

## ĐẶT VẤN ĐỀ

### 1/Tính cấp thiết của đề tài

Hiện nay, trên thế giới và tại Việt Nam, bệnh viêm quanh răng là một bệnh phổ biến, để lại hậu quả mất răng hàng loạt, mất chức năng ăn nhai ảnh hưởng đến sức khỏe toàn thân và thẩm mỹ. Trong những năm gần đây, ngành Răng Hàm Mặt đã phát triển rất nhiều, có nhiều phương pháp chữa bệnh viêm quanh răng, hay thay thế lại những răng đã bị mất nhưng rất tốn kém cho người bệnh. Bệnh viêm quanh răng do rất nhiều vi khuẩn gây ra, nhưng hai vi khuẩn *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* hay gặp trong các thể viêm quanh răng, đồng thời có liên quan đến một số bệnh toàn thân khác như tim mạch, tiểu đường hay gây biến chứng sinh non trong sản khoa.

Đến nay ở nước ta, chưa có nghiên cứu nào ứng dụng kỹ thuật realtime PCR định lượng vi khuẩn *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* gây bệnh VQR, đồng thời kết hợp với lâm sàng theo dõi sự thay đổi số lượng và tỉ lệ của hai vi khuẩn này trước và sau khi điều trị VQR mạn tính dạng toàn thể bằng phương pháp không phẫu thuật.

Việc định lượng *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* trong bệnh viêm quanh răng cung cấp thông tin quan trọng cho bác sĩ lâm sàng để chỉ định dùng kháng sinh hợp lý cho bệnh nhân giúp giảm thời gian và chi phí điều trị, tránh tình trạng kháng thuốc kháng sinh hiện nay. Do đó, chúng tôi thực hiện đề tài “**Định lượng *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* trong viêm quanh răng bằng realtime**

## **PCR và đánh giá hiệu quả của phương pháp điều trị viêm quanh răng không phẫu thuật” với 2 mục tiêu:**

1. Nhận xét đặc điểm và mối tương quan giữa lâm sàng, X-quang, số lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* trong dịch lợi trên bệnh nhân viêm quanh răng mạn tính dạng toàn thể.
2. Đánh giá hiệu quả của phương pháp điều trị không phẫu thuật đối với viêm quanh răng mạn tính dạng toàn thể dựa trên lâm sàng, X-quang và số lượng, tỉ lệ vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*.

## **2/ Ý nghĩa thực tiễn và đóng góp mới của luận án**

Đề tài đã ứng dụng kỹ thuật realtime PCR giải trình tự gen của *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* và định lượng hai vi khuẩn này trước trong và sau điều trị và theo dõi hiệu quả điều trị của phương pháp không phẫu thuật kết hợp với kháng sinh toàn thân. Hướng nghiên cứu của luận án hoàn toàn mới và không trùng lặp với các luận án đã bảo vệ trong và ngoài nước.

Kết quả của luận án bước đầu đã theo dõi chặt chẽ tỉ lệ vi khuẩn thay đổi trước, trong và sau điều trị tương ứng với các triệu chứng lâm sàng tại Việt Nam và đánh giá được hiệu quả điều trị của phương pháp không phẫu thuật, tránh biến chứng sau phẫu thuật, giảm thời gian lành thương và chi phí điều trị cũng như tránh sang chấn về tâm lý cho bệnh nhân.

Đề tài có ý nghĩa khoa học với chuyên ngành Răng Hàm Mặt, Sinh học phân tử mà còn có ứng dụng cao về xét nghiệm vi khuẩn trong nhiễm trùng vùng răng hàm mặt do răng và nguyên nhân khác.

**Bố cục của luận án gồm:**

Luận án gồm 108 trang không kể các trang tài liệu tham khảo và phụ lục. Ngoài phần đặt vấn đề 3 trang, kết luận 2 trang và khuyến nghị 1 trang, luận án chia thành 4 chương: chương 1- Tổng quan tài liệu 24 trang; chương 2 - Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 20 trang; chương 3 - Kết quả nghiên cứu 35 trang; chương 4 - Bàn luận 23 trang.

**Chương 1****TỔNG QUAN TÀI LIỆU****1.1. Khái niệm, phân loại, vi khuẩn và bệnh sinh viêm quanh răng****1.1.1. Khái niệm:**

Viêm quanh răng (VQR) là viêm các mô nâng đỡ quanh răng do vi khuẩn hay nhóm vi khuẩn đặc hiệu, làm phá hủy dây chằng quanh răng và xương ổ răng tạo thành túi quanh răng hoặc gây tụt lợi hay cả hai triệu chứng trên.

**1.1.2. Phân loại viêm quanh răng:**

Theo phân loại của Hội nghị quốc tế về bệnh viêm quanh răng tại Mỹ năm 1999 có hai loại: các bệnh về lợi (do mảng bám răng, không do mảng bám răng); các bệnh quanh răng liên quan đến cấu trúc chống đỡ răng như viêm quanh răng thể mạn tính, viêm quanh răng thể tấn công,...

## 1.2. Vi khuẩn và bệnh sinh của viêm quanh răng:

Cho đến nay, các nhà nghiên cứu đã chứng minh bệnh viêm quanh răng là do vi khuẩn đặc hiệu nhưng mỗi loại vi khuẩn khác nhau gây ra các thể VQR khác nhau. Bệnh sinh của VQR liên quan đến sự tương tác giữa các yếu tố vi khuẩn và đáp ứng miễn dịch của cơ thể, đồng thời chịu sự tác động thêm bởi yếu tố di truyền và yếu tố nguy cơ môi trường. Vi khuẩn giữ vai trò quan trọng trong bệnh căn của VQR, hai vi khuẩn gây bệnh VQR hay gặp *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* hay gặp trong viêm quanh răng mạn tính dạng toàn thể. Đây là hai vi khuẩn Gram âm, kỵ khí, có rất nhiều gen gây độc như fimbriae (fimA), collagenase (prtC), hemagglutinins, haemolysin, LPS, proteases, kháng nguyên vỏ và leukotoxin (lktA).

## 1.3. Các phương pháp điều trị bệnh viêm quanh răng

Điều trị VQR thành công tùy thuộc việc chẩn đoán sớm, kiểm soát được vi khuẩn gây bệnh. Điều trị VQR cần thời gian dài và phải tái khám, theo dõi thường xuyên. Có hai phương pháp chính: điều trị không phẫu thuật và điều trị phẫu thuật kết hợp với kháng sinh tại chỗ hay toàn thân.

Điều trị không phẫu thuật: là một phức hợp điều trị bao gồm cạo vôi răng, xử lý mặt chân răng, loại bỏ các yếu tố thuận lợi. Chỉ định: túi quanh răng < 5mm, mất bám dính 3-4 mm (trung bình), răng lung lay độ I hoặc II..

## 1.4. Một số phương pháp phát hiện vi khuẩn trong viêm quanh răng

Có nhiều phương pháp được sử dụng để phát hiện vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans* và *P. gingivalis* trong bệnh VQR: nuôi cấy, miễn dịch, sinh học phân tử (phản ứng chuỗi PCR, real-time PCR). Kỹ thuật real-time PCR là kỹ thuật PCR mà sản phẩm khuếch đại DNA đích hiển thị cùng lúc mỗi chu kỳ nhiệt của phản ứng, nên được gọi là PCR thời gian thực. Realtime PCR định lượng được DNA đích nên còn gọi là PCR định lượng (qPCR). Verner và c.s. (2006) nhận định qPCR nhạy hơn kỹ thuật nuôi cấy. Tỷ lệ vi khuẩn phát hiện bằng realtime PCR cao hơn kỹ thuật nuôi cấy, mức độ chênh lệch trong định lượng DNA giữa kỹ thuật realtime PCR với kỹ thuật nuôi cấy lần lượt là 51,4% đối với *P. gingivalis*, 36,1% đối với *T. forsythensis*, 12,5% đối với *F. nucleatum*, 8,3% đối với *P. intermedia*, 3% đối với *A. actinomycetemcomitans*. Kỹ thuật Realtime PCR ngày càng được áp dụng nhiều trong chuẩn đoán vi khuẩn gây bệnh viêm quanh răng do độ nhạy cao, dễ thực hiện, cho kết quả nhanh giúp cho điều trị trúng đích đạt hiệu quả cao.

## Chương 2

### PHƯƠNG PHÁP VÀ ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

#### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

70 bệnh nhân đến khám, được chẩn đoán và điều trị VQR mạn tính tại Khoa Nha chu của Bệnh viện Răng Hàm Mặt tp. Hồ Chí Minh từ 01/10/2011 đến 30/10/2014.

**2.1.1. Tiêu chuẩn chọn mẫu:** tuổi  $\geq 30$ . Chẩn đoán xác định VQR mạn tính dạng toàn thể, có túi quanh răng  $\geq 3\text{mm}$ , đang trong thời kỳ hoạt động biểu hiện bằng viêm lợi, chảy máu túi khi thăm khám bằng cây đo túi Miller. Còn tối thiểu 20 răng. Không có tiền sử bệnh tim mạch, đái tháo đường, bệnh nội tiết, bệnh chuyển hóa. Không sử dụng thuốc kháng sinh, kháng viêm, thuốc tránh thai trước khi tham gia nghiên cứu 1 tháng. Không điều trị bệnh lý quanh răng trước khi tham gia nghiên cứu 3 tháng. Không có thói quen hút thuốc lá. Đồng ý tham gia nghiên cứu. Lấy được bệnh phẩm để làm xét nghiệm realtime PCR, xác định và định lượng được hai vi khuẩn *A.actinomycescomitans* và *P.gingivalis* trong mẫu bệnh phẩm.

**2.1.2. Tiêu chuẩn loại trừ:** đang có áp xe quanh răng hoặc áp xe quanh thân răng hàm lớn thứ ba. Bệnh nhân mắc các bệnh toàn thân. Đang có thai hoặc cho con bú. Bệnh nhân không đồng ý tham gia nghiên cứu hoặc không lấy được bệnh phẩm. Kết quả xét nghiệm realtime PCR chỉ có *A.actinomycescomitans* hoặc *P.gingivalis*.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

**2.2.1. Thiết kế nghiên cứu:** Thử nghiệm lâm sàng, đánh giá kết quả trước - sau điều trị.

**2.2.2. Cỡ mẫu nghiên cứu:** cách tính cỡ mẫu theo công thức  $N = Z^2_{1-\alpha/2} P(1-P)/d^2$  với độ chính xác  $d=10\%$ , độ tin cậy 95%, P là tỷ lệ điều trị đạt kết quả theo tiêu chuẩn hết VQR khoảng 80%,  $\alpha=0,05$ ,  $Z^2_{1-\alpha/2} = 1,96^2$ , cỡ mẫu tối thiểu là 62 bệnh nhân. Để tăng độ chính xác và giảm sai lầm do kỹ thuật, mẫu chính thức là 70 bệnh nhân.

### 2.2.3. Các bước tiến hành nghiên cứu

❖ **Ngày đầu tiên (Thời điểm  $T_0$ ):**

(1) Khám, đánh giá các chỉ số lâm sàng: + Chỉ số mảng bám (PLI) và viêm lợi (GI) theo Silness và Løe (1964) có 4 mức độ. + Độ sâu túi quanh răng (PPD) và mất bám dính lâm sàng (CAL) tính bằng mm. + Răng lung lay theo Miller từ độ I tới III. + Đánh giá mức độ và dạng tiêu xương ổ răng: chụp phim toàn cảnh kỹ thuật số (Panorex).

(2) Lấy mẫu bệnh phẩm làm xét nghiệm realtime PCR định lượng vi khuẩn *A.actinomycetemcomitans* và *P.gingivalis* lần 1.

(3) Hướng dẫn bệnh nhân cách vệ sinh răng miệng: chải răng theo kỹ thuật Bass cải tiến, sử dụng chải mềm và kem đánh Colgate Total. Đưa cho bệnh nhân tờ rơi nhắc nhở về cách chải răng (Phụ lục).

❖ **Sau 1 tuần:** khi có kết quả realtime PCR. Điều trị theo phác đồ cho bệnh nhân. Hẹn bệnh nhân tái khám sau 1 tuần.

❖ **Sau 2 tuần (Thời điểm  $T_1$ ):** Bệnh nhân tái khám, đánh giá các chỉ số lâm sàng, duy trì các phương pháp hỗ trợ cơ học. Lấy

mẫu bệnh phẩm làm xét nghiệm realtime PCR định lượng vi khuẩn *A.actinomycetemcomitans* và *P.gingivalis* lần 2. Hẹn bệnh nhân tái khám sau 04 tuần, 08 tuần, 12 tuần (mốc hẹn bệnh nhân là thời điểm  $T_0$ ).

❖ **Sau 12 tuần (Thời điểm  $T_2$ ):** Bệnh nhân tái khám, đo các chỉ số trên lâm sàng, chụp phim toàn cảnh.

- Lấy mẫu bệnh phẩm làm xét nghiệm realtime PCR định lượng vi khuẩn *A.actinomycetemcomitans* và *P.gingivalis* lần 3.

#### **2.2.3.1. Tiêu chuẩn chẩn đoán VQR mạn tính dạng toàn thể**

- Túi quanh răng  $\geq 3\text{mm}$ , đang hoạt động (chảy máu khi thăm dò). Răng lung lay độ I – III. Giảm chiều cao của mào xương ổ răng:  $3\text{ mm} < \text{mào xương ổ răng}$  (trên phim Panorex kỹ thuật số). Khi tổn thương hiện diện  $> 30\%$  các răng trên cung hàm.

#### **2.2.3.2. Tiêu chuẩn xác định hết VQR mạn tính dạng toàn thể**

❖ Để đánh giá kết quả sau điều trị, chúng tôi dựa vào các tiêu chí sau: Tình trạng lợi viêm: chỉ số GI và chỉ số PLI. Độ sâu túi lợi (PPD). Tình trạng xương ổ răng sau điều trị. Kết quả xét nghiệm realtime PCR định lượng vi khuẩn *A.actinomycetemcomitans* và *P.gingivalis* âm tính hoặc có số lượng rất ít (chuẩn định lượng âm tính hoặc  $< 100$  copy/mẫu). Đánh giá kết quả sau điều trị được chia làm 3 mức độ: tốt, khá, trung bình.

#### **2.2.4. Kỹ thuật lấy bệnh phẩm**

- Các vật liệu (gòn cuộn, côn giấy số 30) và dụng cụ đều được khử khuẩn.



- Lấy bệnh phẩm dịch lợi ở túi quanh răng có chảy máu khi thăm khám và sâu nhất trong các túi khi thăm dò vào ngày đầu tiên trong nghiên cứu.

- Cách lấy bệnh phẩm dịch lợi: cách ly nước bọt với vùng răng lấy mẫu bằng gòn cuộn. Sau khi lau sạch mảng bám trên lợi và thổi nhẹ cho khô, đưa 5 cây côn giấy số 30 và dài 21 mm vô trùng vào đến đáy túi (thao tác nhẹ, tránh chảy máu), để trong 10 giây, lấy côn giấy ra và cho vào lọ effendorf có nắp đậy. Mẫu vi khuẩn *A.actinomycetemcomitans* và *P.gingivalis* được lấy trên bệnh nhân VQR tại khoa Nha chu của Bệnh viện Răng Hàm Mặt tp. Hồ Chí Minh, sau đó được tách chiết DNA và bảo quản ở tủ lạnh sâu (nhiệt độ  $-80^{\circ}\text{C}$  - tủ chuyên biệt SANYO) tại khoa xét nghiệm của bệnh viện cho đến khi thực hiện phân tích tại Trung tâm nghiên cứu Gen-Protein của trường Đại học Y Hà Nội (khi gửi mẫu ra Hà Nội theo đường hàng không chỉ cần để trong thùng đá, một tuần gửi mẫu/lần).

### **2.2.5. Xác định và định lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans* và *P. gingivalis* bằng kỹ thuật realtime PCR**

- ❖ *Tách chiết DNA*: Mẫu bệnh phẩm (dịch lợi) được rửa trong 1ml dịch PBS, ly tâm lấy cạn và tiến hành tách chiết DNA từ dịch cạn bằng bộ Kit QIAamp DNA Mini (QIAGEN-USA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.
- ❖ Nghiên cứu này định lượng tương đối tỷ lệ *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* trong tổng số hệ vi khuẩn. Cách tính lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* theo phương pháp so sánh chu kỳ ngưỡng (Ct):

$$\text{Tỉ lệ } Aa \text{ (hoặc } Pg) = \frac{\text{Ct của các vi khuẩn } 16S \text{ rDNA}}{\text{Ct của } Aa \text{ (hoặc } Pg)}$$

Theo công thức trên, khi chu kỳ ngưỡng (Ct) phát hiện *P. gingivalis* càng thấp, tỷ lệ *P. gingivalis* càng tăng cho biết số lượng *P. gingivalis* trong bệnh phẩm càng nhiều. Điều này phù hợp số lượng *P. gingivalis* nhiều hơn thì cần ít chu kỳ nhiệt khuếch đại hơn. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* âm tính khi đường biểu diễn realtime PCR thấp hơn đường nền; dương tính khi khi đường biểu diễn realtime PCR vượt cao hơn đường nền.

### **2.2.6. Phác đồ điều trị không phẫu thuật áp dụng đối với đối tượng nghiên cứu**

Lấy vôi răng trên và dưới lợi bằng máy siêu âm cho bệnh nhân. Xử lý mặt chân răng, bơm rửa túi quanh răng bằng dung dịch Chlorhexidine 0,12%. Mài chỉnh khớp cắn, cố định các răng lung lay, nhổ răng, làm phục hình tùy theo trường hợp trên lâm sàng. Kháng sinh Metronidazole 1,5g/ngày chia 3 lần, kết hợp với Doxycycline 100mg/ngày chia 3 lần, dùng trong 7 ngày. Súc miệng bằng dung dịch Chlorhexidine 0,12% ở dạng biệt dược là Kin Gingival Mouthwash. Chải răng bằng kem chải răng Colgate Total, ngày 3 lần, sau khi ăn theo phương pháp Bass cải tiến (Phụ lục).

### **2.2.7. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu**

1) Các đối tượng nghiên cứu được cung cấp thông tin đầy đủ về việc tham gia nghiên cứu và hoàn toàn tự nguyện tham gia vào nghiên cứu. 2) Các đối tượng nghiên cứu được miễn phí hoàn toàn các chi phí điều trị và xét nghiệm. Mọi dữ liệu cá nhân thu thập trong

ngiên cứu được mã hóa và giữ bí mật, không phục vụ mục đích nào khác ngoài cam kết đối với đề tài nghiên cứu đang thực hiện.

**2.3. Xử lý và phân tích số liệu:** nhập số liệu bằng Excel và xử lý số liệu bằng phần mềm SPSS. Áp dụng kiểm định T bất cặp để so sánh các chỉ số lâm sàng và xét nghiệm ở các thời điểm trước và sau điều trị. Sử dụng tương quan Spearman's vì các biến số như độ sâu túi quanh răng, mất bám dính lâm sàng, răng lung lay, số lượng vi khuẩn là các biến số độc lập, mối quan hệ giữa các biến là quan hệ tuyến tính và không theo phân bố chuẩn.

## Chương 3

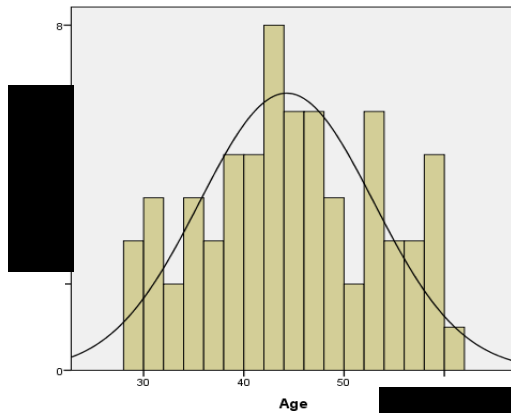
### KẾT QUẢ

#### 3.1. Đặc điểm tuổi và giới tính của nhóm nghiên cứu

**Bảng 3.1. Đặc điểm tuổi và giới tính của đối tượng nghiên cứu**

Giới tính	Số lượng		Tuổi
	n	%	
<i>Nam</i>	44	62,9%	45,14 ± 8,78
<i>Nữ</i>	26	37,1%	42,81 ± 8,51
<i>Tổng số</i>	70	100%	44,27 ± 8,69

**Nhận xét:** Tổng số 70 bệnh nhân tham gia nghiên cứu với độ tuổi trung bình là  $44,27 \pm 8,69$  tuổi, tuổi lớn nhất là 60 và tuổi nhỏ nhất là 29; bệnh nhân nam = 44 người, chiếm tỷ lệ 62,9%, tuổi trung bình  $45,14 \pm 8,78$ ; bệnh nhân nữ = 26 người, chiếm tỷ lệ 37,1%, tuổi trung bình  $42,81 \pm 8,51$ .



**Biểu đồ 3.1. Phân bố về độ tuổi của đối tượng nghiên cứu**

**Nhận xét:** Biểu đồ 3.1 cho thấy độ tuổi mắc bệnh VQR trong nhóm nghiên cứu có sự phân bố chuẩn tạo thành đường cong hình chuông, số bệnh nhân bị bệnh ở tuổi 44 nhiều nhất ( $n = 6$ ).

### 3.2. Đặc điểm lâm sàng và vi khuẩn của bệnh nhân viêm quanh răng tại ngày khám đầu tiên ( $T_0$ )

#### 3.2.1. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân VQR tại ngày khám đầu tiên ( $T_0$ )

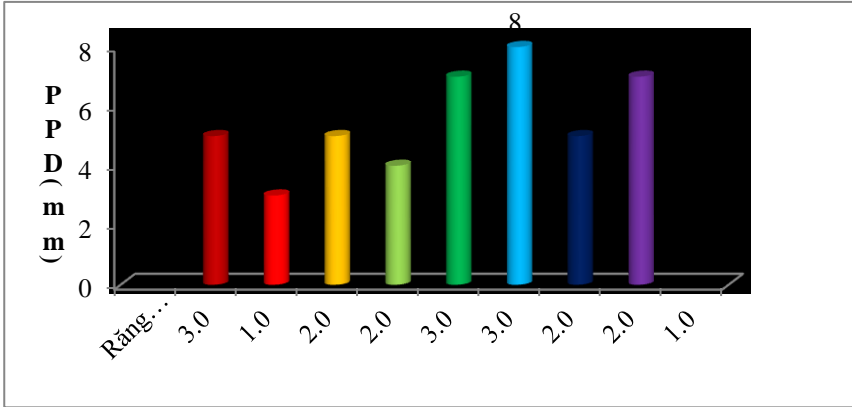
**Bảng 3.2. Đặc điểm lâm sàng của bệnh nhân VQR tại ngày khám đầu tiên ( $T_0$ )**

Đặc điểm lâm sàng	Bệnh nhân VQR mạn tính $n=70$ ( $\bar{X} \pm SD$ )
PLI	$2,67 \pm 0,56$
GI	$2,37 \pm 0,93$
PPD (mm)	$5,78 \pm 1,35$
CAL (mm)	$5,73 \pm 3,15$
Răng lung lay	$1,96 \pm 0,95$
Dạng tiêu xương (Phim Panorex kỹ thuật số)	78,6 %
+ Tiêu xương ngang (%)	12,9 %
+ Tiêu xương chéo (%)	8,6 %
+ Tiêu xương ngang và chéo(%)	

**Nhận xét:** Trong ngày khám đầu tiên, nhìn chung tất cả bệnh nhân có tình trạng bệnh lý nặng: các chỉ số mảng bám răng và chỉ số lợi đều rất cao với điểm số trung bình trong khoảng  $2 \div 3$ ; răng lung

lay nhiều, mm  $5 < \text{túi quanh răng (trung bình)} < 7$  mm, mất bám dính nặng  $> 5$ mm.

### 3.2.1.5. Tương quan giữa độ sâu túi, mất bám dính lâm sàng và răng lung lay trên bệnh nhân VQR tại ngày khám đầu tiên



**Biểu đồ 3.5. Độ sâu túi, mất bám dính và răng lung lay trên bệnh nhân VQR** (ghi chú: trục tung là độ sâu túi, trục ngang là răng lung lay, mỗi bệnh nhân là 1 cột màu khác nhau, số ghi trên cột là mất bám dính).

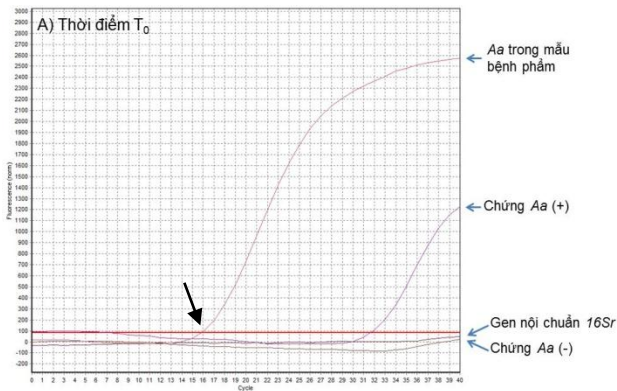
**Nhận xét:** độ sâu túi và răng lung lay tương quan thuận và chặt với  $R = 0,28$  nhỏ hơn +1 (tương quan Spearman's,  $p < 0,05$ ). Độ sâu túi 3mm thì răng lung lay ở mức 1, độ sâu túi trên 3 mm thì răng lung lay ở mức 2 và 3. Mất bám dính và răng lung lay tương quan thuận và chặt với  $R = 0,63$  nhỏ hơn +1 (tương quan Spearman's,  $p < 0,05$ ). Có tương quan mật thiết giữa độ sâu túi quanh răng với sự lung lay của răng và mất bám dính lâm sàng. Túi càng sâu thì mất bám dính và răng lung lay càng nhiều với  $R < +1$  ( $p < 0,05$ , tương quan Spearman's).

### 3.2.2. Đặc điểm vi khuẩn của bệnh nhân VQR tại ngày khám đầu tiên ( $T_0$ )

**Bảng 3.4. Đặc điểm vi khuẩn của bệnh nhân VQR tại ngày khám đầu tiên ( $T_0$ )**

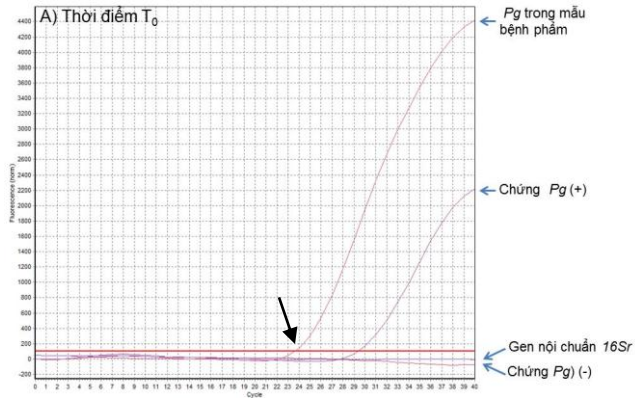
Vi khuẩn <i>A.actinomycetemcomitans</i> và <i>P.gingivalis</i>	Bệnh nhân VQR mạn tính n=70 ( $\bar{X} \pm SD$ )
<b>Số lượng Aa ở dịch lợi (Ct)</b>	20,29 ± 3,31
<b>Tỷ lệ Aa ở dịch lợi</b>	0,67 ± 0,13
<b>Số lượng Pg ở dịch lợi (Ct)</b>	20,35 ± 3,94
<b>Tỷ lệ Pg ở dịch lợi</b>	0,68 ± 0,18

**Nhận xét:** số lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* phát hiện được ở chu kỳ ngưỡng (Ct) thấp có nghĩa lượng vi khuẩn tồn tại với số lượng rất nhiều ở những bệnh nhân VQR. Tỷ lệ vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* so với tổng số vi khuẩn trong miệng chiếm tỷ lệ cao 0,67% và 0,68%.



**Hình 3.5. Kết quả realtime PCR bệnh nhân mã số 01**

(Chu kỳ ngưỡng  $Aa$  tại  $T_0 = 16$  Ct)



**Hình 3.6. Kết quả realtime PCR bệnh nhân mã số 01**

(Chu kỳ ngưỡng  $Pg$  tại  $T_0 = 22,35$  Ct)

### 3.2.2.1. Tương quan giữa độ sâu túi quanh răng và số lượng vi khuẩn trên bệnh nhân VQR tại ngày khám đầu tiên

**Bảng 3.5. Tương quan giữa độ sâu túi quanh răng và số lượng vi khuẩn trên bệnh nhân VQR tại ngày khám đầu tiên**

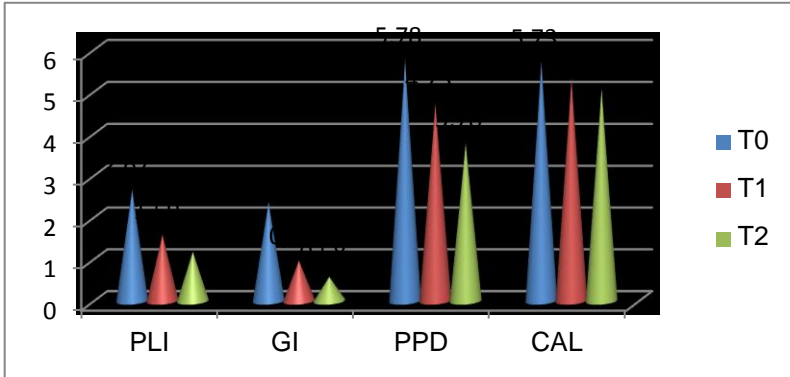
		Vi khuẩn <i>Aa</i>	Vi khuẩn <i>Pg</i>
<b>Độ sâu túi (PPD)</b>	<b>R*</b> Tương quan Spearman's	-0,07	-0,18
	<b>p</b>	0,56	0,10
	<b>n</b>	70	70

**Nhận xét:** tương quan giữa độ sâu túi quanh răng và số lượng vi khuẩn *A. Actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* là tương quan nghịch với  $R > -1$  (bảng 3.5), có nghĩa độ sâu túi càng sâu thì lượng vi khuẩn càng nhiều.



### 3.6. So sánh đặc điểm lâm sàng và vi khuẩn tại các thời điểm $T_0$ , $T_1$ và $T_2$

#### 3.6.1. So sánh đặc điểm lâm sàng tại các thời điểm $T_0$ , $T_1$ và $T_2$



**Biểu đồ 3.10. So sánh các đặc điểm lâm sàng tại các thời điểm  $T_0$ ,  $T_1$  và  $T_2$**  (ghi chú:  $p_1$ : so sánh  $T_0$  với  $T_1$ ,  $p_2$  so sánh  $T_0$  và  $T_2$ . \* $p \leq 0,001$ : rất có ý nghĩa thống kê. Phép kiểm Wilcoxon)

**Nhận xét:** sau 3 tháng điều trị VQR bằng phương pháp không phẫu thuật kết hợp với kháng sinh toàn thân, các triệu chứng lâm sàng về chỉ số mảng bám răng (PLI), chỉ số lợi (GI), độ sâu túi quanh răng (PPD), mất bám dính lâm sàng (CAL) giảm khác biệt có ý nghĩa thống kê: + Chỉ số PLI: từ mức độ kém về trung bình. + Chỉ số GI: nặng về mức độ trung bình. Độ sâu túi quanh răng (PPD): từ 5,78 mm giảm còn 3,78 mm ( $T_2$  giảm 2/3 so với  $T_0$ ).

### 3.6.2. So sánh số lượng vi khuẩn tại các thời điểm $T_0$ , $T_1$ và $T_2$

**Bảng 3.10. So sánh số lượng vi khuẩn tại các thời điểm  $T_0$ ,  $T_1$  và  $T_2$**

Đặc điểm lâm sàng	$\bar{X} \pm SD$			$P_1$	$P_2$
	$T_0$	$T_1$	$T_2$		
<b>Số lượng <i>Aa</i> ở dịch lợi (Ct)</b>	20,29 ± 3,31	26,65 ± 4,04	26,45 ± 3,26	0,000*	0,000*
<b>Tỷ lệ <i>Aa</i> ở dịch lợi</b>	0,67 ± 0,13	0,62 ± 0,21	0,49 ± 0,31	0,432	0,000*
<b>Số lượng <i>Pg</i> ở dịch lợi (Ct)</b>	20,35 ± 3,94	25,78 ± 4,08	24,80 ± 4,67	0,000*	0,000*
<b>Tỷ lệ <i>Pg</i> ở dịch lợi</b>	0,68 ± 0,18	0,67 ± 0,19	0,61 ± 0,15	0,83	0,000*

$p_1$ : so sánh  $T_0$  với  $T_1$ ,  $p_2$  so sánh  $T_0$  và  $T_2$ . \* $p \leq 0,001$ : rất có ý nghĩa thống kê. Phép kiểm Wilcoxon

**Nhận xét:** so sánh số lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans* các thời điểm  $T_0$ ,  $T_1$  và  $T_2$  khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p = 0,000$ ; nhưng tỷ lệ vi khuẩn này so với hệ vi khuẩn trong miệng tại thời điểm  $T_0$  và  $T_1$  có khác biệt  $0,04 \pm 0,08$  với  $p = 0,432$  không có ý nghĩa thống kê; tại  $T_0$  và  $T_2$  khác biệt  $0,18 \pm 0,18$  với  $p = 0,000$  rất có ý nghĩa thống kê. So sánh số lượng vi khuẩn *P. gingivalis* tại thời điểm  $T_0 - T_1$  và  $T_0 - T_2$  khác biệt có ý nghĩa thống kê  $p = 0,000$ . Tỷ lệ vi khuẩn *P. gingivalis* so với hệ vi khuẩn trong miệng tại thời điểm  $T_0$  và  $T_1$  có khác biệt  $0,01 \pm 0,01$  với  $p = 0,83$  không có ý nghĩa thống kê; so sánh  $T_0$  và  $T_2$  khác biệt  $0,07 \pm 0,03$  với  $p = 0,000$  rất có ý nghĩa thống kê.

## Chương 4

### BÀN LUẬN

#### 4.1. Đặc điểm về tuổi và giới tính của đối tượng nghiên cứu

70 bệnh nhân trong nhóm nghiên cứu của chúng tôi có độ tuổi  $29 \div 60$ , bao gồm nam giới = 44 người (62,9%) với tuổi trung bình  $45,14 \pm 8,78$ , nữ giới = 26 người (37,1%) có tuổi trung bình  $42,81 \pm 8,51$ , phù hợp với lứa tuổi bị bệnh VQR mạn tính theo phân loại của Hiệp hội Nha chu thế giới (AAP), với nghiên cứu của Marta Gajardo (2005) và các nghiên cứu về bệnh này trong nước của Nguyễn Cẩn (1994), Trần Văn Trường (2000). Như vậy, bệnh VQR là một bệnh lý phổ biến tại Việt Nam, tỷ lệ mắc bệnh trong nghiên cứu này cao hơn so với điều tra của Trần Văn Trường hay Nguyễn Cẩn vì bệnh nhân tham gia nghiên cứu được lựa chọn tại khoa Nha chu của Bv. Răng Hàm Mặt TP.Hồ Chí Minh, do đó số bệnh nhân tập trung điều trị nhiều hơn.

#### 4.2. Biến số nghiên cứu và kỹ thuật xác định các biến số nghiên cứu

Các chỉ số lâm sàng áp dụng trong nghiên cứu này để chẩn đoán xác định, đánh giá mức độ viêm quanh răng như: chỉ số lợi (GI), chỉ số mảng bám (PLI), độ sâu túi (PPD), độ mất bám dính lâm sàng (CAL) và răng lung lay là những chỉ số thông dụng được áp dụng trong các nghiên cứu về bệnh VQR cũng như trong thực hành lâm sàng trên thế giới và ở Việt Nam. Trong các phương pháp phát

hiện vi khuẩn, kỹ thuật realtime PCR có độ nhạy và đặc hiệu cao, nhanh nhất được sử dụng rất nhiều trong các nghiên cứu về vi khuẩn gây bệnh VQR trên thế giới. Nghiên cứu này bước đầu áp dụng realtime PCR định lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* trước và sau điều trị VQR, là nghiên cứu tiền đề về triển khai các ứng dụng của kỹ thuật realtime PCR định lượng vi khuẩn gây bệnh VQR ở nước ta.

**4.3. Phương pháp điều trị:** Trong điều trị bệnh VQR, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh phương pháp điều trị không phẫu thuật kết hợp với kháng sinh toàn thân đạt kết quả tốt cho dù bệnh nhân bị VQR nặng, túi lợi sâu, mất bám dính nhiều hay có bệnh lý toàn thân như: bệnh tim, tiểu đường cũng như bệnh nhân đang mang thai.

**4.4. Đặc điểm lâm sàng và vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* tại ngày khám đầu tiên (T<sub>0</sub>)**

Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, trong ngày khám đầu tiên (T<sub>0</sub>) các triệu chứng lâm sàng và cận lâm sàng cho thấy các bệnh nhân bị viêm quanh răng thể trung bình và nặng.

Tương tự như nghiên cứu của Phùng Tiến Hải (2008), Nguyễn Thị Hồng Minh (2010), Joshi (2007), M.R. Vivekananda (2010).

**Số lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*** định lượng bằng kỹ thuật realtime PCR lần lượt là  $20,29 \pm 3,31$  Ct và  $20,35 \pm 3,94$  Ct với tỷ lệ phát hiện là 100%. Tỷ lệ này cao hơn so với

nghiên cứu của Joshi (2007): *A. actinomycetemcomitans* 35%, *P. gingivalis* 75%; Nezar N Al-hebshi (2014) tại Yemen (67,5% *A. actinomycetemcomitans*; 97,5% *P. gingivalis*).

Tỷ lệ phát hiện 2 vi khuẩn này bằng phương pháp nuôi cấy trong nghiên cứu của Nguyễn Vũ Trung (1996) thấp hơn nghiên cứu này: tỷ lệ phát hiện *A. actinomycetemcomitans* 4% và *C. gingivalis* 9%. Nguyễn Thị Hồng Minh (2010) sử dụng kỹ thuật PCR không phát hiện được 2 vi khuẩn này.

***Liên quan giữa độ sâu túi và răng lung lay, mất bám dính lâm sàng:*** VQR là một bệnh nhiễm khuẩn, phá hủy mô mềm cũng như mô cứng quanh răng gây tiêu xương ổ răng tạo thành túi quanh răng và làm cho răng lung lay. Nghiên cứu dọc của Løe (1998), Xiyan Pei (2014), Socransky (1992), Goodson JM (1982) theo dõi sự tiêu xương ổ răng trên bệnh nhân VQR cho thấy tỷ lệ tiêu xương và mất bám dính là 0,8%/năm, nếu không điều trị thì lượng xương bị tiêu trung bình 0,1-1mm/năm.

***Tương quan giữa độ sâu túi quanh răng và số lượng vi khuẩn A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis:*** trong nghiên cứu này phát hiện *A. actinomycetemcomitans* với tỷ lệ 0,67%, *P. gingivalis* là 0,68 % trên tổng số vi khuẩn trong miệng. Số lượng các vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis* tương quan rất chặt với độ sâu túi quanh răng  $R > -1$ . Chúng tôi xét mối quan hệ này bằng tương quan Spearman's vì độ sâu túi quanh răng và số lượng vi khuẩn không tuân theo phân bố chuẩn. Số lượng vi

khuẩn *A. actinomycetemcomitans* và *P. gingivalis* có rất nhiều ở độ sâu túi 4-8 mm, ít hơn khi độ sâu túi > 8mm. Tương đồng với các nghiên cứu của Haffajee AD (2000), Marta Gajardo, Socransky (1992), Goodson (1982).

#### **4.6. Đặc điểm lâm sàng và vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* sau điều trị 12 tuần ( $T_2$ ) so với ngày khám đầu tiên ( $T_0$ )**

Khi bệnh nhân tái khám sau 12 tuần ( $T_2$ ), chúng tôi thấy các triệu chứng lâm sàng, cận lâm sàng và ý thức của bệnh nhân cũng thay đổi rất nhiều so với ngày khám đầu tiên ( $T_0$ ).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi hay của những nhà nghiên cứu khác trong và ngoài nước như Phùng Tiến Hải, Nguyễn Thị Hồng Minh, Sarah Moideen, Vergani cho thấy phương pháp điều trị không phẫu thuật kết hợp với kháng sinh toàn thân cùng với các phương pháp hỗ trợ cơ học như mài chỉnh khớp cắn, nẹp các răng lung lay, chải răng...có hiệu quả tốt ở bệnh nhân VQR mạn tính dạng toàn thể mặc dù bệnh nhân có túi quanh răng sâu. Phương pháp này cũng đang là xu hướng hiện nay, giảm phẫu thuật, giảm chi phí và thời gian lành thương nhanh.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu 70 bệnh nhân viêm quanh răng mãn tính dạng toàn thể trước và sau điều trị 12 tuần bằng phương pháp không phẫu thuật, chúng tôi đưa ra một số kết luận sau:

1. Đặc điểm, mối tương quan giữa lâm sàng, X-quang, số lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans* và *P. gingivalis* trong dịch lợi trên bệnh nhân viêm quanh răng mãn tính dạng toàn thể:

- Bệnh viêm quanh răng (VQR) mãn tính cũng là một bệnh phổ biến tại Việt Nam cũng như trên thế giới hay gặp ở tuổi trên 30 nhưng cũng có trường hợp trẻ tuổi hơn. Nguyên nhân gây bệnh chính là hai vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans* và *P. gingivalis*, có số lượng nhiều trong VQR thể trung bình và nặng phù hợp các nghiên cứu khác về định lượng hai vi khuẩn này bằng kỹ thuật realtime PCR.

- Các chỉ số lâm sàng: viêm lợi, độ sâu túi quanh răng, mất bám dính lâm sàng có tương quan thuận và chặt với số lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans* và *P. gingivalis*.

- Tương quan giữa tuổi và các dạng tiêu xương thuận và chặt.

2. Hiệu quả phương pháp điều trị không phẫu thuật kết hợp với kháng sinh toàn thân đối với VQR mãn tính: có hiệu quả tốt, phù hợp với khuyến hướng điều trị ngày nay, giảm phẫu thuật, giúp lành thương nhanh, tránh sang chấn về tâm lý cho bệnh nhân.

## KHUYẾN NGHỊ

Trong những thập niên qua, sinh học phân tử đã góp phần trong việc khảo sát dịch tễ, chẩn đoán và điều trị bệnh quanh răng. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về sinh học phân tử và ứng dụng trong ngành Răng Hàm Mặt chỉ mới bắt đầu. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng tôi sử dụng kỹ thuật realtime PCR để theo dõi sự thay đổi về số lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* trước và sau điều trị bệnh VQR mạn tính dạng toàn thể. Dựa vào các kết quả của nghiên cứu, chúng tôi xin có một số khuyến nghị sau:

- Đưa kỹ thuật realtime PCR vào xét nghiệm thường qui để định lượng vi khuẩn *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* hay các vi khuẩn khác trong bệnh VQR, hoặc những bệnh nhiễm trùng khác ở vùng hàm mặt để cung cấp những thông tin, định hướng điều trị như chọn kháng sinh điều trị, đánh giá kết quả điều trị, theo dõi diễn tiến bệnh.

- Điều trị bệnh VQR mạn tính dạng toàn thể theo phương pháp không phẫu thuật kết hợp với kháng sinh toàn thân mang lại kết quả tốt, tuy nhiên để kết quả bền vững cần sự hợp tác giữa bệnh nhân và bác sĩ, nhất là việc áp dụng đúng phương pháp vệ sinh răng miệng.



## ABSTRACT

### 1 / Urgency of the theme

Currently, in the world and Vietnam, periodontitis is a common disease, consequences of tooth loss series, lost chewing function affects the overall health and beauty. In recent years, the Dentistry has developed lot, there are many methods to treat periodontitis, or replace the teeth were lost but very costly for patients. Periodontitis cause by many bacteria, but *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* are strong markers of periodontitis and maybe relate to some other systemic diseases such as cardiovascular, diabetes, or cause preterm birth complications in obstetrics.

So far in our country, no study has applications of realtime PCR technic to quantify *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* pathogenic periodontitis, simultaneously combined with clinical monitoring change the number and ratio of two bacteria before and after non-surgical treatment of chronic periodontitis.

The quantitative *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis provides important information for clinicians to specify appropriate antibiotics to patients to help reduce the time and cost of treatment, avoid drug resistance current antibiotics. Thus, we implemented the project "**Quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*,**

***Porphyromonas gingivalis* in periodontal inflammation by realtime PCR and evaluate the effectiveness of treatment non-surgical periodontal inflammation"** with two objectives:

1. Comments traits and correlations between clinical, X-rays, bacterial counts *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in translation beneficial in patients with generalized chronic periodontitis.

2. Evaluate the effectiveness of non-surgical treatment for general chronic periodontitis based on clinical parameter, X-rays and the amount, rate of *A. Actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*.

## **2 / Meaning practices and new contributions of the thesis**

The study has technical realtime PCR applications that used gene sequencing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and quantify two bacteria before and after treatment and monitor treatment efficacy of non-surgical method in combination with antibiotics. Research of new thesis and not overlap with the thesis defended at home and abroad.

The results of the thesis initially closely monitoring bacterial ratio change before, during and after treatment corresponds to the clinical symptoms in Vietnam and assess the effectiveness of non-surgical treatment method and avoid complications after surgery, healing time and reduce treatment costs and avoid psychological trauma for the patient.

Significant topics with specialized science Dentistry, Molecular Biology, but also has many applications in test bacteria in the oral and maxillofacial infection is caused by dental and other.

**The layout of the thesis are:**

The thesis consists of 108 pages excluding references pages and appendices. Apart from the question 3 pages, 2 pages conclusions and recommendations 1, dissertation into 4 chapters: Chapter 1- Introduction, 24 pages; Chapter 2 - Material and Methods, 20 pages; Chapter 3 – Results, 35 pages; Chapter 4 – Discussion, 23 pages.

**Chapter 1****INTRODUCTION****1.1. Definition, classification, pathogenesis of bacteria and inflammation around the teeth****1.1.1 Definition**

Chronic periodontitis is defined as an inflammatory of the supporting tissues of the teeth cause by group of specific microorganism, resulting in progressive destruction periodontal ligament and alveolar bone with pocket formation, recession or both.

**1.1.2. Classification of the periodontal diseases**

According to the classification of the American Academy of Periodontology in 1999, there are two kinds: gum disease (caused by plaque, non-plaque); periodontal disease related to supporting-structure of the teeth as possible chronic periodontitis, aggressive periodontitis, ...

## 1.2. Bacterial etiology

So far, the researchers have demonstrated that periodontitis specific bacterial but each different bacteria can cause various periodontitis. Periodontal pathogenesis involves interactions between bacterial factors and immune response of the body, and more influenced by genetic factors and environmental risk factors. Bacteria plays an important role in periodontal diseases, two pathogenic bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* are common in chronic periodontitis. These are the Gram-negative, anaerobic, many genes as fimbriae toxicity (fimA), collagenase (prtC), hemagglutinins, haemolysin, LPS, proteases, antigens and leukotoxin (lktA).

## 1.3. The periodontal treatments

The successful periodontal treatment depends on early diagnosis, control pathogenic bacteria. Treatment should long time and must be re-examined, monitored regularly. There are two main methods: non-surgical and surgical treatment in combination with topical antibiotics or systemic.

Non-surgical treatment: is a complex methods includes scaling, root planing, removing the favorable factors. Indications: depth of pockets <5mm, 3-4 mm clinical attachment level (medium), degree of tooth mobility I or II, ...

#### 1.4. Detection methods

There are many methods used to detect *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* in chronic periodontitis: culture, immunology, molecular biology (PCR: polymerase chain reaction, real-time PCR). Real-time PCR technique is laboratory technique molecular biology base on polymerase chain reaction that DNA amplification products which show the same destination at each cycle of the reaction, so-called real-time PCR. Realtime PCR target quantitative DNA so called quantitative PCR (qPCR). Verner and et al (2006) asserts qPCR sensitivity than culture techniques. The rate of bacteria detected by realtime PCR higher culture techniques, the gap in quantitative realtime PCR DNA between engineering culture techniques with respectively 51.4% *P. gingivalis*, 36.1 % *T. forsythensis*, 12.5% *F. nucleatum*, 8.3% *P. intermedia*, 3% *A. actinomycetemcomitans*. Real-time PCR has been increasingly applied in diagnosing many bacterial periodontitis with high sensitivity, ease of implementation, rapid results make treatment effective on target.

## Chapter 2

### MATERIAL AND METHODS

**2.1. Clinical samples:** 70 patients to examination, diagnosis and treatment of chronic periodontal in the Odontal - Maxillo - Facial Hospital Ho Chi Minh City from 01/10/2011 to 10/30/2014.

**2.1.1. Inclusion criteria:** age  $\geq 30$ . Definitive diagnosis of chronic periodontitis with periodontal pocket  $\geq 3$  mm, is during action indicated by gingivitis, bleeding on examination by Miller's probing. And at least 20 teeth. No history of cardiovascular disease, diabetes, endocrine diseases, metabolic diseases. Do not use antibiotics, anti-inflammatory, oral contraceptives before study participants one month. Untreated periodontal disease before study participants 3 months. No smoking habits. Agreeing to participate in research. Specimens for testing realtime PCR, identify and quantify two *A.actinomycetemcomitans* and *P.gingivalis* bacteria in patient samples.

**2.1.1. Exclusion criteria:** are abscess or abscess third molar. Patients with systemic diseases, pregnant or breastfeeding. The patient does not agree to participate in research or specimens. Realtime PCR test result only *A.actinomycetemcomitans* or *P.gingivalis*.

## 2.2. Methods

**2.2.1. Study design:** Clinical Experimental, assess the results before - after treatment.

**2.2.2. Sample size:** the sample size calculation formula  $N = Z^2_{1-\alpha/2} P(1-P) / d^2$  with accuracy  $d = 10\%$ , 95% confidence level,  $P$  is achieved periodontal treatment standard result 80%,  $\alpha = 0.05$ ,  $Z^2_{1-\alpha/2} = 1,962$ , minimum sample size of 62 patients. To increase accuracy and reduce errors caused by technical, formal sample of 70 patients.

### 2.2.3. Steps

#### ❖ **The first day (Time $T_0$ ):**

- (1) Examination and clinical parameters: + plaque index (PLI) and gingival index (GI) (Silness and Löe, 1964). + Periodontal pocket depth (PPD) and clinical attachment loss (CAL) in millimeters. + Tooth mobility from I to III class (Miller, 1985). + To assess the extent and form of alveolar bone loss: panoramic digital radiography (Panorex).
- (2) Take the 1<sup>st</sup> realtime PCR test: *A.actinomycetemcomitans* and *P.gingivalis* in gingival crevical fluid samples.
- (3) Instruction on oral hygiene to patients: Bass' brushing technique improvement, use soft brush and Colgate Total toothpaste. Give leaflets remind patients how to brush their teeth (Appendix).

❖ **Re-examination after 1 week:** when realtime PCR results. Non-surgical treatment applied to the patient. Then, patient follow-up at 2<sup>nd</sup> week to re-examination.

❖ **After 2<sup>nd</sup> weeks (Time  $T_1$ ):** The patient follow-up and evaluation of clinical indicators, maintaining the mechanical method of support.

Taking samples for 2<sup>nd</sup> testing to quantify *A.actinomycetemcomitans* and *P.gingivalis* by realtime PCR. Patient re-examination follow-up 4<sup>th</sup> week, 8<sup>th</sup> week, 12<sup>th</sup> week (patient's landmark appointment time T<sub>0</sub>).

- ❖ **At 12<sup>th</sup> weeks (Time T<sub>2</sub>):** The patient re-examination and measurement of clinical indices, panoramic digital. Take samples for 3<sup>rd</sup> test's realtime PCR to quantify *A.actinomycetemcomitans* and *P.gingivalis*.

#### **2.2.4. Samples**

- The material (cotton rolls, paper point No.30) and instruments are disinfected
- Get the beneficial clinical services in periodontal pocket bleeding on examination and deepest in the pocket when the probe on the first day of the study.
- How to take gingival crevical fluid (GCF) sample on the patient's tooth: after cleaning up plaque on tooth surface and gently air-dry, putting 5 paper point No. 30 and 21 mm long's into the bottom of pocket (avoiding bleeding), so in 10 seconds, taking these in effendorf. Samples stored in a freezer (temperature -800C - special cabinet SANYO) at the Centre of Gen-Protein in Hanoi Medical University (sending samples to Hanoi by air only for the ice box, a week to send samples/time).



### 2.2.5. Identify and quantify *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* by realtime PCR

- ❖ DNA isolation from GCF samples by the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen-USA) according to manufacturer's instructions.
- ❖ This study quantified the relative ratio of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in total microflora. Calculation of bacteria *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* method compares the threshold cycle (Ct):

$$Aa \text{ ratio (or Pg)} = Ct \text{ of 16S rDNA bacteria} / Ct \text{ of Aa (or Pg)}$$

- ❖ According to the formula, the cycle threshold (Ct) detection of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* was lower means the ratio of *P. gingivalis* were high or there were a large number of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* negative when realtime PCR curve below baseline; positive when the curvature exceeds a higher realtime PCR baseline.

### 2.2.6. Non-surgical treatment applied to the study's object

Non-surgical treatment: scaling and root planing, wash periodontal pockets with 0.12% chlorhexidine solution. Sharpening occlusal adjustment, extracted loose teeth, tooth extraction, prosthesis depending on clinical circumstances. Antibiotics Metronidazole 1.5 g/day in 3 divided doses, combined with Doxycycline 100mg/day in 3

divided doses for 7 days. Gargle with 0.12% chlorhexidine solution in the form of brand-gingival Kin Mouthwash. Brush with Colgate Total, 3 times, after eating Bass improved method (Appendix).

### **2.2.7. Ethical issues in research**

1) The study subjects provided sufficient information about participation in research and voluntary participation in the study. 2) The study subjects were completely free of cost treatment and testing. All personal data collected during the study is encrypted and kept confidential, does not serve any purpose other than the commitment to research projects are conducted.

**2.3. Data analysis:** using Microsoft Excel 2010, SPSS software. Applied T test and Wilcoxon test to compare baseline in the period before and after treatment. Using correlation Spearman's because of variables such as the depth of pockets, attachment clinical, teeth mobility,... not according to the normal distribution.

## Chapter 3

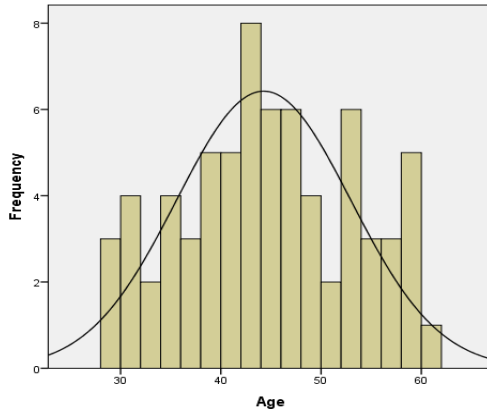
### RESULTS

#### 3.1. Age and gender characteristics of the study subjects

**Table 3.1. Age and gender characteristics of the study subjects**

Sex	Quantity		Age
	n	%	
<i>Male</i>	44	62,9%	45,14 ± 8,78
<i>Female</i>	26	37,1%	42,81 ± 8,51
<i>Total</i>	70	100%	44,27 ± 8,69

*Comment:* A total of 70 patients participated in the study with an mean age:  $44.27 \pm 8.69$ , range 60 to 29; male = 44 patients, 62.9% occupancy rate, mean age  $45.14 \pm 8.78$ ; female patients = 26, 37.1% occupancy rate, mean age:  $42.81 \pm 8.51$ .



**Chart 3.1. Distribution of the age of the study subjects**

*Comment:* Figure 3.1 shows age's patients in this study have formed normal distribution bell curve, the patients at the age of 44 at most (n = 6).

### 3.2. The clinical features and bacteria's quantity of patients at the first day (time T<sub>0</sub>)

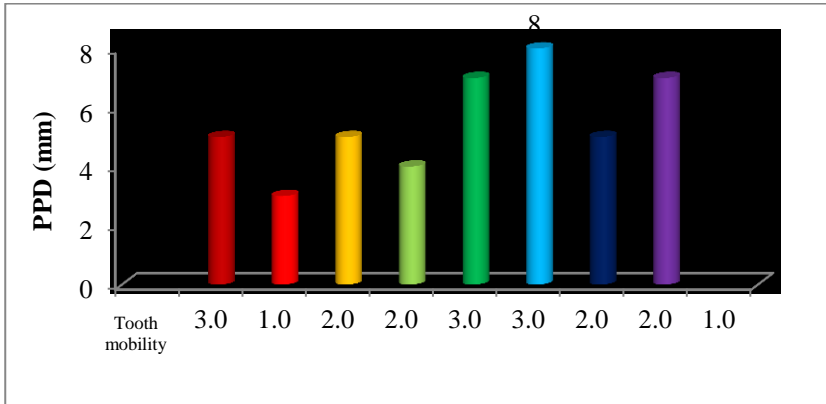
#### 3.2.1. Clinical characteristics of patients at the first day (time T<sub>0</sub>)

**Table 3.2. Clinical characteristics of patients at the first day (time T<sub>0</sub>)**

Clinical characteristics	Patients n=70 ( $\bar{X} \pm SD$ )
PLI	2,67 ± 0,56
GI	2,37 ± 0,93
PPD (mm)	5,78 ± 1,35
CAL (mm)	5,73 ± 3,15
Teeth mobility	1,96 ± 0,95
Form of alveolar bone loss ( Panorex digital)	
+ Horizontal alveolar bone loss (%)	78,6%
+ Vertical bone defects (%)	12,9%
+ Both (%)	8,6%

*Comment:* During the first examination date, generally all patients with severe chronic periodontitis: the dental plaque and gingival index are very high from 2 to 3 score; teeth were looser, mm 5 < depth of pockets (average) < 7 mm, clinical attachment level > 5 mm.

**3.2.1.5. The correlation between pocket depth, clinical attachment loss and teeth mobility in patients at the first day**



**Chart 3.5. Pocket depth, loss of adhesion and loose teeth in patients**

(note: the vertical axis is the depth of pockets, the horizontal axis is loose teeth, each patient is different 1cot color, number inscribed on the columns was lost adhesion).

*Comment:* deep pockets and loose teeth were tightly Spearman's correlation with  $R = 0.28$ , smaller +1 ( $p < 0.05$ ). Pocket depth was 3mm and teeth mobility at 1 score, probing depth's pocket was 3mm as the teeth mobility from 2 to 3 score. Clinical attachment level and teeth mobility were tightly correlated with  $R = 0.63$ , smaller +1 (Spearman's correlation,  $p < 0.05$ ). There is high correlation between periodontal pocket depth with the teeth mobility and clinical attachment level. Deeper pockets then clinical

attachement level and loose teeth as much as ( $R < +1$ ,  $p < 0.05$ , Spearman's correlation).

### 3.2.2. Characteristic bacteria of patients at the first day (time $T_0$ )

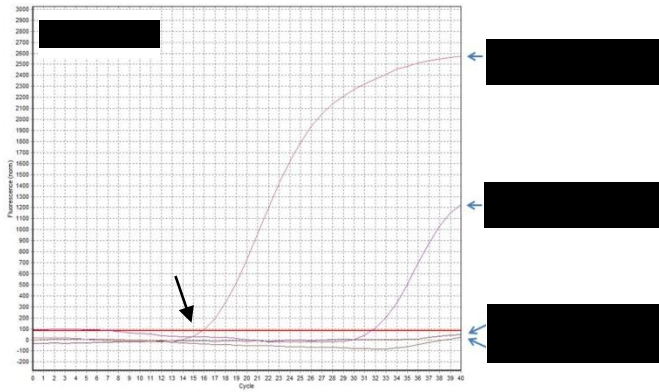
**Table 3.4. Characteristic bacteria of patients at the first day**

<i>A.actinomycetemcomitans</i> and <i>P.gingivalis</i>	<b>Patients</b> <b>n=70</b> ( $\bar{X} \pm SD$ )
<i>Quantity of Aa (Ct)</i>	20,29 $\pm$ 3,31
<i>Aa's ratio</i>	0,67 $\pm$ 0,13
<i>Quantity of Pg (Ct)</i>	20,35 $\pm$ 3,94
<i>Pg's ratio</i>	0,68 $\pm$ 0,18

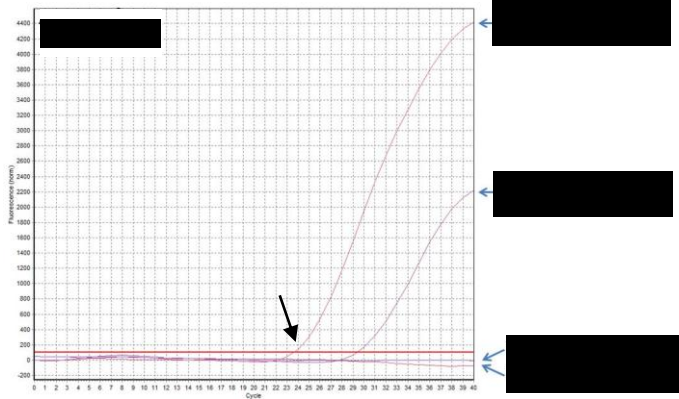
**Note:** GCF(Gingival crevicular fluid), Aa (*A.*

*actinomycetemcomitans*), Pg (*P. gingivalis*), Ct (*Cycle threshold*)

*Comment:* The quantity of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* were detected in the lower cycle threshold (Ct) means bacteria exist with a large of numbers in patients' gingival crevicular fluid. The ratio of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* that compared with total bacteria in the mouth were high: 0.67% and 0.68%.



**Figure 3.5. Real time PCR results patient number 01**  
 (Quantity of *Aa* at time  $T_0 = 16$  Ct)



**Figure 3.6. Real time PCR results patient number 01**  
 (Quantity of *Pg* at time  $T_0 = 22,35$  Ct)

**3.2.2.1. Correlation periodontal pocket depth with the number of bacteria of patients at the first day**

**Table 3.5. Correlation periodontal pocket depth with the number of bacteria of patients at the first day**

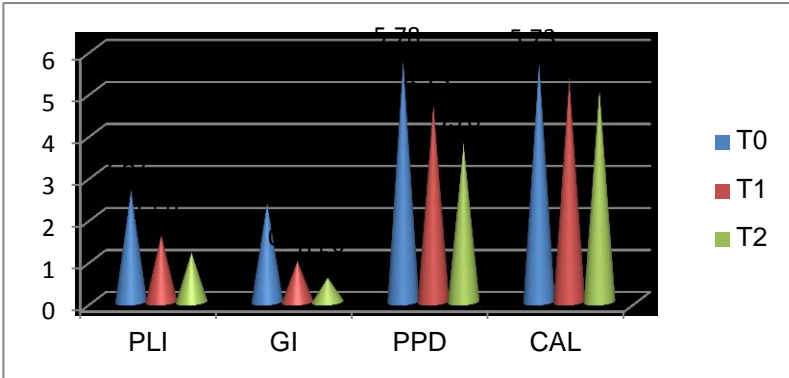
		<i>Aa</i>	<i>Pg</i>
<b>Periodontal pocket depth (PPD)</b>	<b>R*</b> Spearman's correlation	- 0,07	- 0,18
	<b>p</b>	0,56	0,10
	<b>n</b>	70	70

*Comment:* The relationship between periodontal pocket depth and the amount of *A. actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* is inversely correlated with  $R > -1$  (Table 3.5), mean probing depth deeper the more bacteria.



### 3.6. Comparison of clinical characteristics and bacteria at the time $T_0$ , $T_1$ and $T_2$

#### 3.6.1. Comparison of clinical characteristics at the time $T_0$ , $T_1$ and $T_2$



**Chart 3.10. Comparison of clinical characteristics at the time  $T_0$ ,  $T_1$  and  $T_2$  (note:  $p_1$ : compare  $T_0$  to  $T_1$ ,  $p_2$ : compare  $T_0$  to  $T_2$ . \*  $p \leq 0.001$ : highly statistically significant. Wilcoxon's test )**

*Comment:* after 3 months of periodontal treatment by non-surgical methods combined with systemic antibiotics, parameter including plaque index (PLI), gingival index (GI), periodontal pocket depth (PPD), clinical attachment loss (CAL) measurement were reduction statistically significant: + PLI: from low to medium score. + GI: from the heavy to moderate score. Periodontal pocket depth reduced from 5.78 mm to 3.78 mm ( $T_2$  compared to  $T_0$  reduction 2/3).

### 3.6.2. Comparing the number of bacteria at the time of $T_0$ , $T_1$ and $T_2$

**Table 3.10. Comparing the number of bacteria at the time of  $T_0$ ,  $T_1$  and  $T_2$**

Bacteria	$\bar{X} \pm SD$			$p_1$	$p_2$
	$T_0$	$T_1$	$T_2$		
<i>Quantity of Aa (Ct)</i>	20,29 ± 3,31	26,65 ± 4,04	26,45 ± 3,26	0,000*	0,000*
<i>Aa's ratio</i>	0,67 ± 0,13	0,62 ± 0,21	0,49 ± 0,31	0,432	0,000*
<i>Quantity of Pg (Ct)</i>	20,35 ± 3,94	25,78 ± 4,08	24,80 ± 4,67	0,000*	0,000*
<i>Pg's ratio</i>	0,68 ± 0,18	0,67 ± 0,19	0,61 ± 0,15	0,83	0,000*

(note:  $p_1$ : compare  $T_0$  with  $T_1$ ,  $p_2$ : compare  $T_0$  with  $T_2$ . \*  $p \leq 0.001$ : highly statistically significant. Wilcoxon's test )

*Comment:* compare the amount of *A. actinomycetemcomitans* at times  $T_0$ ,  $T_1$  and  $T_2$  was statistically significant,  $p = 0.000$ ; but the rate of this bacteria than the microflora in the mouth at the time  $T_0$  and  $T_1$  were  $0.04 \pm 0.08$ ,  $p = 0.432$  (not statistically significant); at the time  $T_0$  and  $T_2$  this ratio were  $0.18 \pm 0.18$ ,  $p = 0.000$  (statistically significant). Compare the quantity of *P. gingivalis* were counted at

time  $T_0$  and  $T_1$ ,  $T_0$  and  $T_2$  was statistically significant,  $p = 0.000$ . *P. gingivalis*' ratio compared to total bacteria in the mouth at the time  $T_0$  and  $T_1$  were  $0.01 \pm 0.01$ ,  $p = 0.83$  (not statistically significant); compare to  $T_0$  and  $T_2$ :  $0.07 \pm 0.03$ ,  $p = 0.000$  (statistical significance).

## **CHAPTER 4**

### **DISCUSSION**

#### **4.1. Age and gender characteristics of the study subjects**

70 patients in our study group aged  $29 \div 60$ , including men = 44 persons (62.9%) with an average age of  $45.14 \pm 8.78$ , women = 26 (37, 1%) with an average age of  $42.81 \pm 8.51$ , consistent with chronic periodontal ages by the American Association of Periodontal (AAP), the study of Marta Gajardo (2005) and the research on the disease in the country Can Nguyen (1994), Truong Tran Van (2000). Thus, chronic periodontitis was a common disease in Vietnam, the chronic periodontitis' prevalence in this study was higher than the investigation of Tran Van Truong, Nguyen Can as patient or research participants were selected at the Department of periodontal in Odonto – Maxillo – Facial Hospital HCM city, so some patients more concentrated treatment.

## 4.2. The variables studied

Parameters including clinical to chronic periodontitis' diagnose: gingival index (GI), plaque index (PLI), probing depth (PPD), clinical attachment level (CAL) and teeth mobility are the common use to assess and monitor the periodontal status in this study as in clinical practice around the world and in Vietnam. In the method of detecting bacteria, realtime PCR techniques have high sensitivity and specificity, the fastest being used a lot in the study of periodontitis' bacteria in world. This study initially apply quantitative realtime PCR to determine the *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* before and after chronic periodontal treatment in country.

**4.3. Treatment methods:** the many researchers in the world have proven of non-surgical method combined with systemic antibiotic achieved good results even these patients with severe chronic periodontitis. Furthermore, chronic periodontitis may be associated modifying factor such as systemic disease, heart disease, diabetes and pregnant.

## 4.4. The clinical features and bacteria's quantity of patients at the first day (time $T_0$ )

According to the our study's results, in the first day examination ( $T_0$ ) the patients had severe and moderate chronic

periodontitis. Similar research by Hai Phung Tien (2008), Minh Nguyen Thi Hong (2010), Joshi (2007), MR Vivekananda (2010).

The number of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* by realtime PCR technic:  $20.29 \pm 3.31$  Ct and  $20.35 \pm 3.94$  Ct with a detection rate of 100%. This rate is higher than the study of Joshi (2007): 35% *A. actinomycetemcomitans*, 75% *P. gingivalis*; Nezar Al-hebshi N (2014) in Yemen: 67.5% *A. actinomycetemcomitans*, 97.5% *P. gingivalis*.

Detection rates 2 bacteria by culturing methods of Trung Nguyen Vu's study (1996) was lower than this study: 4% *A. actinomycetemcomitans* and 9% *C. gingivalis* (*P. gingivalis*). Minh Nguyen Thi Hong (2010) used PCR undetectable 2 bacteria.

- ❖ ***Association between probing depth and loosening of teeth, loss of clinical attachment:*** chronic periodontitis is an infectious disease, leading to bone loss and connective tissue destruction form pockets, make loose teeth. In prospective study of Loe (1998), Xiyan Pei (2014), Socransky (1992), Goodson JM (1982): the ratio of alveolar bone resorption was 0.8 %/year, if not treated, the average amount resorption 0,1-1mm bone/year.
- ❖ ***The correlation between periodontal pocket depth and the amount of A. Actinomycetemcomitans and P. gingivalis:*** in this study to detect *A. actinomycetemcomitans* at the rate of 0.67%, 0.68% *P. gingivalis* comparable with the total number of bacteria in the mouth. The number of *A. actinomycetemcomitans*, *P.*

*gingivalis* correlate very closely with periodontal pocket depth ( $R > -1$ ). We consider this relationship by Spearman's correlation for periodontal pocket depth and the amount of bacteria did not follow the normal distribution. The number of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* bacteria has a lot in pocket depth from 4 to 8 mm, less than in the pocket depth over 8mm. Similarities with the study of Haffajee AD (2000), Marta Gajardo, Socransky (1992), Goodson (1982).

#### **4.6. The clinical features and *A. actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* bacteria after 12 weeks of treatment ( $T_2$ ) compared with the first examination day ( $T_0$ )**

When re-examined patients after 12 weeks ( $T_2$ ), we see the clinical, preclinical and awareness of patients also changed a lot compared to the first examination day ( $T_0$ ).

Results of us study or of other studies as Hai Phung Tien, Minh Nguyen Thi Hong, Sarah Moideen, Vergani showed non-surgical treatment combined with systemic antibiotics methods are effective for the chronic periodontal patients although patients with deep periodontal pockets. This method is also the current trend, reduction surgery, lower costs and faster healing time.

## CONCLUSIONS

The study of 70 patients with chronic periodontal, after non-surgical treatment 12 weeks, we make some conclusions:

1. Characteristics of the correlation between clinical, X-ray, the number of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* in gingival crevicular fluid of chronic periodontitis:

- The prevalence of chronic periodontitis was a very common disease in Vietnam and the world, it can appear at the age of 30 but also younger. These *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* were the main cause of periodontal disease, there are many numbers in moderate and severe periodontitis, similar to other studies of quantitative two bacteria by realtime PCR.

- The gingivitis index, periodontal pocket depth, clinical attachment level were positively correlated with the number of *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* bacteria.

2. Non-surgical methods consistent with current treatment trends, reducing surgical help faster healing, prevent psychological trauma to the patient.

## RECOMMENDATIONS

Over the past decade, molecular biology has contributed in epidemiological surveys, diagnosis and treatment of periodontal disease. In Vietnam, the study of molecular biology and industrial applications Dentistry just beginning. In this study, first we use realtime PCR technique to monitor changes in the number of bacteria *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* before and after treatment of chronic VQR plenary format. Based on the results of the study, we would have some recommendations:

- Application realtime PCR techniques in common tests to quantify *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* bacteria and other bacteria in periodontal patients, or other infectious diseases in maxillo facial region to provide information, the treatments such as antibiotic treatment chosen, assess treatment outcomes, monitoring disease progression.

- Treatment of general chronic periodontitis by non-surgical method combination with systemic antibiotics have good results, but for sustainable results require cooperation between patient and doctor, especially the apply proper oral hygiene methods.