie vienas kito nepaneigia ir gali pasireikšti vienu metu: a) mikroorganizmų įvairovės praradimas, b) naudingų mikroorganizmų praradimas, c) patogeninių mikroorganizmų pagausėjimas (19). Iki šiol nemaža dalis padarytų tyrimų atskleidė ne tik burnos mikrobiotos disbiozės ryšį su burnos ligomis, tačiau pastebėjo ir ryšį tarp burnos ir sisteminių ligų. Pro burną mikroorganizmai patenka į ryklę, tonziles, plaučius, ausies trimitą, vidurinę ausį ir kitas organizmo vietas. Tad nemaža dalis tyrimų aprašė tiesioginį burnos mikrobiotos poveikį kitoms organizmo sistemoms ir ligoms, kaip diabetas, pneumonija, priešlaikinis gimdymas, onkologinės ar širdies ir kraujagyslių ligos (11,13,18). Pavyzdžiui, padidėjęs *Lactobacillus* genties santykinis kiekis ir sumažėjęs *Haemophilus*, *Neisseria*, *Aggregatibacter* genčių santykinis gausumas buvo stebimas pacientų, sergančių galvos ir kaklo plokščialąsteline karcinoma, seilėse (15).

1.1.3. Išorinių veiksnių įtaka burnos mikrobiotai

Burnos mikrobiotos formavimasis yra dinamiškas procesas, kuris apima ir išorinių veiksnių, tokių kaip rūkymas, gyvenamoji vieta, sąveiką (3,17,20). Li ir kt. (2014) palygino seilių sudėtį Afrikos, Aliaskos ir Vokietijos gyventojų tarpe ir nustatė, kad afrikiečių seilių mikrobiota tipų lygmenyje labiausiai skyrėsi nuo kitų žemynų tautų (20). Tyrėjai pastebėjo didesnius *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijas (pavyzdžiui, *Klebsiella*, *Escherichia*) kiekius afrikiečių seilėse. Tikėtina šios šeimos mikroorganizmų paplitimo priežastis yra šiltesnis klimatas, nes didesnė nei 37°C temperatūra yra itin palanki jų augimui (20). Mason ir kt. (2015) atskleidė burnos mikrobiotos skirtumus tarp nesergančių sisteminėmis ir periodonto ligomis rūkančių ir nerūkančių pacientų (21). Sveikų rūkančiųjų burnos mikrobiota buvo praturtinta anaerobais, periodonto ir sisteminiais patogenais, kaip *Fusobacterium naviforme*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Dialister microaerophilus*, aerobais – *Pseudomonas alactolyticus*, o komensalinių – sveikatai palankių bakterijų, kaip *Streptococcus sanguinis*, *Neisseria subflava*, *Haemophilus parainfluenza*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces dentalis*, *Actinomyces israelii* santykinis kiekis buvo mažesnis palyginus su nerūkančiais tiriamaisiais (21). Rezultatus patvirtina ir kitų autorių tyrimai, kuriuose stebima anaerobinių bakterijų pagausėjimo tendencija rūkančiųjų seilėse (22).

1.1.4. Nesergančių periodonto ligomis, sveikų individų burnos mikrobiotos sudėtis

Sveikų, nesergančių periodontitu, suaugusių pacientų seilių mikrobiotoje dominuoja ir 96 proc. sudaro 6 bakterijų tipai: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* ir *Spirochaetes* (23). Almeida ir kt. (2020) atliktas 16S rRNR V3-V4 sričių metagenomo sekvenavimas atskleidė padidėjusį *Bacteroidota* ir *Fusobacteria* tipų santykinį gausumą tiriamųjų, nesergančių

periodonto ligomis, seilėse (24). Taip pat, naudojant 16S rRNR sekvenavimą, Bik ir kt. (2010), ištyrė 10 sveikų individų burnos mikrobiotos sudėtį ir nustatė dominuojančias gentis ir jų santykinį gausumą: *Streptococcus* (19,2 proc.), *Haemophilus* (11,7 proc.), *Neisseria* (9,2 proc.), *Prevotella* (8,6 proc.), *Veillonella* (8,6 proc.) ir *Rothia* (7,2 proc.) (25). Kitas tyrimas nurodė aptiktus *Derxia* ir *Leptotrichia* bakterijų genčių didesnius kiekius sveikų individų burnos mikrobiotoje (26). Sveikų tiriamųjų seilėse *Leptotrichia* genties pagausėjimą patvirtino ir Almeida ir kt. (2020) atliktas tyrimas (24). Literatūros apžvalgoje, aprašytas didesnis *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Granulicatella* genčių aptikimas sveikų tiriamųjų burnos mikrobiotoje (27). Nei viename iš šių tyrimų nebuvo tiriami nesergantys periodonto liga, bet turintys seilėtekio sutrikimus.

1.1.5. Seilių mikrobiotos sudėties ir kserostomijos ryšys

Apskaičiuota, kad pasaulyje kserostomijos (burnos sausumo) paplitimas siekia 10 proc. – 50 proc. (28). Nepaisant to, kad kserostomijos rodikliai įvairiose šalyse labai varijuoja dėl taikomų skirtingų tyrimo metodų, manoma, kad vidutinis kserostomijos paplitimas siekia 22 proc. (29). Mokslinėje literatūroje iškelta hipotezė, kad dėl sumažėjusios seilių sekrecijos atsiradęs burnos sausumas keičia burnos mikrobiotą, kas buvo patvirtinta Rusthen ir kt. (2019) (30). Tyrėjų atliktas 16S rRNR sekvenavimas atskleidė seilių mikrobiotos skirtumus tarp sveikų ir turinčių seilėtekio sutrikimus (30). Tipų lygmenyje *Proteobacteria* ir *Bacteroidota* kiekis buvo gausesnis sveikų tiriamųjų seilėse (atitinkamai 12,7 proc. ir 35 proc.) lyginant su turinčiais seilėtekio sutrikimus (atitinkamai 8,5 proc. ir 26 proc.) (30). Genčių lygmenyje didžiausias santykinis gausumas aptiktas: *Prevotella* (*Bacteroidota*), *Veillonella* ir *Streptococcus* (*Firmicutes*), *Haemophilus* (*Proteobacteria*) (30). Didžiausias santykinio gausumo skirtumas tarp sveikų ir turinčių seilėtekio sutrikimus pastebėtas *Veillonella* (atitinkamai 18 proc. ir 27 proc.), *Haemophilus* (atitinkamai 7 proc. ir 1 proc.) genčių lygmenyje (30). Tik genties *Haemophilus* santykinio gausumo skirtumas tarp grupių buvo statistiškai reikšmingas (30). Priešingai nei Rusthen, Belstrøm ir kt. (2016) padarė išvadas, kad dantų ir dantenų sveikatos būklė, o ne sumažėjęs seilėtekis lemia seilių mikrobiotos svyravimus (31). Vis daugėja tyrimų, nagrinėjančių sveikų ir sergančių kserostomija seilių mikrobiotos sudėties skirtumus, su tikslu ateityje seilių mikrobiotos tyrimus naudoti kaip kserostomijos diagnostikos priemonę. Deja, tyrimų nagrinėjančių pacientų, turinčių seilėtekio sutrikimus bei sergančių periodonto ligomis, prieinamoje mokslinėje literatūroje nerasta.

1.2. Periodonto ligos ir jų ryšys su burnos ertmės mikroorganizmais

Dantenos, danties šaknies cementas, alveolinis kaulas ir juos jungiantys raiščiai – tai dantį supantys atraminiai audiniai, bendrai vadinami periodontu (32). Periodonto ligos yra pasaulinė visuomenės sveikatos problema, paveikianti apie 20 – 50 proc. viso pasaulio žmonių (33). Gingivitas ir periodontitas yra dažniausios periodonto ligos, sukeltos bakterinio dantų apnašo. Periodontitas vyrauja vyresnių žmonių tarpe, todėl prognozuojama, kad ateityje periodonto ligų paplitimas dar labiau didės dėl bendro populiacijos senėjimo (33).

Gingivitas – grįžtamas dantenų uždegimas, kuris pasireiškia dantenų paraudimu, patinimu bei kraujavimu valant dantis šepetėliu. Pašalinus minkštąjį apnašą ir konkrementus, užtikrinus tinkamą individualią burnos higieną, dantenos sėkmingai sugyja. Nekontroliuojamas ir negydomas gingivitas gali progresuoti į periodontitą – sunkesnę, negrįžtamą ligos formą, kuri pasireiškia ne tik dantenų uždegimu, bet ir periodonto raiščio bei alveolinio kaulo destrukcija (14). Periodonto kišenės, periodonto jungties netekimas, radiologiškai įvertinama alveolinio kaulo rezorbcija, kraujavimas ar pūliavimas po zondavimo, dantų paslankumas yra klinikiniai periodontito požymiai, vėlesnėje stadijoje lemiantys dantų netekimą (14). Dantų netekimas sukelia kramtymo, kalbos funkcijų sutrikimą, šypsenos estetikos suprastėjimą kas lemia sergančio individo gyvenimo kokybės sumažėjimą (34). Įrodyta, kad patogeninės bakterijos ir jų metabolizmo produktai, per dantenų vageles ar pažeistą burnos gleivinę patenka į kraujotaką ir gali nukeliauti į tolimesnes organizmo vietas. Mokslininkai vis dar tyrinėja ir bando įsigilinti į atrastus ryšius tarp periodontito ir sisteminių ligų, kaip diabetas, medžiagų apykaitos sutrikimai ir nutukimas, kvėpavimo takų sutrikimai, širdies ir kraujagyslių ligos, Alzheimerio liga bei vėžiniai susirgimai (35). Pavyzdžiui, Dominy ir kt. (2019) aptiko vieną pagrindinių periodonto patogenų *Porphyromonas gingivalis* Alzheimerio liga sergančių pacientų smegenyse, be to, tyrime su pelėmis nustatė, kad *P. gingivalis* kolonizacija smegenyse padidino amiloidinių plokštelių kaupimąsi (36). Be to, nustatytas ryšys tarp periodontito patogeno *Fusobacterium nucleatum* pagausėjimo ir uždegiminių žarnyno ligų (opinis kolitas, Krono liga). Žinoma, jog šios ligos padidina kolorektalinio (storiosios žarnos) vėžio išsivystymo tikimybę. Mokslinėje literatūroje aprašoma ne tik burnos patogeno *F. nucleatum* sąsaja su kolorektaliniu vėžiu, bet ir teigiamas ryšys su limfmazgių metastazėmis (37). Tad reikalinga atlikti dar daugiau tyrimų, nagrinėjančių periodontito ir sisteminių ligų sąsają, nes tokios žinios suteiktų galimybę kurti veiksmingas ligų prevencijos ir gydymo strategijas.

Periodonto ligų pradžia yra normalios burnos mikrofloros pasikeitimo rezultatas. Prasta individuali burnos higiena lemia bakterinio apnašo akumuliaciją ir dėl didėjančio gramneigiamų bakterijų kiekio - mikrobiotos disbiozę (35). Ilgą laiką buvo manoma, kad periodontitą sukelia pavienių patogeninių bakterijų pagausėjimas, tačiau tobulėjant bakterijų sekvenavimo

technologijoms nustatyta, kad periodontitas yra polimikrobinės kilmės pažeidimas, sukeltas mikrobiotos disbiozės (35). Nepagerinus burnos higienos, negydoma disbiozė kliniškai pasireiškia dantenų uždegimu (35). Pagausėjus patogenų kiekiui, jų išskiriami virulentiškumo veiksniai leidžia jiems įsitvirtinti, daugintis bei nukonkuruoti komensalines bakterijas ir taip sudaryti sąlygas periodontito ligos pasireiškimui (38). 1998 m. Socransky su bendraautoriais aprašė 5 pagrindinių mikroorganizmų kompleksų vaidmenį subgingivalinėje burnos plėvelėje (39). Geltonasis (*Streptococcus* rūšys) ir violetinis (*Veillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*) kompleksai buvo susieti su sveikais periodonto audiniais, tuo tarpu oranžinis (*Fusobacterium*, *Campylobacter* ir *Prevotella* rūšys) ir ypatingai raudonasis (*Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* *Porphyromonas gingivalis*) kompleksai buvo reikšmingai susiję su giliomis periodonto kišenėmis ir periodontito progresavimu (39). Gilesnėse periodonto kišenėse susidaro mažai deguonies turinti aplinka, tad šioje srityje gausiau aptinkama treponemų ir kitų anaerobų lyginant su negiliomis periodonto kišenėmis ir viršdanteniniu minkštuosiu apnašu (3).

Jiang ir kt. (2021) publikuota metaanalizė atskleidė, kad santykinis *Treponema denticola*, *Tannerella Forsythia* ir *Porphyromonas gingivalis* gausumas pacientų sergančių periodonto ligomis podanteninių apnašų mėginiuose buvo reikšmingai didesnis nei seilėse (40). Tačiau palyginus sveikų ir periodontitu sergančių pacientų seilių mikrobiotos pokyčius, pastarojoje grupėje nustatytas reikšmingas didesnis „raudonojo“ komplekso bakterijų gausumas (40). Tad galima svarstyti, kad padidėjus šių patogenų kiekiui podanteninėse apnašose, dalis gali būti išplauta į seiles, taip padidinant patogeninių bakterijų kiekį seilėse (40). Ir kiti autoriai pastebėjo, kad šie mikrobiologiniai pokyčiai apnašose gali pakeisti ir seilių sudėtį (22). Remiantis atliktais tyrimais galima konstatuoti, kad podanteninio apnašo periodonto kišenėse mikrobiotos sudėtis geriausiai atvaizduoja periodontito ligos atsiradimą ir vystymąsi, o tam tikri pokyčiai stebimi ir seilėse.

Tad istoriškai „raudonojo komplekso“ rūšys buvo laikomos pagrindiniais infekciniais mikroorganizmais, susijusiais su periodontitu, tačiau šie duomenys buvo gauti atlikus kultūrinius tyrimus, kurie surinktuose mėginiuose nenustatė daugybės kitų bakterijų ir jų įvairovės (27). Tobulėjant technologijoms, pavyzdžiui, naujos sekos sekoskaita (angl. *Next Generation sequencing*) išskyrė ir aprašė kitus mikroorganizmus, susijusius su periodontito išsivystymu, kaip *Clostridia*, *Negativicutes*, *Erysipelotrichia* klasės, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Synergistes* gentys ar *Filifactor alocis* rūšis (27). Ir priešingai, atskleidė mikroorganizmus, kurie yra susiję su periodonto sveikata, pavyzdžiui filogenetiniai tipai *Firmicutes* (*Bacilli* klasė), *Proteobacteria* ar gentys *Streptococcus*, *Actinomyces*. Pradinės bioplėvelės stadijose dažnai koagreguojasi skirtingų genčių bakterijos, pavyzdžiui, *Streptococcus*, *Actinomyces* ir *Veillonella*, o streptokokai gali koagreguotis ir genties viduje (23). Šie pradiniai kolonizatoriai, turi ribotą koagregacijos laipsnį su periodonto patogenais, tačiau nustatyta, kad *Fusobacterium* genties mikroorganizmai veikia kaip jungiamoji grandis tarp

ankstyvųjų ir vėlyvųjų kolonizatorių. Šios bakterijos, naudodamos apoptozės baltymus Fap2 ir RadD, sąveikauja su pradiniais kolonizatoriais bei su periodonto patogenais ir kitomis bakterijomis, esančiomis brandžiame dantų apnaše (37). Tokiu būdu pradinės bioplėvėlės sudėtis papildoma ir periodonto patogenais, sukeliančiais gingivitą ir periodontitą.

Ge ir kt. tyrime (2013) nagrinėjo pacientų, sergančių lėtiniu periodontitu, podanteninio apnašo mikrobiotos sudėtį lygindami tų pačių tiriamųjų galias (>5 mm) ir seklias (ne daugiau 3 mm) periodonto kišenes (41). Mikrobiotoje dominavo 5 pagrindiniai filogenetiniai tipai: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, kurie visiškai atitinka ir ankstesnius burnos mikrobiotos tyrimus (24,42). Autoriai nustatė, kad *Firmicutes*, *Proteobacteria* ir *Actinobacteria* santykinis gausumas sumažėjo, bet *Bacteroidota* santykinis kiekis padidėjo giliose periodonto kišenėse (41). Taip pat, *Fusobacterium* ir *Porphyromonas* genties lygmenyje nustatė statistiškai reikšmingą padidėjimą giliose periodonto kišenėse lyginant su negiliomis (iki 3 mm). Be to, aptiko minėtų periodonto patogenų didesnius santykinius kiekius giliose periodonto kišenėse (41).

Nepaisant to, burnos mikrobiotos sudėties ir įvairovės skirtumai tarp sveikų ir sergančių periodonto ligomis dar išlieka diskusijos objektas, nes tyrėjų aprašomi rezultatai varijuoja, o neretai ir prieštarauja vieni kitiems.

1.3. Atsparumas antibakterinėms medžiagoms

1.3.1. Atsparumo priešmikrobiniams junginiams problema

Atsparumas antimikrobinėms medžiagoms atsiranda, kai mikroorganizmai, įskaitant bakterijas, virusus, grybelius išsivysto savybes, padedančias išvengti šių medžiagų poveikio (43). Atsparumas antimikrobinėms medžiagoms tapo viena iš pagrindinių XXI amžiaus visuomenės sveikatos problemų, keliančių grėsmę gydymui ir efektyviai prevencijai vis daugėjančių infekcijų, kurias sukelia bakterijos, virusai ar grybeliai, atsparūs įprastai naudojamiems vaistams (5). Didžiulį nerimą kelia vis didėjantis bakterijų, atsparių kelioms skirtingoms ar daugeliui antimikrobinų medžiagų, kiekis. Tokios bakterijos geba sukelti daugeliui vaistų atsparias infekcijas (5). Antibiotikai tampa vis neveiksmingesni, nes atsparumas šiems vaistams plinta visame pasaulyje, tad įvairios infekcijos, pavyzdžiui, sukeltos MRSA, yra sunkiau gydomos ir dažniau sukelia letalines išeitis (6). Sunku įvertinti tikslų atsparumo antibiotikams poveikį mirtingumui, todėl tik nedidelė dalis tyrimų nagrinėja šiuos duomenis. Tyrimo pagrįsto 2007 m. surinktais duomenimis rezultatai atskleidė, kad vien tik Europos sąjungos šalyse ir Norvegijoje kasmet 25 000 mirties atvejų sukelia antibiotikams atsparios bakterijos (44). Dažniausiai mirtį sukelia daugeliui antibiotikų atsparios bakterijos kaip *Streptococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* ir *Pseudomonas aeruginosa* (44). Naujesni duomenys atskleidė, kad nuo 2016

m. iki 2020 m. Europos Ekonominės Erdvės valstybėse metinis užsikrėtimo infekcijų, sukeltų antibiotikams atsparių bakterijų, atvejų skaičius svyravo nuo 685 433 (2016 m.) iki 865 767 (2019 m.), o metinis mirčių kiekis svyravo nuo 30 730 (2016 m.) iki 38 710 (2019 m.) atvejų (45). Tyrimas atskleidė statistiškai reikšmingą infekcijų ir mirčių, susijusių su atsparumu antibiotikams, didėjimo tendenciją (45). Jim O'Neill (2016) atliktoje apžvalgoje pranešta, kad metinis mirštamumas tiesiogiai sukeltas AAM iki 2050 m. pasaulyje išaugs iki 10 milijonų ir tikėtina, sukels daugiau mirčių nei onkologiniai susirgimai (46).

Be to, dėl paplitusių atsparių mikroorganizmų didėja ekonominiai kaštai: kuomet gydymas pirmos eilės antimikrobinėmis medžiagomis yra neefektyvus, gydymas keičiamas į antros ar trečios eilės vaistus, kurie bene visuomet yra brangesni, taip pat, tokie pacientai ilgiau yra hospitalizuojami, didėja gydymo išlaidos bei darbo našumo nuostoliai dėl paciento-darbuotojo ligos (47). Apskaičiuota, kad kasmet Islandijos, Norvegijos ir Europos sąjungos narių išlaidos antibiotikams atsparių infekcijų gydymui siekė apie 1,5 milijardo eurų, iš kurių daugiau nei 900 milijonų buvo ligoninių išlaidos (44). Šių išlaidų rodiklių negalime prilyginti dabartinei situacijai Europoje, nes tyrimas buvo pagrįstas 2007 m. surinktais duomenimis. Atsparumas antibiotikams yra nuolat kintantis reiškinys, o naujesni tyrimai nurodo didėjančią infekcijų ir mirčių tendenciją, todėl galima manyti, kad ir ekonominė našta, susijusi našumo nuostoliais ir sveikatos priežiūros išlaidomis dėl AAM, laikui bėgant auga.

1.3.2. Atsparumo antibiotikams plitimo priežastys

Europos antimikrobinų medžiagų suvartojimo stebėjimo tinklas (trump. ESAC-Net) padarė išvadą, kad įprastų patogenų atsparumas antibiotikams yra didesnis šalyse, kuriose antibiotikų vartojama dažniau (48). Taip pat, ESAC-Net nurodė, kad antibakterinių medžiagų naudojimas visoje Europoje ganėtinai skiriasi: Rytų ir Pietų Europoje daugiausiai, o Šiaurės Europoje – mažiausiai (48). Tad viena dažniausiai literatūroje minima atsparumo antibiotikams išsivystymo priežastis – neatsakingas ir per didelis antibakterinių vaistų vartojimas. Odontologijos praktikoje išrašoma nuo 4 proc. iki 15,6 proc. visų antibiotikų receptų visose medicinos srityse (49,50). Antibiotikų receptų kiekio išrašymo šuolis atsirado COVID-19 pandemijos metu. Manoma, kad viena pagrindinių priežasčių buvo odontologijos praktikai taikyti apribojimai dėl kurių nemaža dalis pacientų nusprendė atidėti reguliarius patikrinimus ar gydymą (49). Nepaisant to, pandeminiai apribojimai jau seniai baigėsi, tačiau ši padidėjusio antibiotikų skyrimo odontologijoje tendencija išlieka (50). Tai, kai gydytojai skiria per daug antibiotikų, net ir nesant indikacijoms, yra reikšmingas veiksnys, skatinantis netinkamą antibiotikų vartojimą pasiturinčių šalių visuomenėje (5). Stein ir kt. (2018) atliktoje literatūros apžvalgoje nurodė, kad gydytojai odontologai profilaktiškai skiria antibakterinius preparatus be klinikinių indikacijų, t.y. dėl pacientų ar jų šeimos gydytojų sukuriama spaudimo ar

tiesiog apsidrausdami (51). Be to, padidintam antibiotikų skyrimui įtakos turėjo gydytojų odontologų žinių trūkumas bei lėtas naujų gairių pripažinimas (51). Pavyzdžiui, dalis gydytojų (daugiausia vyresnių nei 51 metai) antibiotikus skyrė kaip priedą prieš konservatyvų periodonto ligų gydymą (52). Ne vienas tyrimas nurodė, kad neretai gydytojai odontologai skiria antibiotikus esant odontogeninei infekcijai be sisteminių simptomų ar pacientui nurodžius tik skausmo simptomus (53–55). Contaldo ir kt. (2023) literatūros apžvalgos duomenimis, tik nedidelė dalis gydytojų odontologų žino apie nacionalinius antimikrobinio atsparumo šalies veiklos planus (56).

Nepaisant to, ne tik gydytojai, bet ir patys pacientai prisideda prie atsparumo antibiotikams klestėjimo. Viena pagrindinių to priežasčių yra savigyda. Ypatingai besivystančiose šalyse besaikis antibakterinių medžiagų vartojimas atsiranda dėl lengvo prieinamumo (5). Morgan ir kt. (2011) atliktoje sisteminėje literatūros apžvalgoje teigiama, kad šalyse kaip Sudanas ar Nigerija nereceptinių antibakterinių medžiagų vartojimas siekė net 100 proc., o Šiaurės Europos šalyse vienerių metų laikotarpyje antibiotikų vartojimo dažnis svyravo nuo 14 proc. iki 37 proc., iš kurių nereceptinis vartojimas sudarė tik 3 proc. (57). Sisteminės apžvalgos duomenimis, Lietuvoje nereceptinių antibiotikų vartojimo dažnis siekė 30 proc. (57). Antibiotikai, naudojami savigydai, dažniausiai gaunami iš vaistinių, vaistų likučių vaistinėse, rečiau iš draugų ar giminaičių, sveikatos įstaigų (58). Pavyzdžiui, bene pusė tyrime apklaustų (42 proc.) Utenos rajono gyventojų nurodė, kad naujai atsiradusiems sveikatos sutrikimams gydyti vartoja antibiotikus, likusius namie nuo praeito gydymo, mažesnę dalis (13 proc.) vaistus įsigyja be recepto vaistinėse ar turguje (59). Ocan ir kt. (2015) atliktos sisteminės apžvalgos duomenimis, dažniausiai netinkamas vartojimas buvo susijęs su trumpa gydymo trukme: savavališkai nutrauktu gydymu (dažniausiai mažiau nei 5 dienos), nepakankama vaistų doze, neteisinga indikacija (antibakterinių vaistų naudojimas gydant virusines ligas) ir dalijimusi medikamentais su kitais asmenimis (58). Nors besivystančios šalys labiau susiduria su nepakankama AAM stebėseną, netinkama antibiotikų kokybės patikra bei netinkamu vartojimu visuomenėje, savigyda antibiotikais yra plačiai taikoma net ir išsivysčiusiose šalyse, kuriose sveikatos sistema yra gerokai labiau pažengusi (60).

Visuomenės požiūris, žinios ir įsitikinimai apie antibiotikus yra viena pagrindinių neracionalaus vaistų vartojimo priežasčių. Tyrime apklaustų 80 proc. suaugusių lenkų žinojo, kad antibiotikai naikina bakterijas, tačiau daugiau nei pusė (60 proc.) jų manė, kad jie veiksmingi ir prieš virusus (61). Lietuvių tyrėjų (2015) atliktas tyrimas atskleidė, kad du trečdaliai apklaustųjų lietuvių parodė prastas žinias apie antibiotikus, beveik pusė respondentų manė, kad antibiotikai yra veiksmingi prieš virusus (62). Petravičienės ir kt. (2021) atlikta anketinė apklausa Utenos rajone atskleidė, kad trečdalio respondentų nuomone antibiotikai naikina virusus (59). Nustatyta, kad apklaustieji, turintys nepakankamas žinias apie antibiotikus, buvo linkę pervertinti savo žinias ir užsiimti savigyda (62). Rastas ir statistiškai reikšmingas ryšys tarp dažnesnio antibiotikų vartojimo

ir žemesnio išsilavinimo, prastesnės ekonominės padėties, gyvenimo kaimo vietovėse (62). Tad deja, dar visame pasaulyje daliai žmonių trūksta suvokimo ir žinių apie antibiotikus, išlikusi nuomonė, kad antibiotikai yra „nuostabūs vaistai“, galintys išgydyti bet kokius negalavimus, o tai kelia grėsmę – AAM plitimą.

1.3.3. Savybinis-vidinis ir įgytas bakterijų atsparumas antibakteriniams preparatams

Atsparumas antibiotikams yra reiškiny, kai tam tikri antibiotikai netenka gebėjimo naikinti ar stabdyti bakterijų augimą. Dalis bakterijų yra natūraliai atsparios ir pasižymi prigimtinu-savybiniu atsparumu, tačiau šis evoliucijos eigoje susiformavęs natūralus fenomenas retas (6). Savybinis atsparumas pasireiškia tarp visų tos pačios rūšies bakterijų (6). Tyrimų duomenimis, apie 3 proc. bakterijų genomo gali turėti savybinį-vidinį atsparumą (63). Šis vidinis atsparumas yra sudėtingas reiškiny, kuris nėra susijęs su kelių genų, kurie išsivystė reaguojant į antibiotikų poveikį, aktyvumu (63). Dažniausiai bakterijos pasižymi įgytu atsparumu, kuris susiformuoja dėl struktūrinių ar reguliavimo genų mutacijų arba svetimos DNR, koduojančios atsparumą lemiančius veiksnius, gavimo (8). Kitaip tariant, bakterijos genetinė informacija gali būti pakeista dvejais būdais: dėl mutacijų, kurios pakeičia jau egzistuojančią bakterijos DNR ir įgyjant naują genetinę medžiagą į ląstelę įterpiant genus, kurie papildo bakterijos genomą. Daugelis kliniškai reikšmingų bakterijų atsparumo antibakterinėms medžiagoms mechanizmų yra įgyti (7).

1.3.4. Genetinės mutacijos

Genetinės mutacijos, tai organizmo genomo DNR sekos pokyčiai. Genetinės chromosomų mutacijos daro didelę įtaką bakterijų atsparumo antibiotikams raidai. Šios mutacijos gali atsirasti spontaniškai DNR replikacijos metu arba dėl tam tikrų aplinkos dirgiklių, pavyzdžiui, dėl pačių antibakterinių medžiagų sukuriama selektyvaus spaudimo yra sukeliamą pradinę mutaciją, leidžianti dominuoti paveiktų mutacijos, atsparių patogenų populiacijai (64). Ypatingai, ilgiau vartojant subterapines antibiotikų dozes, kai kuriose bakterijų populiacijose gali sustiprėti ir padidėti mutacijų dažnis, tokiu atveju bakterijos itin greitai įgyja atsparumą (65). Taigi jautrios bakterijos įgijusios genų mutacijas, kurios lemia gebėjimą išgyventi veikiant jas antibakteriniais preparatais, nukonkuruoja jautrias bakterijas ir suformuoja atsparią antibiotikams populiaciją (8). Mutacijos, sukeliančios atsparumą antibakterinėms medžiagoms, paprastai pakeičia antibiotikų veikimo būdą, naudojamos vieną iš šių pagrindinių mechanizmų: padidina išstūmimo siurblių aktyvumą, sukelia antibakterinių molekulių degradaciją ir modifikaciją, sumažina molekulių patekimą į ląstelę ar modifikuoja antimikrobinį taikinį (8).

1.3.5. Horizontalioji genų pernaša

Vienas iš pagrindinių ir svarbiausių bakterijų evoliucijos veiksnių yra genetinės medžiagos pasikeitimas tarp dviejų skirtingų ar tos pačios rūšies bakterijų. Šis procesas vadinamas horizontaliu genų perdavimu ir yra laikomas viena pagrindinių atsparumo antibiotikams atsiradimo priežasčių (66). Horizontali genų pernaša dažnai vyksta burnos mikrobiotoje (67). Genų rekombinacija tarp bakterijų gali vykti trimis skirtingais būdais: transformacija, transdukcija ir konjugacija (64). Dėl šių bakterijų savybių atsparumą priešmikrobiniais junginiais koduojantys genai gali plisti ir tarp tos pačios rūšies, ir tarp skirtingų genčių bakterijų (68).

Paprasčiausias horizontalaus genų perdavimo būdas yra transformacija, tačiau tik nedidelė dalis kliniškai reikšmingų ar sveikatai pavojingų bakterijų gali tiesiogiai iš aplinkos įtraukti laisvą DNR grandinės molekulę ir tokiu būdu įgyti atsparumą (8).

Transdukcijos metu įvyksta atsitiktinė genų rekombinacija, kurioje dalyvauja bakteriofagai – bakterijas infekuojantys virusai, veikiantys kaip vektoriai genetinės informacijos perdavimo procese (64). Specializuotos transdukcijos metu bakteriofagai dalį genetinės informacijos perduoda iš donorinės į recipientinę bakterinę ląstelę, tačiau bakteriofagai pasižymi specifiškumu ir gali perduoti medžiagą tik tam tikrai bakterijų padermei – daugiausiai glaudžiai susijusioms bakterijų rūšims (69). Vykstant bendrinei transdukcijai yra perduodamas visas genomai (70). Ankstesniame *in vivo* tyrime su pelėmis Modi ir kt. (2013) parodė, kaip antibiotikų vartojimas subklinikinėmis dozėmis gali paskatinti bakteriofagus, turinčius atsparumo genus, transdukuoti jautresnes bakterijas (71). Žinios apie bakteriofagus ir transdukcijos procesą, susijusias su antibakterinių atsparumo genų pernaša burnoje, yra ribotos (67).

Iš šių trijų bakterijų genetinių mainų mechanizmų konjugacija yra vienintelė, apimanti tiesioginį ląstelių kontaktą, kai susidarius konjugaciniam tilteliui dalis DNR perkeliama iš vienos bakterijos į kitą (8). Konjugacija yra pats svarbiausias ir dažniausias horizontalaus genų perdavimo būdas paplitęs tiek tarp gramneigiamų, tiek tarp gramteigiamų bakterijų burnos ertmėje (66). Atsparumas antibiotikams gali būti nulemiamas tiek genų, kurie yra bakterijų chromosomoje, tiek genų, kurie yra ekstrachromosominiuose genetiniuose elementuose, pavyzdžiui, plazmidėje (8). Šiame procese dalyvauja ir didelę įtaką atsparumo antibiotikams genų sklaidai daro mobilūs genetiniai elementai: konjugacinės plazmidės ir konjugaciniai transpozonai, kurie geba pasidalinti atsparumo elementais su neatspariomis, kliniškai reikšmingomis bakterijomis (8). 1969 m. Holloway ir bendraautorai pastebėjo, kad konjugacinės plazmidės (mažos žiedinės bakterijos DNR dalys) geba pernešti genus, koduojančius atsparumą antibakterinėms medžiagoms (72). Genai, koduojantys skirtingus atsparumo mechanizmus, dažnai yra transpozonuose, kurie dėl savo savybės keisti vietą genome dar kitaip vadinami „šokinėjančiais genais“ (64). Itin mobilus *Tn916* transpozonas aptiktas

daugybėje burnos bakterijų genčių, tokių kaip *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Actinobacillus*, ir yra siejamas su atsparumo tetraciklinams genu – *tetM* (67,73). Lunde ir kt. (2021) komensalinėse *Streptococcus* genties bakterijose (*S. mitis*) nustatė naują *Tn916-Tn1545* klasės konjugacijos elementą - *Tn6815*, pernešantį *tetM* ir atsparumo eritromicinui geną (*ermB*) (73). Taip pat, pastebėjo, kad *Tn6815* geno perkėlimo dažnis į kitas bakterijų rūšis yra didelis. Dar vienas efektyviausių gramneigiamų bakterijų antibakterinio atsparumo genų kaupimo ir plitimo mechanizmų yra susijęs su integronais – DNR molekulėmis, turinčiomis rekombinacijos saitą, į kurį gali įsiterpti daug tokių pačių ar skirtingų nedidelių genetinių elementų, vadinamų genų kasetėmis (74). Viena iš svarbiausių integrono sudedamųjų dalių yra sait-specifinės rekombinazės genas – *intI* (74). Dėl integronų gebėjimo įtraukti įvairius atsparumo antibiotikams genus į bakterijų chromosomas, sukuriama multirezistentiškos bakterijų padermės (64).

Bakterijų dauginimasis gali būti labai greitas, kai kurioms rūšims genų rekombinacija užtrunka šiek tiek ilgiau nei kelias minutes, tad minėti rekombinacijos mechanizmai ir atsitiktinės mutacijos leidžia bakterijoms itin greitai prisitaikyti prie aplinkos pokyčių (75). Tad netinkamas ir per didelis antibiotikų vartojimas paveikia ne tik patogenus, bet ir komensalus. Komensalinės bakterijos gali tapti patogenų atsparumą antibiotikams lemiančių genų rezervuarai.

1.3.6. Atsparumo antimikrobinėms medžiagoms genai

Nenuostabu, kad per milijonus vystymosi metų bakterijos sukūrė sudėtingus atsparumo vaistams mechanizmus, kad išvengtų antimikrobinų junginių poveikio (8). Kiekvienai antibakterinių preparatų klasei yra išsivystęs bent vienas atsparumo mechanizmas, kuris mažina vaisto veiksmingumą arba jį panaikina (6,8). Bakterijos gali turėti keletą atsparumo mechanizmų, kurie užtikrins atsparumą keliems skirtingiems antibiotikų junginiams vienu metu (65). Ši savybė ypatingai apsunkina bakterinių infekcijų gydymą. Išskiriami trys pagrindiniai bakterijų biocheminiai mechanizmai, padedantys apsisaugoti nuo antimikrobinų medžiagų poveikio: a) antibakterinių molekulių fermentinė modifikacija ir degradacija, b) sumažėjęs bakterijų patekimas į ląstelę ir padidėjęs efliukso pumpų (membranos baltymų, šalinančių antimikrobines medžiagas iš ląstelės) aktyvumas, c) antibakterinio taikinio modifikacijos (8).

Beta laktaminiai antibiotikai: penicilinai, cefalosporinai, monobaktamai, karbapenemai, savo molekulinėje sudėtyje turi beta laktaminį žiedą. Penicilinai – dažniausiai naudojami tiek odontologijoje, tiek bendrojoje medicinoje antibiotikai, turintys beta-laktamo tiazolidino žiedų sistemą (67). Amoksicilinas yra laikomas pirmo pasirinkimo antibakterinis preparatas odontologijoje pacientams, kurie nėra alergiški penicilinams (76). Atsparumas beta laktamams gali atsirasti dėl kelių pagrindinių mechanizmų: a) sumažėjusio sąveikos tarp taikinio ir vaisto jautrumo dėl įgytų

chimerinių peniciliną surišančių baltymų, b) padidėjusio efliukso pompos aktyvumo, c) vaisto destruktijos veikiant beta laktamazės fermentams (8). Genai, koduojantys beta laktamazės fermentus bendrai vadinami *bla*, po kurio nurodomas specifinio fermento pavadinimas, pavyzdžiui *bla_{SHV}* (8). Šie fermentai hidrolizuoja beta laktaminį žiedą ir taip eliminuoja antibakterinio preparato poveikį (40). Įvairūs beta laktamazės koduojantys genai, tarp jų *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *cfxA* aptinkami burnos mikroorganizmuose (67). Šios bakterijos gali būti atsparios kelioms skirtingoms antibakterinių preparatų klasėms, tačiau dažniausiai yra jautrūs beta laktamazės inhibitoriams (pavyzdžiui, klavulano rūgščiai) (6,8).

Metronidazolis (antibakterinis 5-nitroimidazolų grupės preparatas) yra vienas dažniausiai periodontologijoje naudojamų antibakterinių preparatų dėl siauro anaerobinių bakterijų veikimo spektro (77). Pavyzdžiui, gydytojai odontologai metronidazolį skiria gydant lėtines infekcijas, kuriose vyrauja anaerobai, taip pat, sergant ūminiu nekrozinio gingivitu ar perikoronaritu, kai pasireiškia sisteminiai simptomai ar išlieka tinimas (51). Bakterijų atsparumą metronidazoliui dažniausiai nulemia *nim* genai, kurie koduoja nitroimidazolo reduktazę, atsakingą už vaisto inaktyvaciją (77). Mokslinėje literatūroje nagrinėjami devyni *nim* genų tipai, dažniausiai randami plazmidėse ir konjugacijos būdu perduodami iš vienos bakterijos kitai (77). Tyrimų duomenimis, atsparumą metronidazoliui lemiantys genai retai aptinkami burnoje (24,78).

Gydytojai odontologai dažniausiai alergiškiems penicilinui pacientams skiria klindamiciną, taip pat, makrolidus: eritromiciną, artitromiciną, klaritromiciną (51). Pavyzdžiui, Italijos gydytojai tokiais atvejais dažniau skiria makrolidus, tuo tarpu Vokietijos odontologai renkasi klindamiciną (79). Dažniausiai atsparumą eritromicinui (makrolidų grupės antibiotikui) lemia ribosominės metilazės, užkoduotos *erm* genuose (67). Mokslo literatūroje aprašyta daugiau nei 30 skirtingų *erm* genų, kurie kaip ir atsparumo tetraciklinui koduojantys *tet* genai dauguma lokalizuojasi judriuosiuose genetiniuose elementuose (8). Šie atsparumo genai aptinkami ir anaerobinėse, ir aerobinėse gramteigiamose ir gramneigiamose bakterijose. Italijoje atliktame tyrime, sveikų, nesergančių sistemine ligomis, tiriamųjų seilėse dažniausiai aptikti *ermB* ir *ermC* atsparumą eritromicinui koduojantys genai, o *ermA* rastas tik 1 iš 144 seilių mėginių (80). Neseniai atlikti tyrimai atskleidė, kad šie genetiniai elementai dažnai susiję su burnos komensalais - *viridans* grupės streptokokais (81). Šie streptokokai konjugacijos pagalba gali pasidalinti atsparumo eritromicinui genais su pagrindiniais streptokokų genties patogenais: *Streptococcus pyogenes* ir *Streptococcus pneumoniae* (81).

Pagrindinis daugelio *tet* genų koduojamas bakterijų atsparumo tetraciklinams mechanizmas yra pagrįstas antibiotiko molekulių pašalinimu iš ląstelės per membraninius išstūmimo siurblius (8,65). Būtent *tetA*, *tetB*, *tetL* ir kitų *tet* genų sužadinimas sukelia atsparumą tetraciklinams per išstūmimo siurblius (8). Manoma, kad bakterijų, turinčių *tetM* geną, atsparumą tetraciklinams lemia ribosomų apsauga (8). Atsparumo tetraciklinų grupės antibiotikams genai yra plačiausiai ištirti

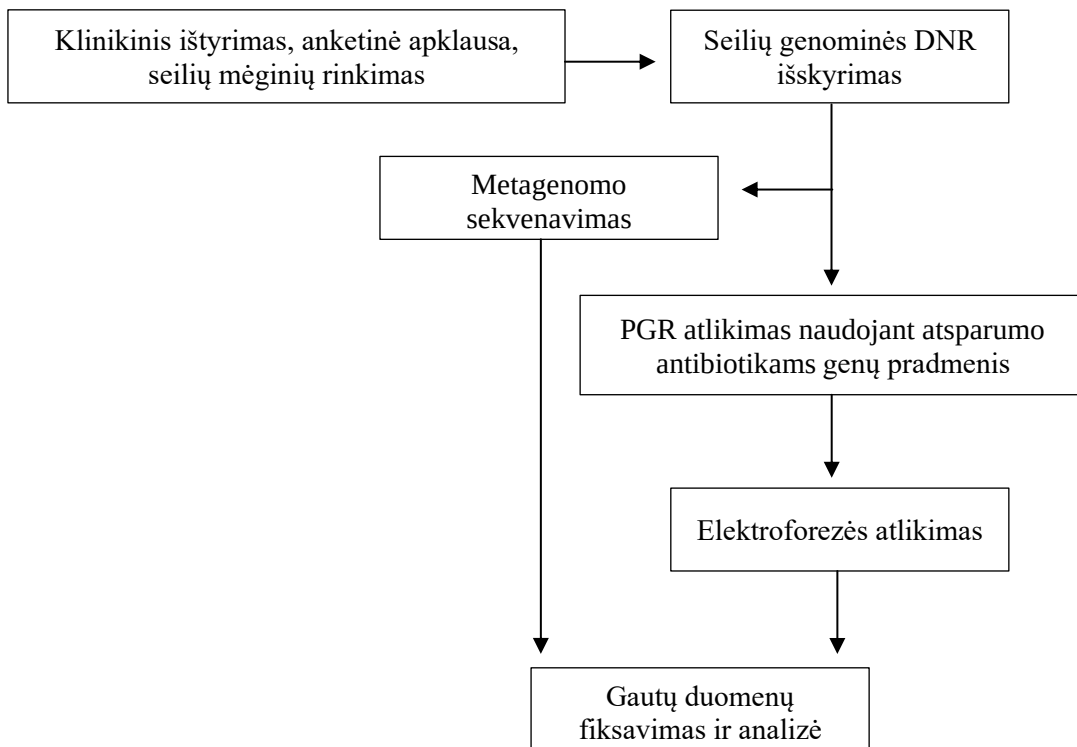
literatūroje, burnos mikrobiotoje dažniausiai nagrinėjamas *tetM* geno pasireiškimas (82). Mokslo literatūroje aprašyta daugiau nei 20 skirtingų *tet* genų, iš kurių dauguma užkoduoti judriuosiuose genetiniuose elementuose (8). Didžioji dalis šių genų aptinkami gramneigiamose bakterijose (8). Moraes ir kt. (2015) sisteminės apžvalgos duomenimis skirtinguose burnos ertmės mėginiuose *tetM* paplitimas svyruoja nuo 5 proc. iki 100 proc. (82). Mažiausias *tetM* genų paplitimas nustatytas šaknų kanalų infekcijos židiniuose (5-60 proc.) (82).

Dar vieną antibakterinių preparatų grupę, veikianti tiek gramteigiamas, tiek gramneigiamas bakterijas, yra aminoglikozidai. Tai yra vieninteliai iš anksčiau minėtų antibiotikų, kurie sistemiskai nėra neskiriami vartoti per burną dėl prastos absorbcijos, o yra leidžiami į raumenis arba į veną (esant itin sunkiai paciento būklei). Per burną gali būti skiriami kaip profilaktinė dozė, pavyzdžiui, prieš chirurgines žarnyno operacijas (83). Šios baktericidinės medžiagos jungiasi prie bakterijų ribosomų ir slopina bakterijų baltymų sintezę (83). Vienas svarbiausių ir labiausiai paplitusių aminoglikozidų aktyvumą mažinančių mechanizmų yra jų fermentinė modifikacija. Išskiriamos trys pagrindinės aminoglikozidus inaktyvuojančios fermentų grupės: nukleotidiltransferazės (*ANT*-), fosfotransferazės (*APH*-) bei acetiltransferazės (*ACC*-) (64). *AAC*(3)-I poklasis apima 5 fermentus, lemiančius bakterijų atsparumą gentamicinui. Šie genai aptikti gramneigiamose bakterijose, didelė dalis *Enterobacteriaceae* šeimos bakterijose. *AAC*(3)-I fermentus koduojantys genai aptinkami kaip genų kasečių dalis integronuose (83). Nors aminoglikozidai ir tetraciklinai nėra plačiai naudojami odontologijoje, tačiau jie yra svarbūs gydant kitų sričių infekcijas.

2. MEDŽIAGA IR METODAI

2.1. Tyrimo eiga, vietos ir tiriamoji populiacija

Tyrimas atliktas 2019–2024 metais Vilniaus universiteto ligoninės Žalgirio klinikoje, klinikoje „Periodont“, Šv. Roko, Vilkpėdės ir Mykolo Marcinkevičiaus ligoninėse ir Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre. Tyrimui buvo gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas Nr.2020/9-1263-746. Buvo tiriamos seilės, surinktos iš pilnamečių asmenų, kurie kreipėsi į VUL Žalgirio kliniką ar kliniką „Periodont“, arba tyrimo metu gydėsi anksčiau minėtose ligoninėse. Tyrime dalyvavo tik veiksnūs pacientai, turintys nusiskundimų dėl burnos sausumo ir sergantys periodonto patologija bei rašytiniu būdu patvirtinę savo sutikimą dalyvauti biomedicininiam tyrime. Tyrime negalėjo dalyvauti asmenys šiuo metu negyvenantys Lietuvoje, turintys proto negalią, neveiksnūs, jaunesni nei 18 metų asmenys, esantys karinėje tarnyboje ar įkalinimo įstaigoje ir nesergantys periodonto patologija. Tyrimas atliktas pagal 1 paveikslėlyje pateiktą schemą.



1 pav. Tyrimo plano schema.

2.2. Klinikinis ištyrimas ir anketinė apklausa

Klinikinis ištyrimas atliktas vieno tyrėjo – gydytojos odontologės Indrės Stankevičienės Vilniaus universiteto ligoninės Žalgirio klinikos ar/ir klinikos „Periodont“ odontologiniuose kabinetuose ir ligoninėse. Pacientams, kurie kreipėsi į minėtas klinikas ir skundėsi burnos sausumu, gydytojai odontologai rekomendavo susisiekti su gydytoja tyrėja Indre Stankevičiene dėl dalyvavimo šiame tyrime. Be to, žmonės buvo kviečiami dalyvauti tyrime per žiniasklaidą ir socialinius tinklus (pavyzdžiui, Facebook). Ligoninėse gydomi asmenys buvo informuoti apie įstaigoje vykdomą tyrimą ir galėjo kreiptis dėl dalyvavimo į skyriaus vyriausią slaugytoją. Visi sutikę dalyvauti tyrime ir pasirašę Informuoto asmens sutikimo formą buvo įtraukti į tyrimą. Kiekvienam tiriamajam buvo suteiktas tiriamojo kodas. Tyrimo metu tiek dokumentuojant klinikinį ištyrimą, tiek dirbant su mėginiais laboratorijoje nebuvo naudojami asmeniniai tiriamųjų duomenys.

Naudojant didinimo akinius, odontologinį veidrodėlį ir periodontologinį zondą buvo atliktas periodonto audinių įvertinimas naudojant PSO 2013 m. suaugusių burnos būklės ištyrimo formą. Asmenims, besigydantiems ligoninėse, odontologinis ištyrimas buvo atliekamas jų palatoje, naudojant papildomą apšvietimą, odontologinį veidrodėlį ir periodonto zondą pagal PSO rekomendacijas.

Remiantis PSO 2013 m. ištyrimo forma periodonto būklė vertinta modifikuotu CPI indeksu (angl. *modified Community periodontal index, CPI*). Naudojant periodontologinį zondą aplink kiekvieną dantį matuoti šie klinikiniai parametrai: kraujavimas po zondavimo ir zondavimo gylis. Jei zonduojant nors vienoje aplink dantį pasireiškė kraujavimas – to danties kraujavimas po zondavimo įvertinamas kodu 1, jeigu kraujavimo nebuvo – kodu 0. Zondavimo gylis ne daugiau 3 mm buvo pažymimas kodu 0, 4-5 mm periodonto kišenės – kodu 1, 6 mm ir gilesnės periodonto kišenės – kodu 2. Ties kiekvienu dantimi buvo žymimas didžiausias gautas kodas. Netektas dantis buvo žymimas kodu x, nevertinamas dėl klinikinės būklės žymimas kodu 9. Kraujavimas po zondavimo (angl. trump. BOP) apskaičiuotas procentais (kraujuojančių dantų skaičius/turimų dantų skaičius*100 proc.). Modifikuotas CPI indeksas vertintas skaitine reikšme: 0 – sveiki audiniai, 1 – kraujavimas po zondavimo, 3 – 4-5 mm periodonto kišenė/-ės, 4-6 mm ir gilesnės periodonto kišenės.

Intraoralinio ištyrimo duomenis rinkusio tyрėjo kalibravimas atliktas remiantis 2013 m. PSO gairėmis. Zonduojamų periodonto kišenių gylių atitikimas apskaičiuotas pakartotinai po dviejų savaitių įvertinus dešimties tų pačių tiriamųjų periodonto būklės klinikinį ištyrimą. Periodonto kišenių zondavimo Koheno kapos vertė siekė 0,95.

Klausimyno pagalba buvo renkama informacija apie jų amžių, lytį, rūkymo ir tarpdančių valymo įpročius. Tyrimo dalyviams atlikta nestimuluota pilna sialometrija. Tiriamieji buvo paprašyti 15 minučių visas susikaupusias seiles spjauti į plastikinį graduotą mėgintuvėlį, pažymėtą tiriamojo kodu. Prieš tyrimą asmuo turėjo būti 2 val. nevalgęs, negėręs, nevalęs dantų, nerūkęs bei privalėjo išspjauti seilių likutį prieš pat tyrimą. Surinkti seilių mėginiai saugoti -20 laipsnių temperatūroje, vėliau transportuoti į VU Gyvybės mokslų centro mikrobiologijos laboratoriją, kurioje viso tyrimo metu buvo laikomi -70 laipsnių temperatūroje.

2.3. Genominės DNR išskyrimas ir metagenomo sekvenavimas

Iš nestimuliuotos pilnos sialometrijos metu surinktų seilių genominė DNR išskirta naudojant *The Thermo Scientific™ GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Fisher, JAV) rinkinį remiantis gamintojo pateiktu protokolu:

1. Mėgintuvėlyje pipetuojant sumaišomas mėginio tirpalas: 400 µL seilių mėginio, 400 µL lizavimo buferio (angl. *Lysis Solution*) ir 20 µL proteinkinazės K.
2. Mėginys inkubuojamas 56°C temperatūroje 10 minučių termostate-purtyklėje.
3. Į mėgintuvėlį pridedama 200 µL etanolio (96-100 proc.), išmaišoma pipete.
4. Gautas tirpalas perkeliamas į mėgintuvėlį su kolonėle, centrifuguojama 1 min. 6000 rcf (xg) greičiu. Pašalinamas nucentrifuguotas skystis.

5. Kolonėlė plaunama 500 μ L plovimo buferiu I (angl. *Wash Buffer I*), centrifuguojama 1 min. 8000 rcf greičiu. Pašalinamas nucentrifuguotas skystis.
6. Kolonėlė dar kartą plaunama pridėjus 500 μ L plovimo buferio II (angl. *Wash Buffer II*), centrifuguojama 3 min. didžiausiu įmanomu greičiu (≥ 12000 rcf). Pilnai pasišalinus plovimo buferiui kolonėlė perkeliama į naują sterilų mėgintuvėlį.
7. Nuo kolonėlės membranos DNR nuplaunama naudojant 50 μ L eliacijos buferio (angl. *Elution buffer*) ir inkubuojama kambario temperatūroje 2 min. Centrifuguojama 1 min. 8000 rcf greičiu.
8. Pašalinus kolonėlę, mėgintuvėlis su izoliuota DNR buvo uždaromas ir saugomas -20 laipsnių temperatūros šaldiklyje.

DNR išskyrimui naudoti prietaisai: *bioSan TS-100C* (Biosan, Latvija) termostatas-purtyklė, *Eppendorf 5424 Microcentrifuge* (Eppendorf, Vokietija) mikrocentrifuga.

Genominės DNR švarumas ir koncentracija nustatyti *NanoDROPTM 2000/2000c* (JAV) UV spektrofotometro pagalba pagal gamintojo instrukcijas naudojant po 1 μ L kiekvieno mėginio DNR. Kontrolei naudota 1 μ L TE buferio. DNR tirpalo švarumas įvertinamas išmatavus tirpalo optinius tankius prie 260 nm ir 280 nm bangų ilgių. Gautas DNR tirpalas laikomas švarus – be baltymų priemaišų, kai santykis, nurodantis švarumą OD_{260}/OD_{280} yra didesnis nei 1,8 (1).

Izoliavus totalinę mikroorganizmų DNR, į sterilius 1,5 μ L talpos mėgintuvėlius perkelta po 20 μ L DNR medžiagos, dangteliai užsandartinti parafino juostelėmis. Seilių mikrobiota išanalizuota naudojant 16S rRNA genų seką. 16S rRNA V3-V4 sričių metagenomo sekvenavimą atliko Novogene kompanija (Jungtinė Karalystė). Metagenomo sekvenavimui naudojama genominė DNR turėjo atitikti koncentracijos (≥ 10 ng/ μ L) ir švarumo (≥ 1.8) reikalavimus. Seilių mikrobiotos sudėtis palyginta grupėse, sudarytose remiantis modifikuotu CPI indeksu pagal tiriamųjų periodonto būklę.

2.4. Atsparumą antibiotikams koduojančių genų nustatymas

2.4.1. Polimerazės grandininė reakcija

Polimerazės grandininės reakcijos (trump. PGR) metodas buvo naudotas atsparumą priešmikrobiniais junginiais koduojančių genų nustatymui. PGR reakcijoms atlikti naudoti tetraciklinų grupės – *tetA* ir *tetM*, makrolidų grupės – *ermB*, beta laktamų grupės – *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, metronidazolio – *nim*, aminoglikozidų grupės - *aac(3)Iab(aacC1)* atsparumo genų ir integrazės (*Int1*) genų pradmenys. Pradmenų nukleotidų sekos ir produkto ilgis (bp) pavaizduoti 1 lentelėje.

1 lentelė. Atsparumą antibakterinėms medžiagoms koduojančių genų pradmenų sekos ir ilgiai.

PGR taikiny/genas	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka (5' → 3')	PGR produkto ilgis, bp	Literatūros šaltinis
tetA	FTETA RTETA	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	(84)
tetM	FTETM RTETM	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTCACACAC	406	(84)
ermB	FermB RermB	ATTGGAACAGGTAAAGGGCAT ATCTGGAACATCTGTGGTATG	447	(85)
bla _{TEM}	Fbla _{TEM} Rbla _{TEM}	AGATCAGTTGGGTGCACGAGCAG TGCTGCAATGATACCGC	618	(77)
bla _{SHV}	F1SHV R1SHV	AGGATTGACTGCCTTTTTGCG ATTTGCTGATTTGCTCGGC	392	(86)
nim	FNIM RNIM	ATGTTTCAGAGAAATGCGGCGTAAGCG GCTTCCTTGCTGTCATGTGCTC	458	(77)
aac(3)Iab(aacC1)	FAAC3I RAAC3I	AGCAGCAACGATGTAAACGCA CTGCGGGATCGTCACCGTA	470	(83)
IntI1	FIntI1 RIntI1	GGGTCAAGGATCTGGATTTCG ACATGCGTGTAATCATCGTC	484	(87)

PGR metodo atlikimui kiekvieno mėginio DNR atskiesta iki 5 ng/μl, pagaminta po 20 μL praskiestos DNR medžiagos. DNR skiedimas atliktas remiantis priklausomybe: $[C_1]V_1=[C_2]V_2$ (C_1 ir C_2 – pradinio ir praskiesto tirpalo koncentracijos, V_1 ir V_2 – pradinio ir praskiesto tirpalų tūriai).

Atsižvelgus į liofilizuotų pradmenų kiekį nanomoliais, steriliuose mėgintuvėliuose pradmenys ištirpinti vandenyje be nukleazų paruošiant 100 μM produktą. Kiekvieno naudoto geno atvirkštinis ir tiesioginis pradmenys PGR naudojimui buvo paruošti 1 μM.

PGR reakcijos mišinys pagamintas naudojant *DreamTaq PCR Master Mix (2X)* (Thermo Fisher, JAV) rinkinį (2 lentelė). *DreamTaq PCR Master Mix (2X)* yra paruoštas naudoti tirpalas, sudarytas iš DreamTaq DNR polimerazės, optimizuoto DreamTaq buferio, magnio chlorido ir deoksiribonukleotidų 5'-trifosfatų. PGR atlikta naudojantis *T100 Thermal Cycle* (BioRad, Vokietija) termociklerį vykdyimo tvarka: pradinė denatūracija, denatūracija, pradmenų prilipimas, sintezė ir galutinė sintezė pasirinkus kiekvieno etapo trukmę ir temperatūrą pagal gamintojo nurodytą protokolą (2 lentelė). Optimali pradmenų prisijungimo žingsnio temperatūra kiekvienam pradmeniui paskaičiuota individualiai (2 lentelė).

2 lentelė. PGR sąlygos, sudėtis.

PGR sąlygos				PGR mišinys (50µL)	
PGR etapas	Temperatūra	Reakcijos trukmė	Ciklų skaičius	DreamTaq PCR Master Mix (2X)	25 µL
Pradinė denatūracija	95	1-3 min.	1	Tiesioginis pradmuo (1 µM)	1 µL
Denatūracija	95	30 s	25-40	Atvirkštinis pradmuo (1 µM)	1 µL
Pradmenų prilipimas	T _m - 5	30 s		Tiriamoji DNR	1 µL
Sintezė	72	1 min.		Vanduo be nukleazių	22 µL
Galutinė sintezė	72	5-15 min.	1		

2.4.2. Elektroforezės metodas

Po PGR atlikta vizualizacija elektroforezės metodo pagalba. Pagamintas 50x TAE (tris-acetato-etilendiamintetraacto rūgštis) buferis: 24,2 g Tris, 5,71 ml 99 proc. acto rūgšties, 10 mg 0,5 M EDTA, H₂O iki 100 ml. Prieš naudojimą 50x TAE atskiestas 50 kartų iki 1x. Elektroforezės vonelė užpildyta 1xTAE buferiu. Elektroforezė vykdyta 2-3 proc. agarozės gelyje. Naudojant 1xTAE buferį paruoštas agarozės tirpalas, į kurį įlašinama etidžio bromido (5µL/100ml tirpalo). Supylus agarozės gelį į specialią formą, palaukiama apie 30-45 min., kol gelis atvėsta ir sustingsta. 7.5µL PGR produkto ar neigiamos kontrolės sumaišyta su 1,5 µL 6X DNR dažo (*Thermo Scientific™*, JAV). Į atskirus agarozės gelio šulinėlius buvo perkelta po 7 µL gauto mišinio. Pagal naudoto pradmens ilgi atitinkamai buvo parenkamas molekulinės masės/ilgio žymuo (naudotas *GeneRuler Low Range DNA Ladder*, Thermo Fisher, JAV) ir įlašinamas į kraštinius šulinėlius po 4 µL (1 lentelė). Elektroforezė atliekama 35 - 45 minutes 105V sąlygomis (Consort E865, Belgija).

Naudojant UV šviesos kamerą (MiniBIS, DNR Bio-Imaging Systmes Ltd, Izraelis) gelyje išsiskyrusios molekulės išryškėja.

2.5. Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta naudojant IBM SPSS 29.0 programinį paketą. Analizuojant duomenis taikyta aprašomoji statistika: vidurkis ir standartinis nuokrypis (SD) bei absoliutūs (n) ir procentiniai (proc.) dažniai. Duomenų pasiskirstymo normalumui įvertinti naudotas Šapiro-Vilko (angl. *Shapiro – Wilk*) testas. Vienfaktorė nepriklausomų imčių ANOVA naudota kiekybinių kintamųjų palyginimui, kai tenkinama normalaus skirstinio sąlyga. Ryšio tarp kategorinių kintamųjų įvertinimui naudotas chi-kvadrato (x²) kriterijus, kai stebėjimų skaičius mažesnis nei 5 naudotas Fišerio (angl. *Fisher's exact test*) kriterijus. Metagenomo sekvenavimo rezultatų analizė pagrįsta taksonominių vienetų identifikavimu (angl. operational taxonomic units, OTU). Bakterijų rūšys (OTU) yra grupuojami pagal sekas, kurios yra labiausiai tarpusavyje panašios – tarp kurių nustatomas mažiausias

genetinis atstumas. Sekų analizė atlikta naudojant Uparse v7.9 1001 programinę įrangą. Kiekvienos sekos taksonominei informacijai anotuoti buvo naudojama Silva duomenų bazė (angl. *the Silva Database*). T-testas nepriklausomoms imtims naudotas santykinio gausumo genčių ir tipų lygmenyje palyginimui tarp grupių. Rezultatai laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$.

3. REZULTATAI

3.1. Tyrimo dalyvių klinikinis ištyrimas ir genominės DNR išskyrimas

Intraoralinis ištyrimas, anketinė apklausa bei nestimuluota pilna seilių sialometrija atlikta 55 tyrimo dalyviams, kurie turėjo nusiskundimų dėl burnos sausumo. Iš jų 49 (89,1 proc.) buvo moterys ir 6 (10,9 proc.) vyrai. Tiriamųjų amžiaus vidurkis 60,3 metai (SD 14,5). Iš visų 55 seilių mėginių išskirta genominė DNR.

Remiantis modifikuotu CPI indeksu: 19 (34,5 proc.) tiriamųjų sirgo gingivitu (CPI_m 1), 21 (38,2 proc.) turėjo 4 - 5 mm periodonto kišenes (CPI_m 3), 15 (27,3 proc.) turėjo 6 mm ir gilesnes periodonto kišenes (CPI_m 4) (3 lentelė).

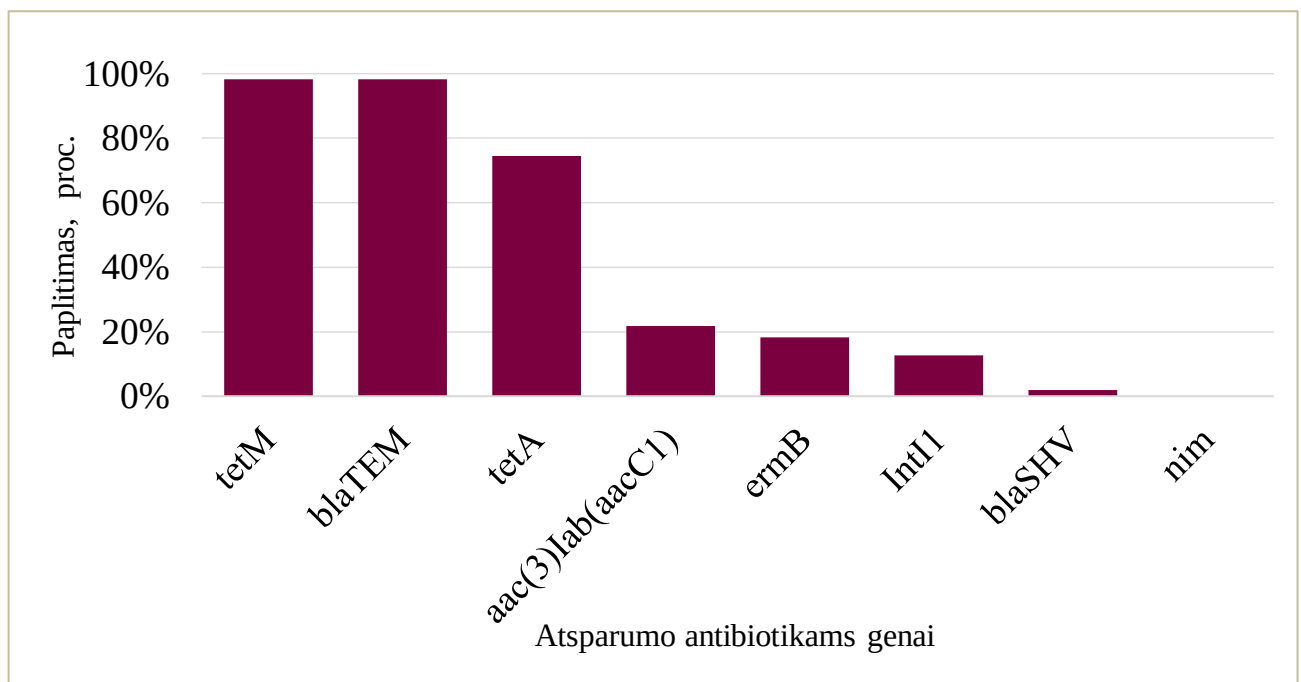
Periodontitas (CPI_m 3 ir CPI_m 4) iš viso nustatytas 36 (65,5 proc.) tiriamiesiems (33). Lentelėje 3 pateikti klinikinio ištyrimo duomenys. Turinčių 4-5 mm periodonto kišenes tiriamųjų BOP (kraujavimo po zondavimo) vidurkis siekė 62,7 proc. (SD 21,0), o turinčių galias periodonto kišenes BOP vidurkis – 70,7 proc. (SD 19,8). Gingivitu sergančių pacientų kraujavimo po zondavimo vidurkis siekė 60,9 proc. (SD 23,3), iš jų visų BOP buvo didesnis nei 17,9 proc. Tiriamieji su sunkiausia periodonto būkle turėjo mažiausią dantų skaičių ($n=19$; SD 6,5) palyginus su kitomis CPI_m 3 ir CPI_m 1 grupėmis (atitinkamai, $n=22$; SD 7,2 ir $n=23$; SD 5,2). Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp CPI_m grupių ir dantų skaičiaus ar BOP nerastas (atitinkamai $p=0,086$ ir $p=0,393$) (3 lentelė).

3 lentelė. Tiriamųjų amžiaus, turimų dantų skaičiaus ir kraujavimo po zondavimo palyginimas tarp grupių, suskirstytų pagal modifikuoto CPI indekso vertes.

	CPI _m 1 (n=19)	CPI _m 3 (n=21)	CPI _m 4 (n=15)	p-reikšmė
Metai, vidurkis (SD)	57,8 (14,4)	59,7 (14,9)	64,2 (14,2)	0,436
Dantų skaičius, vidurkis (SD)	23 (5,2)	22 (7,2)	19 (6,5)	0,086
Kraujavimas po zondavimo, vidurkis proc. (SD)	60,9 (23,3)	62,7 (21,0)	70,7 (19,8)	0,393

3.2. Atsparumo priešmikrobiniams junginiams paplitimas seilėse

Visų 55 tiriamųjų seilių mėginiuose buvo nustatytas bent vienas atsparumo priešmikrobiniams preparatams genas. Labiausiai paplitę ir bene visuose seilėse aptikti tetraciklinų grupės – *tetM* ir beta laktamų grupės – *bla_{TEM}* atsparumo antibiotikams genai (n=54; 98,2 proc.), šiek tiek rečiau nustatytas tetraciklinų grupės *tetA* (n=41, 74,5 proc.). Atsparumo aminoglikozidų grupės antibiotikams genas – *aac(3)Iab(aacC1)* nustatytas 12 (21,8 proc.) tiriamųjų seilėse. Eritromicinų grupės *ermB* – 10 (18,2 proc.) seilių mėginiuose, o integrazės genas (*IntI1*) nustatytas 7 (12,7 proc.) tiriamųjų seilėse. Mažiausiai paplitęs beta laktamų *bla_{SHV}* atsparumo antibiotikams genas rastas tik 1 (1,8 proc.) seilių mėginyje, o atsparumą metronidazoliui (*nim*) koduojantis genas nebuvo aptiktas nei vieno tiriamojo seilėse (2 pav). Tame pačiame seilių mėginyje trys atsparumo priešmikrobiniams junginiams genai buvo nustatyti 31 (56,4 proc.) mėginiuose, keturi – 13 (23,6 proc.), du – 7 (12,7 proc.) ir penki – 4 (7,3 proc.) tiriamųjų seilėse.



2 pav. Atsparumo antibiotikams genų ir integrazės geno paplitimas seilėse.

Lentelėje 4 pateikti atsparumo antibiotikams genų paplitimo duomenys atskirai kiekvienoje CPI_m grupėje. Visų gingivitu sergančių pacientų seilėse aptiktas atsparumą beta laktamams koduojantis genas *bla_{TEM}*, šis genas aptiktas ir visų pacientų, turinčių 4 – 5 mm periodonto kišenes, seilėse. Visų CPI_m 3 grupės tiriamųjų seilėse aptiktas ne tik *bla_{TEM}*, bet ir *tetM* genas (n=21; 100 proc.). Atsparumą eritromicinui lemiantis genas *ermB* labiausiai paplitęs CPI_m 3 grupėje (n=7; 33,3 proc.), šiek tiek mažiau paplitęs CPI_m 4 grupės tiriamųjų seilėse (n=3; 20,0 proc.), o gingivitu sergančių pacientų seilėse *ermB* visai neaptiktas. 5 (26,3 proc.) gingivitu sergančių pacientų seilėse

nustatytas integrazės genas, o periodontitu sergančių pacientų grupėse aptiktas tik dvejuose seilių mėginiuose (CPIIm 3 – n=1; 4,8 proc., CPIIm 4 – n=1; 6,7 proc.). Atsparumą aminoglikozidams - gentamicinui nešantis genas *aac(3)Iab(aacC1)* nustatytas visose grupėse: labiausiai paplitęs CPIIm 1 (n=5; 26,3 proc.) tiriamųjų seilėse lyginant su CPIIm 3 (n=5; 23,8 proc.) ir CPIIm 4 (n=2; 13,3 proc.) grupėmis. Atsparumo beta laktamams genas *bla_{SHV}* nustatytas tik viename, gingivitu sergančio paciento, seilių mėginyje. Statistiškai reikšmingas skirtumas tarp grupių rastas tik *ermB* geno paplitimo atžvilgiu (p=0,013).

4 lentelė. Atsparumo antibiotikams genų paplitimo palyginimas tarp CPIIm grupių.

	tetA	tetM	bla_{TEM}	bla_{SHV}	ermB	aac(3) Iab(aacC1)	Int11
CPIIm 1 (n=19)	14 (73,7 proc.)	18 (94,7 proc.)	19 (100 proc.)	1 (5,3 proc.)	0 (0 proc.)	5 (26,3 proc.)	5 (26,3 proc.)
CPIIm 3 (n=21)	17 (81,0 proc.)	21 (100 proc.)	21 (100 proc.)	0 (0 proc.)	7 (33,3 proc.)	5 (23,8 proc.)	1 (4,8 proc.)
CPIIm 4 (n=15)	10 (66,7 proc.)	15 (100 proc.)	14 (93,3 proc.)	0 (0 proc.)	3 (20,0 proc.)	2 (13,3 proc.)	1 (6,7 proc.)
p-reikšmė	0,631	0,618	0,273	0,618	0,013	0,713	0,129

3.3. Metagenomo sekvenavimas

3.3.1. Tiriamųjų apklausos duomenys, klinikinis ištyrimas ir jų paskirstymas į grupes

Metagenomo sekvenavimas ir filogenetinė analizė atlikti 34 mėginiams. Iš jų 29 (85,3 proc.) moterų ir 5 (14,7 proc.) vyrų seilių mėginiai. Vidutinis tiriamųjų amžius siekė 60,79 (SD 15,5) metus.

Remiantis periodonto būkle: 13 (38,2 proc.) tiriamųjų sirgo gingivitu (CPIIm 1), 12 (35,3 proc.) turėjo 4 - 5 mm periodonto kišenes (CPIIm 3), 9 (26,5 proc.) turėjo 6 mm ir gilesnes periodonto kišenes (CPIIm 4). CPIIm 3 ir CPIIm 4 grupių tiriamieji identifikuoti kaip periodontitu sergantys asmenys (n=21; 61,8 proc.) (33).

Didžioji dalis visų grupių tiriamųjų naudojo bent vieną tarpdančių valymo priemonę: CPIIm 1 grupėje 84,6 proc. (n=11), CPIIm 3 – 91,7 proc. (n=12), CPIIm 4 – 88,9 proc. (n=8). Vienodas skaičius gingivitu sergančių pacientų (n=7, 53,8 proc.) tarpdančių valymui naudojo tarpdančių šepetėlius ir tarpdančių siūlą, iš jų abi priemonės naudojo 3 respondentai (15,4 proc.) (5 lentelė). CPIIm 3 grupės 9 (75,0 proc.) tiriamieji naudojo tarpdančių siūlą ir 8 (66,7 proc.) tiriamieji naudojo tarpdančių šepetėlius, iš jų 6 (46,2 proc.) respondentai naudojo abi priemonės. Mažiausias santykinis tarpdančių šepetėlių ir tarpdančių siūlo naudojimas stebimas CPIIm 4 grupėje (atitinkamai n=3, 33,3 proc. ir n=4,

44,4 proc.), iš jų nei vienas nenaudojo abiejų tarpdančių valymo priemonių. Nerastas statistiškai reikšmingas ryšys tarp tiriamųjų periodonto būklės ir jų tarpdančių valymo priemonės pasirinkimo ($p=0,161$ ir $p=0,585$).

Didžioji dalis CPIIm 1 grupės tiriamųjų nerūkė ($n=9$, 69,2 proc.) ir vienodas kiekis buvo rūkančių arba rūkusių anksčiau ($n=2$, 15,4 proc.) (5 lentelė). Tuo tarpu dauguma CPIIm 3 ir CPIIm 4 grupių tiriamųjų rūkė anksčiau (atitinkamai $n=9$, 75,0 proc. ir $n=6$, 66,7 proc.) ir tik nedaugelis visai nerūkė (atitinkamai $n=2$, 16,7 proc. ir $n=3$, 33,3 proc.). Nustatytas statistiškai reikšmingas ryšys tarp rūkymo įpročių ir tiriamųjų periodonto būklės ($p=0,031$).

5 lentelė. Apklausos duomenų apie valymo įpročius ir rūkymą palyginimas tarp CPIIm grupių.

	CPIIm 1 (n=13)	CPIIm 3 (n=12)	CPIIm 4 (n=9)	p-reikšmė
<i>Rūkymas, n (proc.)</i>				
Nerūkantys	9 (69,2 proc.)	2 (16,7 proc.)	3 (33,3 proc.)	0,031
Rūkyti metę	2 (15,4 proc.)	9 (75,0 proc.)	6 (66,7 proc.)	
Rūkantys	2 (15,4 proc.)	1 (8,3 proc.)	0 (0 proc.)	
<i>Tarpdančių siūlas, n (proc.)</i>				
Naudoja	7 (53,8 proc.)	9 (75,0 proc.)	3 (33,3 proc.)	0,161
Nenaudoja	6 (46,2 proc.)	3 (25,0 proc.)	6 (66,7 proc.)	
<i>Tarpdančių šepetėliai, n (proc.)</i>				
Naudoja	7 (53,8 proc.)	8 (66,7 proc.)	4 (44,4 proc.)	0,587
Nenaudoja	6 (46,2 proc.)	4 (33,3 proc.)	5 (55,6 proc.)	

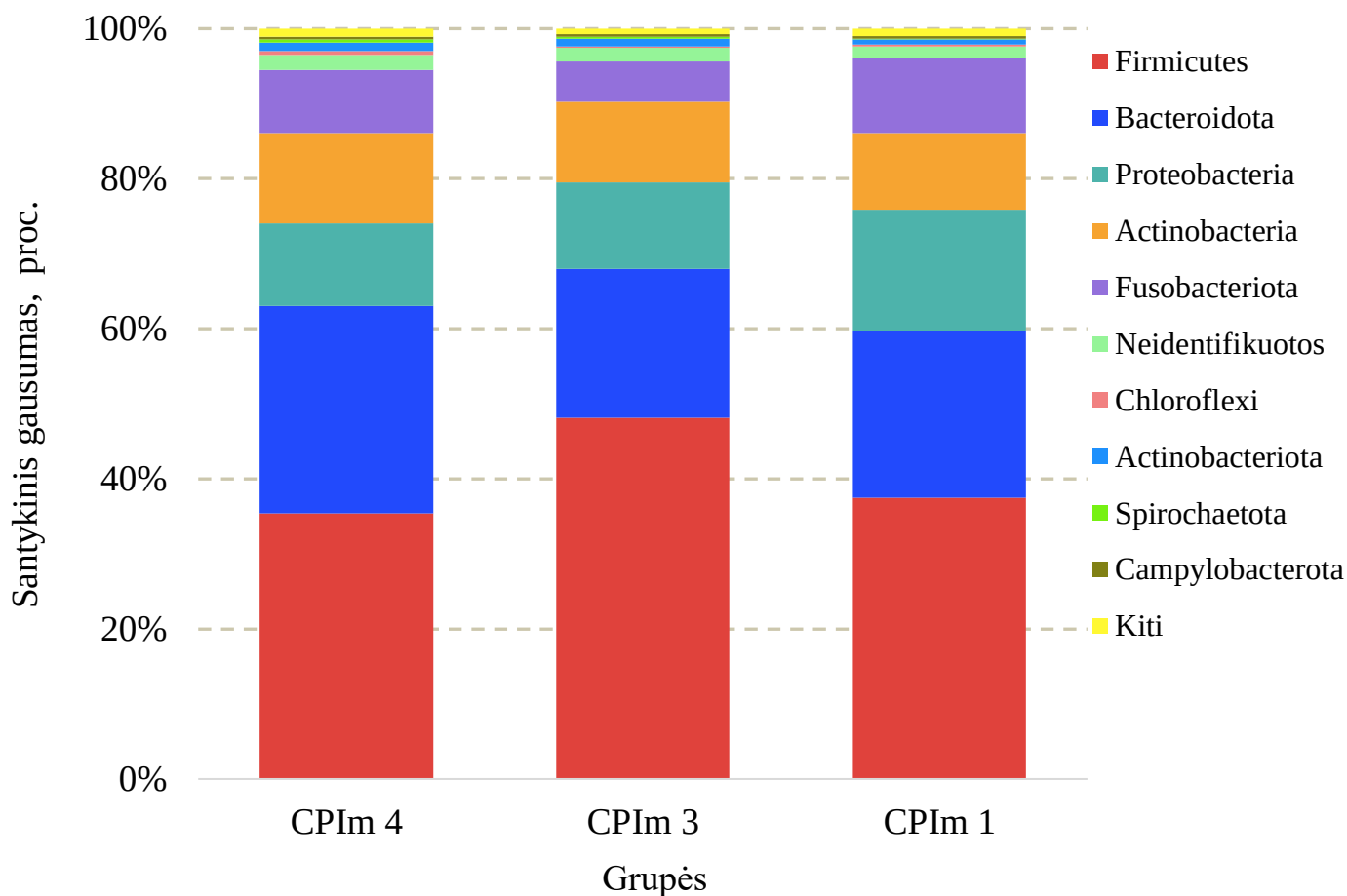
Gingivitu sergančių pacientų turimų dantų skaičiaus vidurkis siekė 23 (SD 5,9), turinčių 4-5 mm periodonto kišenes – 22 (SD 8,2), turinčių 6 ir gilesnes periodonto kišenes 18 (SD 5,6) (6 lentelė). Kraujavimo po zondavimo vidurkis CPIIm 1 grupėje siekė 63,1 proc. (SD 24,5), CPIIm 3 – 64,1 proc. (SD 21,6), CPIIm 4 – 69,3 proc. (SD 25,6). BOP ir turimų dantų skaičius tarp grupių, suskirstytų pagal modifikuotą CPI indeksą, statistiškai reikšmingai nesiskyrė (atitinkamai $p=0,822$ ir $p=0,222$) (6 lentelė).

6 lentelė. Tiriamųjų amžiaus, turimų ir kraujuojančių dantų skaičiaus palyginimas tarp CPIIm grupių.

	CPIIm 1 (n=13)	CPIIm 3 (n=12)	CPIIm 4 (n=9)	p-reikšmė
Metai, vidurkis (SD)	59,2 (14,9)	61,8 (17,6)	61,9 (15,0)	0,894
Dantų skaičius, vidurkis (SD)	23 (5,9)	22 (8,2)	18 (5,6)	0,222
BOP, vidurkis proc. (SD)	63,1 (24,5)	64,1 (21,6)	69,3 (25,6)	0,822

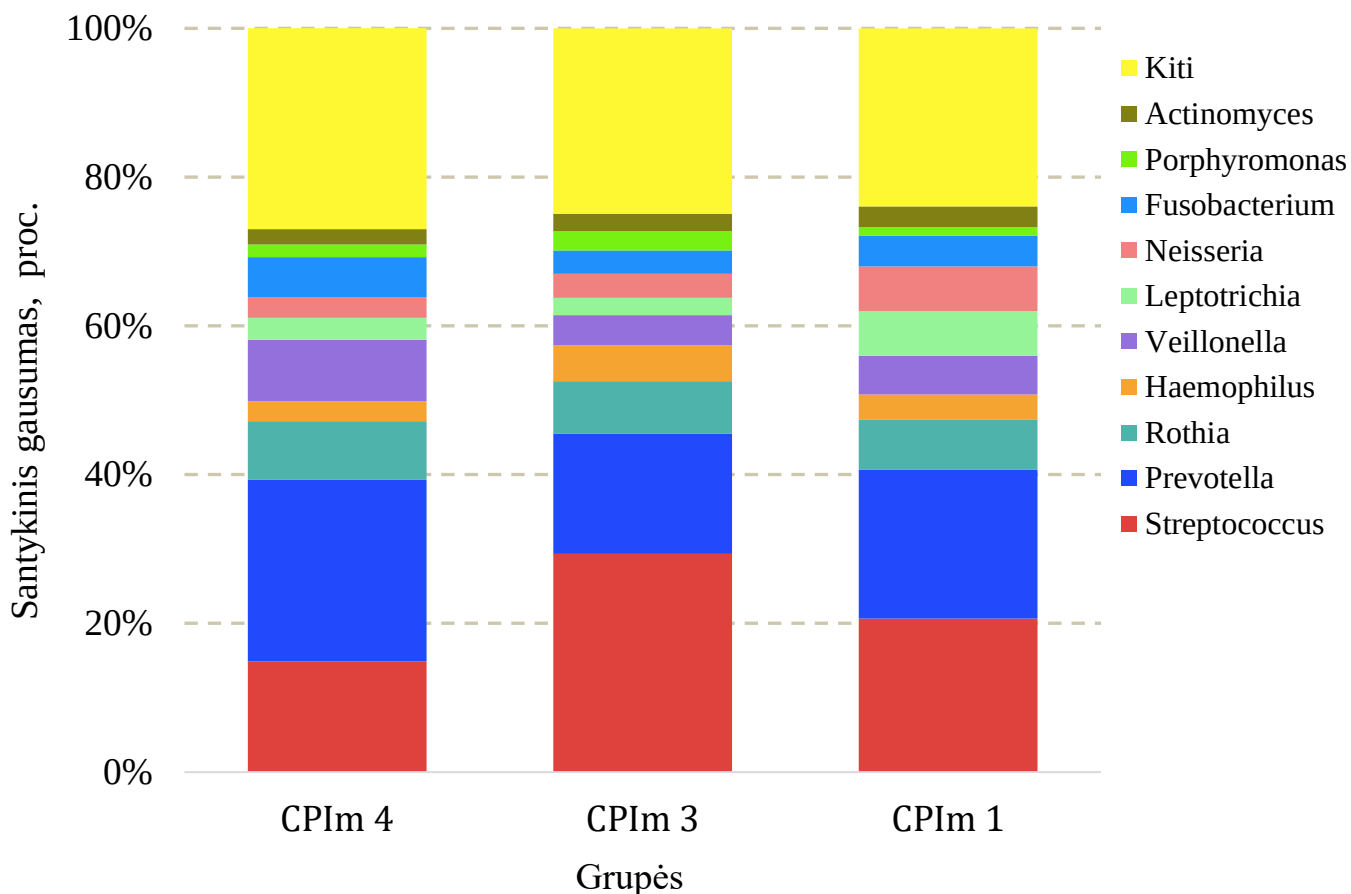
3.3.2. Metagenomo sekvenavimo analizės rezultatai

Tyrimo metu atliktas seilių mikroorganizmų sekvenavimas, naudojant 16S rRNR geno V3 ir V4 regionų amplikonus. Metagenomo sekvenavimas atskleidė, kad seilėse aptinkami bakterijų tipai, sudarantys daugiau nei 94 proc. visų tiriamų grupių mikrobiotos, yra: *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteriota*. Visose grupėse santykinai dominavo *Firmicutes*: CPIIm 1 - 37,5 proc., CPIIm 3 - 48,2 proc., CPIIm 4 - 35,4 proc. (3 pav.). Statistiškai reikšmingai *Firmicutes* dominavo labiau CPIIm 3 grupėje lyginant su CPIIm 4 grupe ($p=0,024$). Tipas *Bacteroidota* santykinai gausiau buvo aptinkamas tiriamųjų, turinčių galias (6 mm ir/ar gilesnes) periodonto kišenes, seilėse (27,7 proc.) palyginus su turinčių 4 - 5 mm periodonto kišenes ir gingivitu sergančių pacientų seilėmis (atitinkamai 19,8 proc. ir 22,3 proc.). *Proteobacteria* santykinai dominavo gingivitu sergančių tiriamųjų grupėje (16,1 proc.) lyginant su CPIIm 3 (11,6 proc.) ir CPIIm 4 (11,0 proc.) grupėmis. Taip pat, *Fusobacteriota* tipo bakterijų CPIIm 1 grupėje (10,1 proc.) aptikta santykinai gausiau nei CPIIm 3 (5,4 proc.) ir CPIIm 4 (8,4 proc.) grupėse. Kita vertus, CPIIm 4 grupė pasižymėjo santykinai didesniu *Actinobacteria* (12,0 proc.) taksonominių vienetų kiekiu (CPIIm 1 - 10,2 proc., CPIIm 3 - 10,7 proc.) (1 pav.). Sergančių gingivitu ir turinčių negalias periodonto kišenes santykinis *Chloroflexi* santykinis gausumas seilėse aptiktas vienodas (0,2 proc.), o turinčių galias periodonto kišenes šiek tiek didesnis (0,6 proc.). Gingivitu, sergančių pacientų seilėse, 10 gausiausių bakterijų tipų santykinis gausumas reikšmingai nesiskyrė nuo sergančių periodontitu tiriamųjų seilių ($p>0,05$). Seilių sudėtis 10 dominuojančių tipų lygmenyje tarp dviejų periodontitu sergančių tiriamųjų grupių, reikšmingai nesiskyrė ($p>0,05$), išskyrus *Firmicutes* ($p=0,024$).



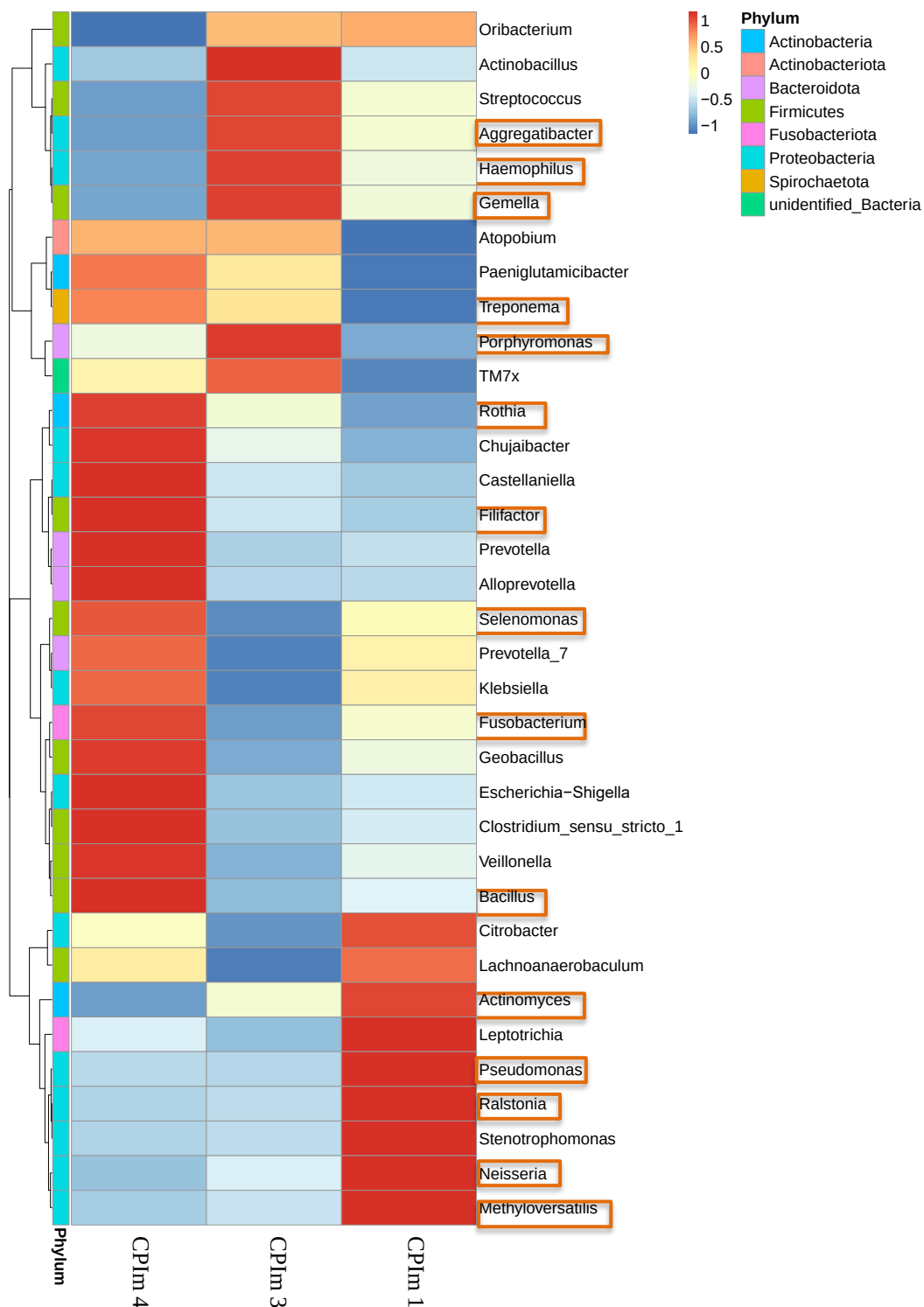
3 pav. Santykinis gausumas tipų lygmenyje.

Paveikslėlyje nr. 4 matyti, kad didžiausią seilių mikrobiomo dalį visose grupėse sudarė dvi bakterijų gentys: *Streptococcus* (CPIm 1 – 20,7 proc.; CPIm 3 – 29,3 proc.; CPIm 4 – 14,9 proc.) ir *Prevotella* (CPIm 1 – 20,0 proc.; CPIm 3 – 16,2 proc.; CPIm 4 – 24,4 proc.). *Streptococcus* statistiškai reikšmingai santykinai gausiau aptikta seilėse pacientų, turinčių negilias – 4 – 5 mm periodonto kišenes lyginant su pacientais, turinčiais galias periodonto kišenes (6 mm ir daugiau) ($p=0,014$). *Leptotrichia* ir *Neisseria* santykinis genčių gausumas nustatytas didesnis CPIm 1 (atitinkamai 6,0 proc. ir 6,0 proc.) grupėje lyginant su CPIm 3 (atitinkamai 2,3 proc. ir 3,3 proc.) ir CPIm 4 (atitinkamai 3,0 proc. ir 2,8 proc.) grupėmis. *Rothia* (7,8 proc.), *Veillonella* (8,3 proc.) ir *Fusobacterium* (5,4 proc.) gentys dominavo CPIm 4 grupėje palyginus su CPIm 3 (atitinkamai 7,1 proc., 4,1 proc. ir 3,1 proc.) ir CPIm 1 (atitinkamai 6,7 proc., 5,2 proc. ir 4,1 proc.) grupėmis. Tuo tarpu, *Haemophilus* (4,8 proc.) santykinis gausumas didžiausias CPIm 3 grupėje. Periodontitu (CPIm 3 ir CPIm 4) sergančių pacientų seilėse aptiktas didesnis santykinis *Porphyromonas* genties gausumas (CPIm 3 – 2,6 proc.; CPIm 4 – 1,7 proc.) lyginant su gingivitu sergančių tiriamųjų seilėmis (1,2 proc.). Išskyrus *Streptococcus* statistiškai reikšmingą skirtumą tarp CPIm 3 ir CPIm 4 grupių, statistiškai reikšmingi skirtumai nerasti lyginant grupes tarp likusių gausiausių 9 genčių ($p>0,05$).



4 pav. Santykinis gausumas genčių lygmenyje.

Paveikslėlyje nr. 5 vaizduojamas trijų grupių santykinis palyginimas retesnių genčių lygmenyje. CPIm 3 grupėje lyginant su kitomis grupėmis, santykinai gausiau aptinkama *Aggregatibacter*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Gemella* padermių. CPIm 4 grupėje palyginus su CPIm 1 ir CPIm 3 dominuoja *Selenomonas*, *Filifactor*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Bacillus* gentys. Rastas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp CPIm 3 ir CPIm 4 grupių *Gemella* genties santykinio gausumo ($p=0,005$). CPIm 1 grupėje dominuoja *Proteobacteria* tipo gentys: *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Stenotrophomonas*, *Neisseria* ir *Methyloversatilis*.



5 pav. Santykinis gausumas sekų, nustatytų genties rango taksonominiu lygiu. Eilutėse pateikiamos gentys ir spalvinis jų santykinis gausumas amplitudėje nuo – 1 iki 1: didesnis nei vidutinis rodomas raudona spalva (+1), mažesnis už vidutinį – mėlyna spalva (-1). Stulpeliuose vaizduojamos trys tiriamųjų grupės.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Pasaulyje atlikta nemažai studijų, nagrinėjančių burnos mikrobiotą (3,11,15,17,20–22,25–28,30,31,40–42,88), tačiau suaugusių, sergančių periodonto ligomis ir turinčių seilėtekio sutrikimus,

seilių mikrobiota neištirta. Dauguma tyrimų nagrinėja podanteninio ar viršdanteninio apnašo mikrobiotos ir periodonto ligų ryšį, o seilių sudėties analizei dėmesio skiriama mažiau (21,26,27,41). Šis tyrimas išsiskiria ir tuo, jog Lietuvoje seilių mikrobiotos sudėties analizė taikant metagenomo sekvenavimus iki šiol neatlikta. Galime teigti, kad pirmą kartą pasaulyje išnagrinėta periodonto ligomis ir seilėtekio sutrikimus turinčių asmenų seilių mikrobiota. Pirmą kartą Lietuvoje ištirtas atsparumo priešmikrobiniais junginiams genų paplitimas seilėse.

Periodonto ligos – uždegiminės kilmės ligos, atsirandančios dėl mikroorganizmų ir šeimininko imuninio atsako sąveikos. Periodonto audinių pažeidimai pradeda vystytis sutrikus pusiausvyrai tarp mikroorganizmų ir tarp šeimininko ir mikroorganizmų. Tad priešingai nei kitos bakterinės ligos, periodontitą ir gingivitą sukelia ne pavieniai mikroorganizmai, bet burnos mikrobiotos disbiozė (35). Tyrimo metu atliktas metagenomo sekvenavimas atskleidė, kad nepriklausomai nuo periodonto audinių pažeidimo laipsnio, daugiau nei 94 proc. seilių mikrobiotos sudaro penki pagrindiniai filogenetiniai bakterijų tipai: *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteriota*, kiti tyrimai nurodė panašius rezultatus (24,41,42) (3 pav.). Remiantis kitų studijų duomenimis, tokia mikrobiotos dominuojanti sudėtis nustatoma ir sveikų pacientų seilėse, be to, ne tik seilėse, bet ir kitose burnos vietose, pavyzdžiui, ant liežuvio paviršiaus, dantų apnaše (10,23). Tyrimo metu nebuvo nustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp periodonto grupių ir pagrindinių filogenetinių tipų, išskyrus reikšmingą *Firmicutes* tipo pagausėjimą pacientų, turinčių 4 – 5 mm periodonto kišenės lyginant su tiriamaisiais, turinčiais gilią (6 mm ir didesnę) periodonto kišenę ($p=0,024$).

Gingivitu sergančių tiriamųjų grupėje dominavo *Proteobacteria* (16,1 proc.) ir *Fusobacteriota* (10,1 proc.) lyginant su kitomis grupėmis, kita vertus, pacientai su giliomis periodonto kišenėmis pasižymėjo santykinai didesniu *Actinobacteria* (12,0 proc.) taksonominių vienetų kiekiu (3 pav.). Pacientų, turinčių 4-5 mm periodonto kišenės, seilėse aptiktas didžiausias santykinis kiekis *Firmicutes* (48,2 proc.) tipo bakterijų (3 pav.). Brazilijoje 2020 m. atliktame panašiam tyrime, taip pat, nustatytas *Actinobacteria* ir *Firmicutes* santykinis padidėjimas lėtiniu periodontitu sergančių pacientų seilėse lyginant su gingivitu sergančiais ir sveikais individualais (24). Palyginus podanteninio apnašo mikrobiotos sudėtį tarp sergančių lėtiniu periodontitu tiriamųjų periodonto kišenių gylio, nustatytas *Firmicutes* sumažėjimas gilesnėse nei 5 mm periodonto kišenėse (41). Panašūs rezultatai buvo pastebėti ir mūsų atliktame tyrime. *Firmicutes* dominavo visose grupėse kaip ir mūsų tirtuose mėginiuose, tačiau bendras *Actinobacteria* bakterijų santykinis gausumas Almeida ir kt. (2020) tirtų pacientų seilėse buvo bene dvigubai didesnis nei šio tyrimo visų nagrinėtų grupių seilėse (24). Be to, šie mokslininkai sveikų tiriamųjų seilėse nustatė santykinę *Fusobacteriota* pagausėjimą bei aptiko mažiausią *Proteobacteria* kiekį, tuo tarpu pastarojo tipo santykinis kiekis didėjo prastėjant periodonto būklei, o tai iš dalies nesutinka su mūsų tyrimo rezultatais, kadangi

gingivitas yra lengvesnė ligos forma nei periodontitas (24). Tačiau yra mokslo tyrimų, kurių išvados atitinka mūsų gautus metagenomo sekvenavimo rezultatus, jog *Proteobacteria* santykinis gausumas burnos mikrobiotoje sumažėja sergant periodontitu (27,41) (3 pav.).

Pacientų, turinčių galias periodonto kišenes, seilėse filogenetinių tipų lygmenyje didžiausią dalį mikrobiotos sudarė *Firmicutes* (35,4 proc.) ir labai panašią santykinę dalį *Bacteroidota* (27,7 proc.) (3 pav.). Šioje grupėje *Bacteroidota* taksonominių vienetų santykinis gausumas nustatytas pats didžiausias lyginant su pacientais, turinčiais seklesnes (4-5 mm) periodonto kišenes ar sergančiais gingivitu (atitinkamai 19,8 proc. ir 22,3 proc.) (3 pav.). Panašūs rezultatai gauti tiriant dantų apnašą atskleidė, kad tipų lygmenyje *Bacteroidota* yra santykinai didžiausia bakterijų grupė tiriamųjų, sergančių periodontitu, burnos mikrobiotoje (26,27). Be to, Ge ir kt. (2013) tirdami sergančių lėtiniu periodontitu podanteninio apnašo sudėtį nustatė didesnius *Bacteroidota* santykinius kiekius giliose periodonto kišenėse (>5 mm) (41). Tad galime svarstyti, jog esant gilioms kišenėms į seilių sudėtį patenka didesnis kiekis *Bacteroidota*, *Actinobacteria* filogetinių tipų bakterijų.

Mūsų sekvenavimo rezultatų, pagrįstų taksonominių vienetų identifikavimu, pasiskirstymas genčių lygmenyje, taip pat, iš dalies atitinka ankstesnių panašių tyrimų išvadas (24,30,89). *Streptococcus* ir *Prevotella* bakterijų genčių gausumas buvo nustatytas didžiausias visose grupėse (4 pav.). Kitų tyrimų duomenimis, *Streptococcus* sudaro didžiausią mikrobiotos dalį, tačiau antra pagal gausumą nustatoma gentis varijuoja (*Prevotella*, *Rothia*, *Haemophilus*) (24,25,30). *Streptococcus* genties bakterijos didžiausias santykinis kiekis aptiktas CPIm 1 ir CPIm 3 grupėse (atitinkamai 20,7 proc. ir 29,3 proc.), o CPIm 4 grupės seilių mėginiuose dominavo *Prevotella* genties bakterijos (24,4 proc.) (4 pav.). Gramteigiamos *Streptococcus* genties bakterijos aptinkamos visų tiriamųjų seilėse, tačiau kitų autorių tyrimuose ši gentis labiausiai dominuoja individų, nesergančių periodonto ligomis, mikrobiotoje (25,27). Gingivitu, sergančių pacientų seilėse, *Streptococcus* ir *Prevotella* genčių gausumas beveik nesiskyrė (atitinkamai 20,7 proc. ir 20,0 proc.), o sekančios pagal didžiausią gausumą nustatytos *Rothia* (6,7 proc.), *Leptotrichia* (6,0 proc.) ir *Neisseria* (6,0 proc.) bakterijų gentys (4 pav.). Gingivitu sergančių pacientų seilėse aptiktas didesnis *Leptotrichia*, *Neisseria*, *Actinomyces* genčių gausumas nei periodontitu sergančių asmenų seilėse. Remiantis kitos studijos duomenimis gramteigiamų bakterijų genčių kaip *Actinomyces*, *Streptococcus* santykinis pagausėjimas stebimas sveikų tiriamųjų burnos mikrobiotoje, o turinčių galias periodonto kišenes mikrobiotoje aptinkamas didesnis gramneigiamų obligatinių anaerobų genčių gausumas (*Prevotella*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*) (26). Tačiau, pavyzdžiui gramneigiamų aerobinių genties *Neisseria* bakterijų santykinis padidėjimas seilėse irgi siejamas su sveikais periodonto audiniais (42). Šios genties bakterijos dažniausiai kolonizuojasi ant burnos gleivinės paviršių, manoma, kad dauguma *Neisseria* bakterijų rūšių yra komensalinės, nepatogeninės (42). Almeida ir kt. (2020) aptiko dar kitos gramneigiamos, bet anaerobinės bakterijų genties *Leptotrichia*

pagausėjimą sveikų tiriamųjų seilėse (24). Galime pastebėti tendenciją, kad gingivitu sergančių tiriamųjų seilėse buvo stebimas gausesnis kiekis bakterijų, kaip *Neisseria*, *Leptotrichia*, *Actinomyces*, siejamų su sveikais periodonto audiniais (4 ir 5 pav.).

Periodontitu sergančių pacientų seilėse aptiktas santykinai didesnis *Porphyromonas* bakterijų kiekis (5 pav.). *Porphyromonas* yra viena pagrindinių gramneigiamų anaerobinių burnos patogenų gentis, susijusi su periodontitu. Šios bakterijos gali pakenkti periodonto audiniams ir nustatyta, kad turi įtakos sisteminiams ligoms, pavyzdžiui, Alzheimerio ligai (14,36). Be to, dar viena raudonojo komplekso gramneigiamų anaerobų gentis gausiau aptikta periodontito grupėse lyginant su gingivito grupe yra *Treponema* (5 pav.). Šie rezultatai atitinka ir kito tyrimo išvadas, jog genčių lygmenyje periodontitu sergančių pacientų burnos mikrobiota buvo praturtinta *Porphyromonas*, *Treponema* bakterijomis (42). Lyginant periodontito grupes tarpusavyje, turinčių galias periodonto kišenes tiriamųjų seilėse santykinai gausiau *Treponema*, o 4-5 mm periodonto kišenės santykinai daugiau *Porphyromonas* genties taksonominių vienetų (5 pav.). CPI 4 grupėje lyginant su kitomis grupėmis dominavo ir kitos gentys, kaip *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Filifactor*, *Selenomonas*, tuo tarpu CPI 3 grupė pasižymėjo didesniu *Haemophilus* santykiniu gausumu (5 pav.). Kai kurie tyrėjai mano, kad dėl *Selenomonas sputigena* virulentiškumo faktoriaus ir jos pagrindinio vaidmens apnašų brendime, ši bakterija gali būti svarbus periodonto patogenas (90). Taip pat, jau senokai literatūroje aprašomas *Filifactor* genties vaidmuo periodontito patogenezėje. Tyrimai identifikavo *Filifactor alocis* – gramteigiamą obligatinį anaerobą kaip reikšmingą vaidmenį periodontito patologijoje atliekanti mikroorganizmą, o tai gali paaiškinti santykinį pagausėjimą pacientų, turinčių galias periodonto kišenes, seilėse (21,90). Nustatyta, kad *F. alocis* augimą stimuliuoja oksidacinis stresas, šis patogenas pasižymi įvairiais virulentiškumo veiksniais, susijusiais su bioplėvelės formavimu ir poveikiu šeimininko ląstelėms. Šios genties pagausėjimas nustatytas ir kitos studijos periodontitu sergančių individų seilėse (89). Tad remiantis išnagrinėta literatūra ir gautais metagenomo sekvenavimo analizės duomenis galima svarstyti, jog prastėjant periodonto būklei atsiranda disbiozė, apimanti komensalinių bakterijų tokių kaip *Neisseria* santykinį sumažėjimą ir oportunistinių anaerobinių bakterijų tokių kaip *Prevotella*, *Treponema*, *Porphyromonas*, *Veillonella* pagausėjimą.

Sąsajos tarp seilių mikrobiotos sudėties ir lyties negalime ištirti, nes didžioji dalis tiriamųjų buvo moterys (n=29; 85,3 proc.). Ne vienas mokslinis tyrimas nurodė, kad burnos sausumas yra labiau paplitęs tarp moterų, tad tai galėtų būti viena iš pagrindinių priežasčių paaiškinanti, kodėl moterų kiekis tyrime yra gerokai didesnis (91,92). Be to, remiantis moksline literatūra, žalingi įpročiai, ypač rūkymas sukelia seilių mikrobiotos pokyčius, tačiau tiriamųjų tarpe rūkančiųjų buvo tik keletas, o kiek laiko dalis asmenų neberūko nežinoma, todėl diskutuoti apie rūkymo sukeltus mikrobiotos pokyčius būtų netikslu.

Ne vienas mokslinis tyrimas parodė, kad burnos mikrobiotos sudėtis gali varijuoti priklausomai nuo tautybės, gyvenamosios vietos (20,88). Neseniai Indijoje ištyrus 54 sveikų, nesergančių sisteminėmis ligomis, tiriamųjų seilių sudėtį, nustatyta, kad *Proteobacteria* ir *Bacteroidota* sudaro didžiausią santykinę gausumą (atitinkamai 34 proc. ir 32 proc.), o *Firmicutes* bakterijos sudarė 24 proc. bakterijų mikrobiotos sudėties (88). Palyginimui Brazilijos populiacijoje nepriklausomai nuo periodonto audinių sveikatos dominavo *Firmicutes* (>42,5 proc.) (24). Li ir kt. (2014) nustatė, kad Afrikos gyventojų seilėse tipų lygmenyje dominuoja *Proteobacteria* (>50 proc.) ir *Firmicutes* (apie 20 proc.), vokiečių ir Alaskos gyventojų seilėse dominuoja *Firmicutes* (apie 40 proc.) ir *Bacteroidota* (atitinkamai apie 20 proc. ir 28 proc.), *Proteobacteria* (atitinkamai apie 13 proc. ir 16 proc.) (20). Šio tyrimo lietuvių seilėse tipų lygmenyje gausiausiai aptikta *Firmicutes* (35,4 proc. - 48,2 proc.), *Bacteroidota* (19,8 proc. - 27,7 proc.) ir *Proteobacteria* (11,0 proc. – 16,1 proc.) bakterijų (3 pav.). Nors visų tautybių individų daugiau nei 94 proc. seilių mikrobiotos sudarė tie patys 5 pagrindiniai tipai: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidota*, *Fusobacteriota*, *Actinobacteria*, tačiau moksliniai tyrimai parodė, kad šių tipų santykinė gausa tarp skirtingų populiacijų varijuoja (20,24,88). Atsižvelgus į gautus duomenis, tirtų lietuvių seilių mikrobiota buvo labiausiai panaši į Vokietijos ir Alaskos gyventojų ir labiausiai skyrėsi nuo afrikiečių ir indų populiacijų seilių sudėties. Tai gali būti siejama su genetikos, aplinkos, kultūros, klimato ir gyvenimo būdo veiksnių deriniu. Ateityje ištyrus didesnę kiekį lietuvių seilių mėginių galima būtų plačiau ir tikslingiau diskutuoti apie tautinius skirtumus. Supratimas apie veiksnius, kurie prisideda prie mikrobiotos pokyčių, leistų dar geriau suprasti ryšį tarp mikrobiotos sudėties ir sveikatos bei ligų. Tuomet galima būtų kryptingai kalbėti apie periodontito ir gingivito sukiamą bakterijų disbiozę lietuvių seilėse, nes gauti duomenys buvo lyginami su užsienio tautybės burnos mikrobiotos analizės duomenimis.

Kitas ne ką mažiau svarbus tyrimo tikslas buvo nustatyti atsparumo antimikrobinėms medžiagoms paplitimą tiriamųjų seilėse. Burnos ir viršutinių kvėpavimo takų bakterijų atsparumas antibiotikams kelia didelį susirūpinimą, nes gali pakenkti dabartinio sisteminių infekcijų gydymo veiksmingumui. Didėjantis šių organizmo vietų bakterijų atsparumas antimikrobinėms junginiams tapo rimta gydytojų klinikistų problema (5,67). Tyrimo metu patikrinome genus, kurie sukelia atsparumą antibakteriniams preparatams reguliariai naudojamiems odontologinėje praktikoje: beta laktamams (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*), metronidazoliui (*nim*), makrolidams (*ermB*) (1 lentelė). Nors odontologijoje tetraciklinai, aminoglikozidai nėra dažnai naudojami, atsparumo šiems antibiotikams genus (*tetA*, *tetM*, *aac(3)Iab(aacC1)*) ištyrėme dėl jų svarbos bendrosios medicinos kontekste (1 lentelė).

Odontologijoje antibiotikai skiriami ne tik gydyti odontogenines, bet ir neodontogenines infekcijas. Dar svarbiau, jog dažnai antibiotikai yra skiriami profilaktikos tikslais siekiant sumažinti pooperacinių vietinių ir sisteminių komplikacijų tikimybes, ypač imunosupresuotiems ar

turintiems padidintą infekcinio endokardito riziką pacientams (51). Mokslinėje literatūroje aprašoma, kad dažniausiai odontologijoje yra skiriami antibakteriniai preparatai, kaip amoksisilinas, amoksisilino su klavulano rūgštimi ar metronidazoliu junginiai, metronidazolis, klindamicinas, eritromicinas, klaritromicinas, azitromicinas ir kiti (51). Deja, per pastarąjį dešimtmetį tyrimai apie Lietuvos gydytojų odontologų skiriamus antibiotikus, vartojimo trukmę, jų skyrimo indikacijas ir kitas tendencijas nebuvo publikuoti.

Visų 55 tyrimo dalyvių seilėse atliekant PGR nustatytas bent vienas atsparumo priešmikrobiniams junginiams genas. Atsparumo antibiotikams genai - *bla_{TEM}* ir *tetM* – aptikti bene visuose seilių mėginiuose (n=54; 98,2 proc.) (2 pav.). Priešingai nei šiame tyrime, Brazilijoje atlikta studija nustatė *bla_{TEM}* paplitimą tik 16,4 proc. tiriamųjų seilėse, o *bla_{SHV}* geno nenustatė nei viename mėginyje (24). Tad nors stebimas *bla_{TEM}* paplitimo akivaizdus skirtumas tarp tyrimų, tačiau *bla_{SHV}* rezultatai iš dalies atitinka. Tad įdomu, jog *bla_{TEM}* buvo nustatytas beveik visuose mėginiuose, o *bla_{SHV}* tik viename iš jų (1,6 proc.) (2 pav.). Tokius duomenis patvirtino ir ankstesnis Kim ir kt. (2011) atliktas tyrimas (78). Koukos ir kt. (2016) apskaičiavo, kad bendras *bla_{TEM}* geno paplitimas tirtų 154 graikų burnos mikrobiotoje siekė 71 proc. (77). Tyrėjai nustatė, kad genų paplitimo dažniui didesnę įtaką turėjo paimto mėginio tipas nei periodonto būklė. Būtent liežuvio nuograndos mėginiuose aptiktas reikšmingai didesnis paplitimas nei viršdanteninio dantų apnašo mėginiuose (77). Svarbu prisiminti, kad seilėse aptinkami įvairių burnos nišų mikroorganizmai, o ypač liežuvio nugarinio paviršiaus ir seilių mikrobiotos yra panašios, tad tai galėtų būti vienas iš paaiškinimų, kodėl ir seilėse nustatytas toks didelis paplitimas. Koukos ir kt. (2016) ir šio tyrimo *bla_{TEM}* geno rezultatų skirtumas galėjo atsirasti dėl skirtingų tyrimo kriterijų, nes šių autorių tyrime negalėjo dalyvauti asmenys per pastaruosius 6 mėnesius vartoję antibiotikus. Buvo stebima, jog tiriamųjų, gydytų amoksisilino su metronidazolio deriniu, mikrobiotoje per du mėnesius atsparių amoksisilinui anaerobinių bakterijų padermių padaugėjo, o po 6 mėnesių vėl sumažėjo (93). Tokie rezultatai atskleidžia, kad atsparumas antimikrobinėms didėja vartojant antibiotikus bei išryškina vieną iš priežasčių, kodėl šiame tyrime gautas didesnis *bla_{TEM}* paplitimas. Nepaisant skirtumų, visuose minėtuose tyrimuose *bla_{TEM}* genas, koduojantis atsparumą amoksisilinui, buvo labiausiai paplitęs tarp tiriamųjų, tad galima svarstyti, kad dažnas šio antibakterinio preparato skyrimas pacientams turėjo įtakos geno sklaidai.

Moraes ir kt. (2015) atlikta sisteminė apžvalga nurodė, jog atsparumo tetraciklinui *tetM* geno didžiausias paplitimas nustatytas seilėse (siekė 100 proc.), o viršdanteniniame apnaše siekė 77,7 proc. (82). Vienas iš tyrimų nustatė *tetM* geną 134 iš 135 (99,3 proc.) tiriamųjų seilėse (80). Šie rezultatai atitinka mūsų gautus duomenis, tačiau tyrimų apie *tetA* geno paplitimą burnos mikrobiotoje trūksta, nors tai buvo trečias pagal gausumą aptiktas genas seilėse (n=41, 74,5 proc.) (2 pav.). Tn916 transpozonas, aptinkamas *Streptococcus*, *Veillonella* ir kt. burnos bakterijų gentyse, yra siejamas su *tetM* genu, dėl mobiliųjų genetinių elementų horizontali genų pernaša vyksta dar efektyviau ir

greičiau (67,73). Tad nors sisteminis beta laktamų vartojimas yra tikėtinas veiksnys, turintis įtakos *blaTEM* geno paplitimui, priešingai atsparumo tetraciklinams genų paplitimas gali būti susijęs su kitomis priežastimis, pavyzdžiui, šių genų įgijimu iš aplinkos ar per maisto grandinę (94). Beje, ryšys tarp periodonto būklės ir atsparumo tetraciklinams genų paplitimo nebuvo nustatytas ir kituose tyrimuose (70).

Panašus paplitimas tiriamųjų seilėse nustatytas *ermB* ir *aac(3)Iab(aacC1)* genų (atitinkamai 18,2 proc. ir 21,8 proc.), pastarasis seilių mikrobiotoje anksčiau nebuvo tirtas (2 pav.). Ankstesniuose tyrimuose *ermB* genas dažniausiai nustatytas burnoje lyginant su kitais atsparumą makrolidams koduojančiais genais (80,81). Italijos tyrėjų atlikta studija naudojant lizdinės polimerazės grandininės reakcijos metodą *ermB* geną aptiko 36,4 proc. tiriamųjų seilių mėginiuose (80). Be to, *ermB* genas nustatytas ir suomių, prancūzų, italų, norvegų seilių mėginiuose (95). Kaip ir *tetM*, *ermB* genas dažnai aptinkamas mobiliuosiuose genetiniuose elementuose, vienas iš jų – Tn6815 yra siejamas tiek su *ermB*, tiek su *tetM* genų pernaša (73). Tad konjugacijos pagalba šie genai gali greitai plisti burnos ertmėje tarp įvairių bakterijų. Komensalinės *Streptococcus viridans* grupės bakterijos konjugaciniu būdu gali perduoti atsparumą eritromicinui koduojančius genus pagrindiniams *Streptococcus* patogenams, tokiems kaip *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* (81).

Iš visų tirtų atsparumo priešmikrobiniais junginiams genų vienintelis atsparumą metronidazoliui koduojantis *nim* genas nebuvo nustatytas nei viename seilių mėginyje (2 pav.). Kitų studijų duomenimis, *nim* genas irgi nebuvo aptiktas nepriklausomai nuo mėginio tipo (seilės, liežuvio nugarinio paviršiaus nuograndos, podanteninis apnašas) (24,67,77). Tokie rezultatai leidžia galvoti, kad atsparumas metronidazoliui nėra išplitęs, tačiau antibiotikas bet koku atveju turėtų būti atsakingai vartojamas klinikiniam darbe.

Tyrime nagrinėti atsparumo priešmikrobiniais junginiams genai dažniausiai aptinkami mobiliuose genetiniuose elementuose. Dėl šios savybės bakterijos pasižymi didesniu horizontalios genų pernašos greičiu, todėl geba efektyviai konjugacijos būdu keistis genais tarp skirtingų bakterijų padermių ir lemia atsparumo antimikrobinėms medžiagoms plitimą (66). *Int1* genas, koduojantis vieną iš svarbių atsparumo sklaidai elementų, aptiktas 7 (12,7 proc.) tiriamųjų seilėse (3 pav.). Remiantis literatūra daugelis antimikrobinių atsparumo genų yra aptinkami anaerobinėse bakterijose (8,83). Skirtingo sunkumo periodonto būklės buvo lyginamos tarpusavyje, nes periodontitu sergančių pacientų seilėse gausiau aptinkama anaerobinių bakterijų, dėl kurių gali skirtis atsparumo antibiotikams paplitimas. Nepaisant to, statistiškai reikšmingas skirtumas tarp periodonto būklės ir nustatytų atsparumo antibiotikams genų paplitimo nerastas, išskyrus *ermB* geną, kuris gausiau aptiktas periodontitu nei gingivitu sergančių tiriamųjų seilėse (4 lentelė). Remiantis kitų tyrimų išvadomis, periodonto būklė nedarė reikšmingos įtakos genų paplitimui (24,77). Atsižvelgus į kitus tyrimus reikalinga išnagrinėti daugiau tiriamųjų seilių, kad galima būtų patvirtinti *ermB* paplitimo

ryši su periodonto sveikatos sutrikimais, nes bendras paplitimas siekiantis tik 18,2 proc. buvo lygintas trijose grupėse.

Tyrimo apribojimai ir rekomendacijos tolimesniems tyrimams

Pirma, periodontologinis ištyrimas vertino tik kraujavimą po zondavimo bei periodonto kišenių gylį. Pasirinkus kitokį periodontologinį indeksą galimai būtų gauti kitokie nuo jo priklausomi rezultatai. Optimalų periodontologinį ištyrimą sudaro visų dantų įvertinimas, kurio metu zondavimo gylis ir klinikinio jungties prisitvirtinimo lygis nustatomi šešiose kiekvieno danties srityse. Dar tikslesniam diagnozės nustatymui būtų naudinga padaryti panoraminę rentgeno nuotrauką, kurioje būtų galima įvertinti kraštinio kaulo netekimo lygį. Teixeira ir kt. (2020) palygino CPI, modifikuoto CPI, pilno periodontologinio ištyrimo, trijų skirtingų dalinių burnos ištyrimų (angl. *partial-mouth protocols examination*) periodonto ligų paplitimo įvertinimo jautrumą (96). Pasak Teixeira (2020) modifikuotas CPI indeksas buvo pranešesnis nei CPI ir daliniai periodontologiniai ištyrimai (96). Palyginus CPI_{im} ir pilną periodontologinį ištyrimą nustatyta, jog CPI_{im} indeksu diagnozuojant gingivitą jautrumas siekė 100 proc., tačiau diagnozuojant vidutinio sunkumo ir sunkų periodontitą jautrumas siekė 80 proc. (96). Tad nors PSO patvirtinta ištyrimo forma periodonto būklę vertina pagal modifikuotą CPI indeksą, tai yra labiau epidemiologiniams tyrimams tinkamas ištyrimas, be to, periodonto būklės įvertinimo tikslumui pagerinti reikalingi ir kiti parametrai, pavyzdžiui, kiekvieno danties periodonto jungties netekimo lygis, dantų paslankumas ir pūliavimas po zondavimo. Deja, nei viename iš nagrinėtų tyrimų nebuvo naudota naujausia 2017 metais JAV periodontologų akademijos ir Europos periodontologų federacijos sukurta ir patvirtinta periodonto ligų klasifikacija (97). Bendras tyrimų, nagrinėjančių burnos mikrobiotą taikant metagenomo sekvenavimą, trūkumas yra vieningų periodontito vertinimo kriterijų nebuvimas ir didelis metodologinis, diagnostinis kintamumas, kuris sukelia sunkumų interpretuojant ir palyginant skirtingų tyrimų duomenis. Pavyzdžiui, nors dažniausiai yra atliekamas 16S rRNA geno V3 ir V4 sričių amplikonų sekvenavimas, kai kurie tyrimai pasirinko kitas geno sritis. Taip pat, varijuoja pačių seilių mėginių surinkimas, vieni tyrimai nagrinėjo nestimuliuotų, kiti – stimuliuotų seilių mikrobiotos sudėtį.

Kitas tyrimo apribojimas galėtų būti tik sergančių periodonto ligomis pacientų seilių mikrobiotos ištyrimas. Ateityje būtų naudinga ištirti pacientų, turinčių sveikus periodonto audinius, seilių mikrobiotos sudėtį. Tuomet būtų galima palyginti seilių mikrobiotos sudėties skirtumus ne tik tarp sergančiųjų, bet ir tos pačios populiacijos sveikų individų.

Dauguma seilių mėginių buvo paimta iš moterų, tad tyrimo metu negalėjome palyginti skirtumų tarp lyties. Taip pat, grupės, sukurtos pagal periodonto būklės sveikatą, buvo netolygios, t.y. daugiausiai tiriamųjų sirgo gingivitu, o mažiausiai turėjo 6 mm ir gilesnes periodonto kišenes. Be

to, apklausiant pacientus apie rūkymą, jeigu metė rūkyti, būtų tikslinga surinkti ir informaciją kiek laiko neberūko.

Tiriant atsparumo priešmikrobiniams preparatams genus PGR metodu turėjome neigiamą kontrolinę grupę, tačiau teigiamos kontrolės nebuvo. Tiriamieji nebuvo apklausti apie paskutinius vartotus antibakterinius vaistus, todėl nebuvo galimybės į tiriamųjų atrankos kriterijus įtraukti antibiotikų nevartojimo laikotarpio, kuris remiantis duomenimis geriausiai būtų 6 mėnesiai (93). Neseniai vartoti antibiotikai galėjo padidinti atsparumo genų paplitimą tirtuose mėginiuose. Taip pat, darbas laboratorijoje (nuo genominės DNR išskyrimo) užtruko ilgiau nei metus. Nors ir laikant genetinę medžiagą pagal rekomendacijas - 20°C temperatūroje, DNR švarumas ir koncentracija laikui bėgant prastėja ir sukelia sunkumus atliekant PGR.

Tiek atsparumo antibiotikams genų paplitimas, tiek burnos mikrobiotos analizė buvo pagrįstos nedideliu mėginių skaičiumi, o tai apriboja galimybes pateikti rekomendacijas ir tiksliai išvadas. Dėl šios priežasties reikalingi tolimesni tyrimai su didesne imtimi, kurie padėtų įgyti visapusišką supratimą apie lietuvių seilių mikrobiotos ypatumus bei atsparumo priešmikrobiniams preparatams genų paplitimą.

5. INTERESŲ KONFLIKTAI

Autoriui interesų konflikto nebuvo.

6. IŠVADOS

1. Metagenomo sekvenavimas atskleidė, jog visų tiriamųjų virš 94 proc. seilių mikrobiotos, nepriklausomai nuo periodonto sveikatos būklės, sudarė 5 pagrindiniai filogenetiniai bakterijų tipai: *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteriota*.
2. Pacientų, turinčių gilesnes nei 4 mm periodonto kišenes, seilėse nustatytas didesnis obligatinių anaerobinių bakterijų genčių, tokių kaip *Porphyromonas*, *Treponema*, *Filifactor* santykinis gausumas palyginus su gingivitu sergančiųjų seilėmis. Pacientų, sergančių gingivitu, seilėse lyginant su turinčiais gilesnes periodonto kišenes aptiktas didesnis santykinis kiekis bakterijų genčių: *Actinomyces*, *Neisseria*, *Leptotrichia* - siejamų su sveikais periodonto audiniais.
3. *BlatEM*, *tetA* ir *tetM* genai dominavo tiriamųjų seilėse, o atsparumą metronidazoliui koduojantis genas neaptiktas nei viename mėginyje.

4. Atsparumo priešmikrobiniams junginiams genų paplitimas nepriklausė nuo tiriamųjų periodonto būklės, išskyrus *ermB* genas statistiškai reikšmingai dažniau aptiktas pacientų, turinčių 4-5 mm periodonto kišenes, seilėse.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju mano baigiamojo darbo vadovei prof. Alinai Pūrienei už skirtą laiką, patarimus rašant baigiamąjį magistro darbą bei palaikymą, paskatinimą ir dėmesį viso proceso metu. Nuoširdžiai dėkoju prof. Eglei Lastauskienei už suteiktas mikrobiologijos srities žinias bei rūpestingą pagalbą atliekant mokslinį darbą. Esu labai dėkinga už Jūsų skirtą laiką, patarimus, palaikymą ir supratimą mokymosi kelyje. Nuoširdžiai dėkoju dr. Indrei Stankevičienei už suteiktą galimybę prisijungti prie mokslinio tyrimo bei pagalbą ir pasidalinimą žiniomis rašant baigiamąjį darbą. Ačiū VU GMC mikrobiologijos laboratorijoje dirbantiems doktorantams bei studentams už patarimus ir pagalbą atliekant laboratorinius tyrimus.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Bendikienė V, Bagdonienė L, Kadziauskas J, Labeikytė D, Markuckas A, Sabaliauskienė V, et al. Biochemijos laboratoriniai darbai. Vilnius: Vilniaus Universiteto Leidykla. 2006. p.114–20.
2. Deo P, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. J Oral Maxillofac Pathol. 2019;23(1):122.
3. Mark JLM, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of the Oral Microbiome: The Site-Specialist Hypothesis. Annu Rev Microbiol. 2019;73(1):335–58.
4. Mark JLM, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. Proc Natl Acad Sci. 2016;113(6):791-800.
5. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. Pathog Glob Health. 2015;109(7):309–18.
6. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol. 2018;4(3):482–501.
7. Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2007;13(1):5–18.
8. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiol Spectr. 2016;4(2).
9. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev MMBR. 2010;74(3):417–33.
10. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. Arch Microbiol. 2018;200(4):525–40.

11. Zhao H, Chu M, Huang Z, Yang X, Ran S, Hu B, et al. Variations in oral microbiota associated with oral cancer. *Sci Rep.* 2017;7(1):11773.
12. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018;26(3):229–42.
13. Sharma N, Bhatia S, Singh Sodhi A, Batra N. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol.* 2018;4(1):42–66.
14. Di Stefano M, Polizzi A, Santonocito S, Romano A, Lombardi T, Isola G. Impact of Oral Microbiome in Periodontal Health and Periodontitis: A Critical Review on Prevention and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):5142.
15. Lim Y, Totsika M, Morrison M, Punyadeera C. Oral Microbiome: A New Biomarker Reservoir for Oral and Oropharyngeal Cancers. *Theranostics.* 2017;7(17):4313–21.
16. Sultan AS, Kong EF, Rizk AM, Jabra-Rizk MA. The oral microbiome: A Lesson in coexistence. *PLOS Pathog.* 2018;14(1):e1006719.
17. Ruan X, Luo J, Zhang P, Howell K. The salivary microbiome shows a high prevalence of core bacterial members yet variability across human populations. *Npj Biofilms Microbiomes.* 2022;8(1):85.
18. Sudhakara P, Gupta A, Bhardwaj A, Wilson A. Oral Dysbiotic Communities and Their Implications in Systemic Diseases. *Dent J.* 2018;6(2):10.
19. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol.* 2014;16(7):1024–33.
20. Li J, Quinque D, Horz HP, Li M, Rzhetskaya M, Raff JA, et al. Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany, and Africa. *BMC Microbiol.* 2014;14:316.
21. Mason MR, Preshaw PM, Nagaraja HN, Dabdoub SM, Rahman A, Kumar PS. The subgingival microbiome of clinically healthy current and never smokers. *ISME J.* 2015;9(1):268–72.
22. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Sci Rep.* 2016;6(1):22164.
23. Palmer RJ. Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontol 2000.* 2014;64(1):20–39.
24. Almeida VDSM, Azevedo J, Leal HF, Queiroz ATLD, Da Silva Filho HP, Reis JN. Bacterial diversity and prevalence of antibiotic resistance genes in the oral microbiome. *PLOS One.* 2020;15(9):e0239664.
25. Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* 2010;4(8):962–74.
26. Chen H, Jiang W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Front Microbiol.* 2014;5.
27. Willis JR, Gabaldón T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms.* 2020;8(2):308.
28. Weng CT, Huang SL, Yang HW, Kao CC, Wei CC, Huang YF. Oral microbiota in xerostomia patients - A preliminary study. *J Dent Sci.* 2022;17(1):324–30.

29. Agostini BA, Cericato GO, Silveira ERD, Nascimento GG, Costa FDS, Thomson WM, et al. How Common is Dry Mouth? Systematic Review and Meta-Regression Analysis of Prevalence Estimates. *Braz Dent J*. 2018;29(6):606–18.
30. Rusthen S, Kristoffersen AK, Young A, Galtung HK, Petrovski BÉ, Palm Ø, et al. Dysbiotic salivary microbiota in dry mouth and primary Sjögren's syndrome patients. *PLOS One*. 2019;14(6):e0218319.
31. Belstrøm D, Holmstrup P, Fiehn N, Rosing K, Bardow A, Paster B, et al. Bacterial composition in whole saliva from patients with severe hyposalivation – a case–control study. *Oral Dis*. 2016;22(4):330–7.
32. Laudénbach JM, Kumar SS. Common Dental and Periodontal Diseases. *Dermatol Clin*. 2020;38(4):413–20.
33. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *Sci World J*. 2020;2020:1–8.
34. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol*. 2017;44(5):456–62.
35. Genco RJ, Sanz M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. *Periodontol 2000*. 2020;83(1):7–13.
36. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv*. 2019;5(1):eaau3333.
37. Chattopadhyay I, Lu W, Manikam R, Malarvili MB, Ambati RR, Gundamaraju R. Can metagenomics unravel the impact of oral bacteriome in human diseases? *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2023;39(1):85–117.
38. Kumar M, Umashankar DN, Viswanath Deepak, Girish G. Role of the Oral Microflora in Health and Disease. *J Indian Acad Oral Med Radiol*. 2013;25(3):184–7.
39. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134–44.
40. Jiang Y, Song B, Brandt BW, Cheng L, Zhou X, Exterkate RAM, et al. Comparison of Red-Complex Bacteria Between Saliva and Subgingival Plaque of Periodontitis Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:727732.
41. Ge X, Rodriguez R, Trinh M, Gunsolley J, Xu P. Oral Microbiome of Deep and Shallow Dental Pockets In Chronic Periodontitis. *PLOS One*. 2013;8(6):e65520.
42. Shi C, Cai L, Xun Z, Zheng S, Shao F, Wang B, et al. Metagenomic analysis of the salivary microbiota in patients with caries, periodontitis and comorbid diseases. *J Dent Sci*. 2021;16(4):1264–73.
43. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022;399(10325):629–55.
44. European Centre for Disease Prevention and Control. The bacterial challenge, time to react: a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Stockholm: ECDC; 2009. p.1-15.
45. Kärki T, Merk H, Högberg LD, Plachouras D, Suetens C, Monnet DL. Assessing the health burden of infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU/EEA, 2016-2020. Stockholm: ECDC; 2022.

46. O'Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. Wellcome Trust and HM Government. Government of the United Kingdom. 2016.
47. Poudel AN, Zhu S, Cooper N, Little P, Tarrant C, Hickman M, et al. The economic burden of antibiotic resistance: A systematic review and meta-analysis. *PLOS One*. 2023;18(5):e0285170.
48. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS Net) 2017. 2018. p.3-24.
49. Săndulescu O, Preoteșcu LL, Streinu-Cercel A, Şahin GÖ, Săndulescu M. Antibiotic Prescribing in Dental Medicine-Best Practices for Successful Implementation. *Trop Med Infect Dis*. 2024;9(2):31.
50. Tousi F, Al Haroni M, Lie SA, Lund B. Antibiotic prescriptions among dentists across Norway and the impact of COVID-19 pandemic. *BMC Oral Health*. 2023;23(1):649.
51. Stein K, Farmer J, Singhal S, Marra F, Sutherland S, Quiñonez C. The use and misuse of antibiotics in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2018;149(10):869-884.
52. Falkenstein S, Stein JM, Henne K, Conrads G. Trends in antibiotic use and microbial diagnostics in periodontal treatment: comparing surveys of German dentists in a ten-year period. *Clin Oral Investig*. 2016;20(8):2203–10.
53. Preus HR, Fredriksen KW, Vogsland AE, Sandvik L, Grytten JI. Antibiotic-prescribing habits among Norwegian dentists: a survey over 25 years (1990–2015). *Eur J Oral Sci*. 2017;125(4):280–7.
54. Cope AL, Francis NA, Wood F, Chestnutt IG. Antibiotic prescribing in UK general dental practice: a cross-sectional study. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2016;44(2):145–53.
55. Yesudian GT, Gilchrist F, Bebb K, Albadri S, Aspinall A, Swales K, et al. A multicentre, multicycle audit of the prescribing practices of three paediatric dental departments in the North of England. *Br Dent J*. 2015;218(12):681–5.
56. Contaldo M, D'Ambrosio F, Ferraro GA, Di Stasio D, Di Palo MP, Serpico R, et al. Antibiotics in Dentistry: A Narrative Review of the Evidence beyond the Myth. *Int J Environ Res Public Health*. 2023;20(11):6025.
57. Morgan DJ, Okeke IN, Laxminarayan R, Perencevich EN, Weisenberg S. Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(9):692–701.
58. Ocan M, Obuku EA, Bwanga F, Akena D, Richard S, Ogwal-Okeng J, et al. Household antimicrobial self-medication: a systematic review and meta-analysis of the burden, risk factors and outcomes in developing countries. *BMC Public Health*. 2015;15(1):742.
59. Petravičienė Z, Bartašiūnienė V, Židonienė E. Gyventojų požiūrio į racionalų antibiotikų vartojimą tyrimas. *Slauga Moksl Ir Prakt*. 2021;2(6(294)):1–8.
60. Blaser MJ, Melby MK, Lock M, Nichter M. Accounting for variation in and overuse of antibiotics among humans. *BioEssays*. 2021;43(2):2000163.

61. Mazińska B, Strużycka I, Hryniewicz W. Surveys of public knowledge and attitudes with regard to antibiotics in Poland: Did the European Antibiotic Awareness Day campaigns change attitudes? *PLOS ONE*. 2017;12(2):e0172146.
62. Pavydė E, Veikutis V, Mačiulienė A, Mačiulis V, Petrikonis K, Stankevičius E. Public Knowledge, Beliefs and Behavior on Antibiotic Use and Self-Medication in Lithuania. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(6):7002–16.
63. Martinez JL. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol*. 2014;11:33–9.
64. Laws M, Shaaban A, Rahman KM. Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiol Rev*. 2019;43(5):490–516.
65. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Med Kaunas Lith*. 2011;47(3):137–46.
66. Tao S, Chen H, Li N, Wang T, Liang W. The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Medicales*. 2022;2022:3348695.
67. Jiang S, Zeng J, Zhou X, Li Y. Drug Resistance and Gene Transfer Mechanisms in Respiratory/Oral Bacteria. *J Dent Res*. 2018;97(10):1092–9.
68. Redondo-Salvo S, Fernández-López R, Ruiz R, Vielva L, de Toro M, Rocha EPC, et al. Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. *Nat Commun*. 2020;11(1):3602.
69. Popa O, Landan G, Dagan T. Phylogenomic networks reveal limited phylogenetic range of lateral gene transfer by transduction. *ISME J*. 2017;11(2):543–54.
70. Balcazar JL. Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLOS Pathog*. 2014;10(7):e1004219.
71. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. 2013;499(7457):219–22.
72. Holloway BW. Genetics of *Pseudomonas*. *Bacteriol Rev*. 1969;33(3):419–43.
73. Lunde TM, Hjerde E, Al-Haroni M. Prevalence, diversity and transferability of the Tn916-Tn1545 family ICE in oral streptococci. *J Oral Microbiol*. 2021;13(1):1896874.
74. Žvingila D. Rekombinogenezė. *Technologija Kaunas* 2008; p. 115–122.
75. Raleigh EA, Low KB. Conjugation. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier; 2013. p. 144–51.
76. Hussein RJ, Krohn R, Kaufmann-Kolle P, Willms G. Quality indicators for the use of systemic antibiotics in dentistry. *Z Evidenz Fortbild Qual Im Gesundheitswesen*. 2017;122:1–8.
77. Koukos G, Konstantinidis A, Tsalikis L, Arsenakis M, Slini T, Sakellari D. Prevalence of β -lactam (blaTEM) and Metronidazole (nim) Resistance Genes in the Oral Cavity of Greek Subjects. *Open Dent J*. 2016;10(1):89–98.
78. Kim SM, Kim HC, Lee SWS. Characterization of antibiotic resistance determinants in oral biofilms. *J Microbiol*. 2011;49(4):595–602.

79. Albrecht H, Schiegnitz E, Halling F. Facts and trends in dental antibiotic and analgesic prescriptions in Germany, 2012–2021. *Clin Oral Investig*. 2024;28(1):100.
80. Milanović V, Aquilanti L, Tavoletti S, Garofalo C, Osimani A, De Filippis F, et al. Distribution of Antibiotic Resistance Genes in the Saliva of Healthy Omnivores, Ovo-Lacto-Vegetarians, and Vegans. *Genes*. 2020;11(9):1088.
81. Chaffanel F, Charron-Bourgoin F, Libante V, Payot S. Resistance Genes and Genetic Elements Associated with Antibiotic Resistance in Clinical and Commensal Isolates of *Streptococcus salivarius*. *Appl Environ Microbiol*. 2015;81(12):4155–63.
82. Moraes LC, Só MVR, Dal Pizzol TDS, Ferreira MBC, Montagner F. Distribution of Genes Related to Antimicrobial Resistance in Different Oral Environments: A Systematic Review. *J Endod*. 2015;41(4):434–41.
83. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. 2010;13(6):151–71.
84. Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes*. 2001;15(4):209–15.
85. Seputiene V, Bogdaite A, Ruzauskas M, Suziedeliene E. Antibiotic resistance genes and virulence factors in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from diseased farm animals: pigs, cattle and poultry. *Pol J Vet Sci*. 2012;15(3):431–8.
86. Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases among *Escherichia coli* Isolates Collected in a Swedish Hospital and Its Associated Health Care Facilities from 2001 to 2006. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):707–12.
87. Marathe NP, Regina VR, Walujkar SA, Charan SS, Moore ERB, Larsson DGJ, et al. A Treatment Plant Receiving Waste Water from Multiple Bulk Drug Manufacturers Is a Reservoir for Highly Multi-Drug Resistant Integron-Bearing Bacteria. Zhou Z, editor. *PLOS One*. 2013;8(10):e77310.
88. Chaudhari DS, Dhotre DP, Agarwal DM, Gaike AH, Bhalerao D, Jadhav P, et al. Gut, oral and skin microbiome of Indian patrilineal families reveal perceptible association with age. *Sci Rep*. 2020;10(1):5685.
89. Belstrøm D, Fiehn N, Nielsen CH, Kirkby N, Twetman S, Klepac-Ceraj V, et al. Differences in bacterial saliva profile between periodontitis patients and a control cohort. *J Clin Periodontol*. 2014;41(2):104–12.
90. Hiranmayi KV, Sirisha K, Ramoji Rao MV, Sudhakar P. Novel Pathogens in Periodontal Microbiology. *J Pharm Bioallied Sci*. 2017;9(3):155–63.
91. Stankevičienė I. Burnos sausumo būklės: epidemiologiniai ir klinikiniai rodikliai bei sąsajos su genetiniais, elgsenos ir streso veiksniais [dissertation]. Vilnius University; 2024.
92. Jacob LE, Krishnan M, Mathew A, Mathew AL, Baby TK, Krishnan A. Xerostomia – A Comprehensive Review with a Focus on Mid-Life Health. *J -Life Health*. 2022;13(2):100–6.
93. Guerrero A, Nibali L, Lambertenghi R, Ready D, Suvan J, Griffiths GS, et al. Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2014;41(11):1080–9.

94. Pokharel S, Shrestha P, Adhikari B. Antimicrobial use in food animals and human health: time to implement 'One Health' approach. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020;9(1):181.
95. Card RM, Warburton PJ, MacLaren N, Mullany P, Allan E, Anjum MF. Application of microarray and functional-based screening methods for the detection of antimicrobial resistance genes in the microbiomes of healthy humans. *PLOS One*. 2014;9(1):e86428.
96. Teixeira FCF, Leon LM, Gomes EP, Pedrao AMN, Costa Pereira AD, Francisco PMSB. Comparative evaluation of indices and partial-mouth periodontal protocols for epidemiological surveys. *J Dent Health Oral Disord Ther*. 2020;11(4):108–14.
97. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89(S1).