

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA ORALNIH INFEKCIJA

MAGDALENA GRCE

Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu, Zagreb, Hrvatska

Usnu šupljinu nastanjuju mnogi virusi, gljive i bakterije. Dok se većina tih mikroorganizama može lako uzgojiti i identificirati klasičnim mikrobiološkim testovima, neki od njih se mogu identificirati samo metodama molekularne biologije, kao npr. humani papiloma virus. Neki mikroorganizmi su prisutni u premaloj količini pa se ne mogu utvrditi klasičnim metodama tako da i u tom slučaju molekularna dijagnostika postaje logična alternativa. Testovi molekularne biologije osjetljivi su, objektivni, lako izvodljivi i manje su zahtjevni od klasičnih mikrobioloških metoda, u smislu edukacije i osiguranja kvalitete. U ovom radu su opisane molekularne metode koje se najčešće koriste za dokazivanje mikroorganizama koji koloniziraju usnu šupljinu.

Ključne riječi: virusi, gljive, bakterije, usta, dijagnostika

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Magdalena Grce, znanstvena savjetnica
 Institut Ruđer Bošković
 Zavod za molekularnu medicinu
 Laboratorij za molekularnu virologiju i bakteriologiju
 Bijenička 54
 10002 Zagreb, Hrvatska
 Tel: +385 1 4561110, 098 260 331; faks: +385 1 4561010
 E-pošta: grce@irb.hr

UVOD

Sluznica usne šupljine dobar je medij za rast brojnih mikroorganizama. Većina njih su sastavni dio normalne flore, a u nekim slučajevima mogu biti i patogeni. Najčešće patogene promjene u usnoj šupljini koje se povezuju s virusnim, gljivičnim i bakterijskim infekcijama navedene su u tablici 1. Humani papiloma virusi (HPV) uzrokuju obične bradavice (*verruca vulgaris*), papilome (dobročudna proliferacija stanica pločastog epitela) i Heckovu bolest (fokalna epitelijalna hiperplazija), a povezani su s leukoplakijom (promjene mukoznih membrana sa zloćudnim potencijalom) (1). Teški oblik infekcije HPV-om su karcinom stanica pločastog epitela usne šupljine i orofaringealni karcinom, uzrokovani u oba slučaja tzv. visokorizičnim (karcinogenim) HPV tip 16, te rekurentna respiratorna papilomatoza, teška komplikacija infekcijom niskorizičnim HPV tipovima 6 ili 11 (2). Virus *herpes simplex* (HSV) tipa 1 i 2 uzrokuje tipične erozije epitelnog tkiva u usnoj šupljini (*gingivostomatitis herpetica*) i na samoj usnici (*herpes labialis*) (3). Drugi pripadnici obitelji herpes virusa, citomegalovirus (CMV) i Epstein-Barrov virus (EBV) povezani su s upalom žlijezda slinovnica (*sialoadenitis*) (4). CMV je također povezan sa

oralnom ulceracijom, dok EBV s infekcijskom mononukleozom (5,6).

U zdravih osoba, kandidate, poglavito *Candida albicans*, smatraju se normalnim kvascima u usnoj šupljini. Međutim, *C. albicans* može djelovati kao oportunistički patogen, naime, povezana je s upalom sluznice usta (*stomatitis*) (7).

Najčešće bakterije koje koloniziraju usnu šupljinu su streptokokne vrste, iako su česte i druge vrste kao *Veillonella*, *Geamella*, *Rothia*, *Fusobacterium* i *Neisseria* (8). Dugo se sumnjalo da brojne bakterije uzrokuju zubni karijes i parodontitis (bolesti desni). Međutim, istraživanja genoma bakterija su pokazala da se skupina bakterija koje uzrokuju karijes znatno razlikuje od mikroorganizama prisutnih u zdravoj usnoj šupljini (9). U slučaju parodontitisa, anaerobna bakterija *Porphyromonas gingivalis* smatra se etiološkim čimbenikom parodontnog gubitka koštane mase (10). *Helicobacter pylori*, uzročnik mnogih gastrointestinalnih poremećaja (11), u oralnoj medicini se također može povezati sa sindromom pečenja usta (stomatopiroza) (12) kao i infekcija kandidom (13).

Mnogi virusi se teško ili nikako ne mogu izolirati u kulturi stanica *in vitro* te je jedini način njihovog dokazivanja analiza njihovog genoma (DNA, deoksiribonukleinska kiselina) ili transkriptata (mRNA, *messenger*/glasnička ribonukleinska kiselina), odnosno komplementarne DNA (cDNA, *complementary* DNA). Tako npr. dokazivanje prisutnosti HPV-a jedino je moguća molekularnim metodama, dok se HSV vrlo lako može izolirati u *in vitro* kulturi stanica i potom tipizirati imunokolorimetrijskim metodama. Unatoč tome, sve više mikrobioloških laboratorija koriste molekularne metode za dokazivanje HSV-a, EBV-a, CMV-a i ostalih virusa, i to zbog brzine, osjetljivosti i specifičnosti testova. Molekularne metode su se također pokazale vrlo korisnima u dokazivanju gljiva i bakterija. Stoga je cilj ovog rada dati sažeti pregled molekularnih metoda koje se koriste za dokazivanje mikroorganizama koji koloniziraju usnu šupljinu, ali i druga sijela.

Tablica 1.

Promjene usne šupljine i mogući uzročnici

Klinička dijagnoza	Suspektni patogeni
<i>Verruca vulgaris</i> Papilom Heckova bolest Leukoplakija	HPV
<i>Gingivostomatitis herpetica</i> <i>Herpes labialis</i>	HSV
<i>Sialoadenitis</i> Infekciозна mononukleozа	EBV
<i>Sialoadenitis</i> Oralna ulceracija	CMV
Stomatitis	kandida
Stomatopiroza	<i>Helicobacter pylori</i>
Parodontitis	<i>Porphyromonas gingivalis</i>

HPV: humani papiloma virus; HSV: *herpes simplex* virus;
EBV: Epstein-Barrov virus; CMV: citomegalovirus

OSNOVE METODA MOLEKULARNE DIJAGNOSTIKE

Uzorkovanje

Za detekciju gljiva, bakterija i većinu virusa koji se prvo uzgajaju u *in vitro* uvjetima, dovoljno je uzeti obrisak na predilekcijskom mjestu usne šupljine, a potom iz dobivene kulture izolirati nukleinsku kiselinu, DNA ili RNA. Međutim, za viruse koji se teško uzgajaju i ne nalaze se u vanstaničnom prostoru, kao što je to slučaj kod HPV-a, potrebno je uzeti obrisak, strugotinu ili mikrobiopsiju koji sadrži dovoljan broj epitelnih stanica sluznice usne šupljine za istodobnu izolaciju stanične i virusne nukleinske kiseline. Dvolančana molekula DNA je vrlo stabilna i ne zahtijeva specijalne

uvjete pohranjivanja biološkog uzorka, međutim bolje se izolira ako je sačuvana u vodenoj otopini (fiziološka, Tris-EDTA-pufer) nego dehidrirana. Za razliku od DNA, jednolančane molekule RNA su podložne brzom enzimatskoj (ribonukleaze) razgradnji i stoga se odmah nakon uzimanja biološki materijal mora pohraniti u odgovarajući pufer kako bi se sačuvao integritet RNA (14).

Izolacija nukleinskih kiselina

Inaktivirani biološki materijal na visokoj temperaturi (95° C) može poslužiti kao kalup za analizu DNA. Međutim, takav materijal sadrži bjelančevine i tvari (inhibitori) koje mogu smanjiti ili potpuno spriječiti enzimске reakcije koje se široko primjenjuju u molekularnoj biologiji, kao npr. umnažanje DNA pomoću DNA-polimeraze. Stoga je korisno pročistiti DNA jednom od mogućih metoda izolacije DNA, od kojih su mnoge i komercijalno dostupne. Čistoj DNA se može odrediti koncentracija spektrofotometrijom te koristiti u poznatoj količini (14).

Hibridizacija

Pojam hibridizacija (*hybridisation*) znači sparivanje homolognog slijeda nukleinske kiseline, DNA ili RNA sa DNA ili RNA. Da bi nastale hibridne molekule potrebno je razdvojiti (denaturirati) dvolančanu molekulu DNA (kalup) u dvije jednolančane molekule u visoko alkalnoj otopini ili na visokoj temperaturi (95° C), a potom smanjiti pH otopine ili temperaturu kako bi se probe mogle vezati za komplementarnu sekvencu. S obzirom da se adenzin (A) veže s timinom (T) ili uracilom (U; u RNA) s dvije vodikove veze, a guanin (G) sa citozinom (C) s tri vodikove veze, uvjeti hibridizacije ovise o udjelu [G + C]; što je on veći to uvjeti razdvajanja i sparivanja moraju biti strožiji (14).

Prvobitna metoda hibridizacije (tablica 1) koja se najčešće koristila u molekularnoj biologiji je tzv. *Southern blot* hibridizacija koja je dobila ime po svom izumitelju, britanskom biologu Edwinu Southeru (15). Metoda se zasniva na specifičnom fragmentiranju DNA restrikcijским enzimom (*restriction endonuclease*), razdvajanju fragmenata DNA elektroforezom, prijenosu na solidnu membranu, fiksiranju DNA na membranu (nitroceluloza na 80° C, a najlon izlaganjem ultraljubičastom zračenju), hibridizaciji s poznatom sondom/probom DNA obilježenom radioizotopom, fluorescentnom bojom ili kromogenom, te konačno detekcija hibrida autoradiografijom ili kemoluminiscencijom. Metode sličnog principa su analogijom dobile ime, *Northern blot* i *Western blot* u kojima kao obilježena proba služe RNA ili protein.

Tablica 2.

Glavne molekularne tehnike i metode korištene za ispitivanje raznih mikroorganizama.

Molekularne tehnike	Metode	Primjer mikroorganizma
Hibridizacija nukleinske kiseline sa specifičnim probama	hibridizacija na solidnoj podlozi tekućinska hibridizacija <i>in situ</i> hibridizacija	HPV, CMV
Umnažanje ciljane molekule nukleinske kiseline	umnažanje DNA (PCR)	većina virusa, bakterija i gljiva
	reverzna transkripcija te umnažanje cDNA (RT-PCR)	RNA virusi ili mRNA DNA virusa
	ugniježđen (<i>nested</i>) PCR	herpes virusi
	višestruki (<i>multiplex</i>) PCR	herpes virusi, HPV
	PCR u stvarnom vremenu (<i>real-time</i> PCR)	većina virusa
	petljom posredovano izotermno umnažanje (LAMP)	CMV, HSV, HPV
	helikazom ovisno umnažanje (HDA)	HSV 1 i 2
Umnažanje specifične probe	ligazom posredovano umnažanje klivazom posredovano umnažanje izotermno umnažanje kružne probe	HPV, HSV
Mikrotehnologija	mikročip sa DNA probama	HPV
	višestruki test posredovan mikrokuglicama	HPV, HSV, CMV
Određivanje slijeda nukleotida	razne metode sekvencioniranja produkata PCR	većina virusa, bakterija i gljiva

HC, *hybrid capture*, vezivanje hibrida; PCR: *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom; cDNA: *complementary* DNA, DNA komplementarni molekuli RNA; LAMP: *loop-mediated isothermal amplification*; HDA: *helicase-dependent amplification*; HPV: humani papiloma virus; CMV: citomegalovirus; HSV: Herpes simplex virus.

Princip tekućinske hibridizacije je stvaranje hibrida u otopini, vezivanje hibrida za solidnu podlogu (mikrotitarska ploča) te detekcija hibrida imunokolorimetrijskom metodom. Komercijalni test *Hybrid Capture*[®] 2 (HC2; Qiagen Gaithersburg, Inc, MD, USA [prethodno Digene Corp]) zasniva se na tekućinskoj hibridizaciji probe RNA sa ciljnom DNA te se široko koristi u kliničkim laboratorijima za detekciju CMV-a i visokorizičnih HPV-a (tablica 2).

Analogno imunohistokemiji koja omogućava lokalizaciju proteina u tkivu (*in situ*), koju je izumio Joseph G. Gall (16), hibridizacija *in situ* omogućava lokalizaciju ribonukleinske kiseline unutar tkiva ili slobodnih stanica (npr. citološki obrisak). Fluorescentna hibridizacija *in situ* s DNA-probom, primjerice, koristi se za određivanje strukture kromosoma. Hibridizacija *in situ* s RNA-probom često se koristi za određivanje i lokalizaciju RNA (mRNA, glasničke RNA, transkript), kao npr. u dijagnostici HPV-a i CMV-a, odnosno mjerenju virusnih transkripata (tablica 2).

Umnažanje DNA

Umnažanje ili amplifikacija DNA moguća je lančanom reakcijom polimeraze (PCR, *polymerase chain reaction*) kojom se umnaža dio DNA iz jedne ili malog broja kopija na tisuću i nekoliko milijuna kopija (17). Princip PCR je jednostavan: u prvom koraku se DNA razgrađuje na visokoj temperaturi (94-96° C), zatim hibri-

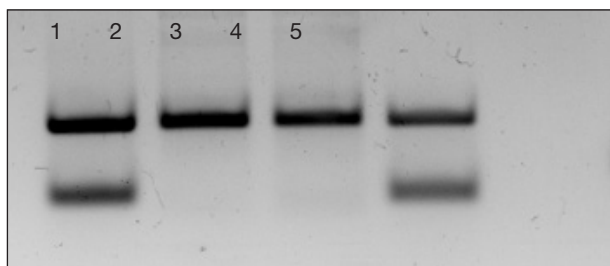
dizira s početnim oligonukleotidima (početnice) na nižoj temperaturi (55-65° C), a potom se dvolančana DNA sintetizira (elongacija početnica na 72° C) pomoću Taq DNA-polimeraze (izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*) i to tijekom 20-40 ciklusa. Za metodu PCR Kary Banks Mullis je dobio Nobelovu nagradu za biokemiju 1993. godine. Danas je PCR prvi korak u većini metoda molekularne biologije koje omogućavaju široku primjenu u raznim genetskim istraživanjima. Najčešće metode detekcije oralnih infekcija u kojima se primjenjuje PCR navedene su u tablici 2.

Da bi se povećala specifičnost PCR-a i smanjila količina nespecifičnih produkata PCR-a često se koristi ugniježđen (*nested*) PCR; produkt prve reakcije PCR-a koristi se kao kalup za drugu PCR-reakciju koja je dizajnirana da generira manji produkt PCR-a od prvog što zahtijeva detaljnije poznavanje ciljane sekvence koja se želi umnožiti.

Kako bi se umnožio genom RNA-virusa ili transkripti DNA-virusa potrebno je prepisati RNA u cDNA, reverznom transkriptazom (RT) te potom umnožiti cDNA (RT-PCR). Nedostatak široke kliničke primjene RT-PCR-a je stabilnost RNA koja je lako razgradiva. Treba imati u vidu adekvatno prikupljanje i obradu uzorka; treba ga što prije pohraniti u otopinu koja čuva integritet molekule RNA, što prije dostaviti u laboratorij, izolirati RNA i prepisati ga u cDNA. Primjerice, u slučaju RT-PCR-a na HPV, RNA izolirana iz uzoraka prikupljenih u mediju za tekućinsku citologiju (LBC,

liquid base cytology) je bila dobro očuvana i nakon nekoliko tjedana (18). Prednost RT-PCR-a je detekcija transkripata onkogeni E6 i E7 HPV-a (19) koji ukazuju na aktivnost virusa u smislu njegove karcinogeneze u stanici domaćina, dok PCR na virusnu DNA može ukazivati jednako na latentnu (netransformirajuću) kao i aktivnu infekciju; naime, transkripcija onkogeni je znatno povećavana u cervikalnim lezijama visokog stupnja (20).

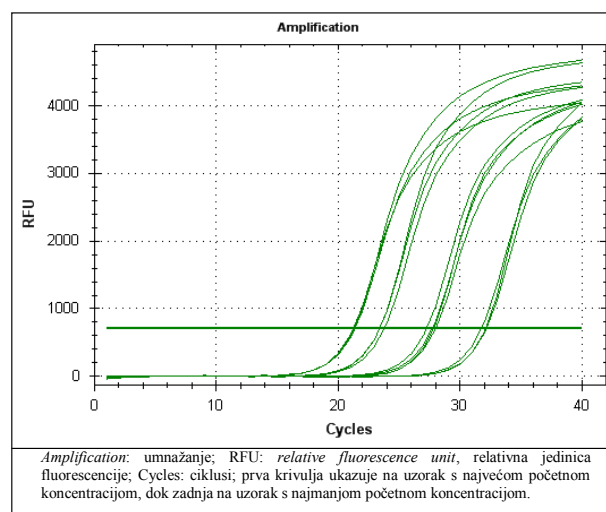
Višestruki (*multiplex*) PCR sastoji se od više setova početnica koje omogućavaju istodobno umnažanje većeg broja različitih produkata PCR u jednoj reakciji. Jednim testom se može dobiti više rezultata i time se štedi na vremenu i sredstvima za izradu testa. Preduvjet je da temperatura mekšanja DNA mora biti slična za sve setove početnica. Poželjno je da su produkti PCR-a različite veličine tako da ih se lako može razdvojiti elektroforezom u gelu agaroze (sl. 1). Višestruki PCR se koristi za detekciju i identifikaciju raznih skupina virusa kao što su HPV-i (21) i herpesvirusi (22,23). Komercijalna metoda višestrukog PCR-a SeptiFast test (*Roche Molecular Systems*, Mannheim, Germany) omogućava identifikaciju 20 patogenih prokariota (8 gram-negativnih bakterija, 6 gram-pozitivnih bakterija i 6 vrsta gljiva) (24).



Sl. 1. Primjer elektroforeze produkata PCR u 2%-om gelu agaroze; DNA dobivena PCR-om je vizualizirana bojenjem etidijum bromidom pri 254 nm te korištenjem sustav ImageMaster VDS (*Pharmacia Amersham Biotech*) i UVitec Cambridge (program Alliance 4,7); jažica 1-5: produkt PCR umnoženog β -globina (268 pb – viša trakica) i HPV-a zajedničkim početnicama GP5+/6+ (produkt 150 pb – niža trakica); jažica 1: pozitivna kontrola – DNA izolirana iz stanica HeLa koje sadrže HPV tip 18; jažica 2-4: DNA izolirana iz obrisaka usne šupljine – uzorak u jažici 4 je HPV pozitivan; jažica 5: negativna kontrola.

PCR u stvarnom vremenu (*real-time* PCR) je ujedno i kvantitativni PCR (qPCR, *quantitative* PCR) u usporedbi s običnim PCR-om koji je kvalitativan i iz kojega se teško može precizno odrediti količina proizvedenog produkta PCR-a. PCR u stvarnom vremenu se obično koristi kako bi se utvrdilo je li određena DNA ili cDNA prisutna u uzorku i u kojem broju kopija (sl. 2). PCR u stvarnom vremenu je vrlo precizan s obzirom da metoda koristi fluorescentne boje ili fluorofor kojeg sadrži proba DNA (TaqMan, FRET) (25,26).

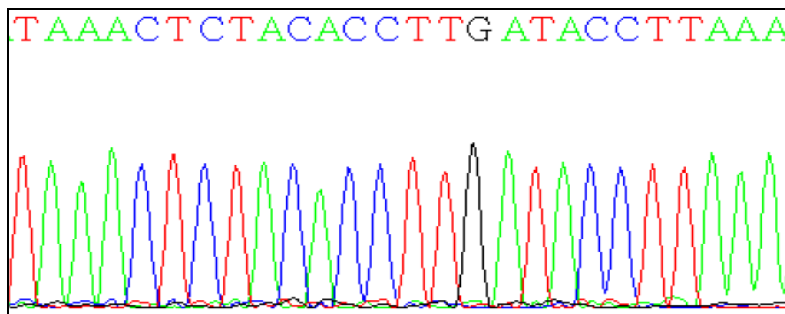
Umnažanje specifične probe, a ne ciljne DNA, ligazom posredovanog PCR-a pokazalo se vrlo korisnim pristupom kod djelomično poznatog slijeda nukleotida ciljne DNA te se koristi za otkrivanje genotipova HPV-a i HSV-a (27).



Sl. 2. Primjer obrasca PCR-a u stvarnom vremenu.

Druge metode umnažanja DNA su se razvile u svrhu što jednostavnije detekcije i tipizacije pojedinih virusa kao petljom posredovano izotermno umnažanje (LAMP, *loop-mediated isothermal amplification*) i helikazom ovisno umnažanje (HDA, *helicase-dependent amplification*). Prednost tih metoda je da ne zahtijevaju aparat za umnažanje DNA već se odvijaju na jednoj temperaturi u vodenoj kupelji ili termobloku. LAMP se uspješno koristi za otkrivanje HSV-a, CMV-a i HPV-a (28–30), dok HDA za otkrivanje HSV-a (31).

Iako je skupa, sve češće se koristi mikrotehnologija kao npr. mikročip s probama DNA za otkrivanje brojnih genotipova HPV-a u jednom testu (HPVDNA Chip®, *Biomedlab Co.*, Seoul, Korea) (32), te test posredovan mikrokuglicama (*Luminex® technology*) za višestruku detekciju HPV-a, HSV-a i CMV-a (33).

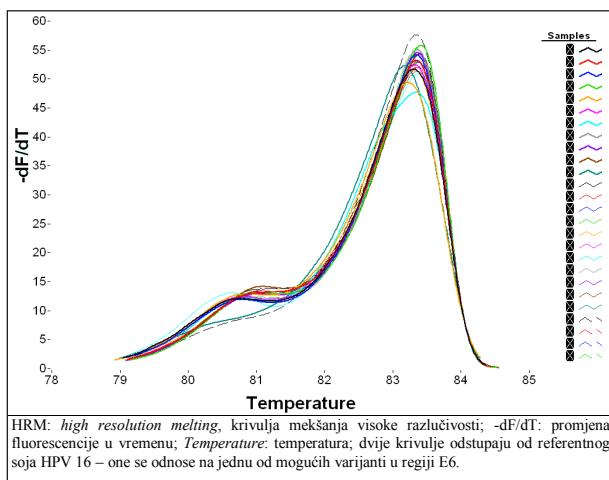


Sl. 3. Prikaz slijeda nukleotida određenog sekvencioniranjem.

Određivanje slijeda nukleotida

Metoda određivanje slijeda nukleotida ili sekvencioniranje (34), za koju su Frederick Sanger i Walter Gilbert dobili Nobelovu nagradu za kemiju 1980. godine, omogućila je očitavanje cjelokupnog ljudskog genoma. Metoda se uglavnom koristi u istraživačkim laboratorijima, međutim sve češće i u kliničkim laboratorijima. Sekvencioniranje (sl. 3) daje točan profil slijeda nukleotida određenog produkta PCR-a i nakon usporedbe s referentnim sekvencama (www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/ i druge baze podataka) omogućava spoznaju o vrsti, tipu ili varijanti određenog mikroorganizma. U bakteriologiji sekvencioniranje djelomičnog ili cjelokupnog genoma se često koristi za određivanje rezistencije na antibiotike (35).

Metoda koja se bazira na analizi krivulja mekšanja visoke razlučivosti (HRM, *high resolution melting*) omogućava detekciju razlike u jednom nukleotidu te se često koristi za razlučivanje različitih sekvenci od referentnih (sl. 4) (36). Metoda se može koristiti kao brza metoda probira (*screening*) prije selektivnog sekvencioniranja samo onih krivulja HRM koje se razlikuju. Najveća prednost je ta što metoda HRM omogućava uštedu vremena i novca.



Sl. 4. Primjer obrasca metode analize krivulje mekšanja DNA visoke razlučivosti varijanti HPV tipa 16 u regiji E6.

ZAMKE UMNAŽANJA DNA

Metode molekularne biologije nude mnoge prednosti, veću osjetljivost i specifičnost testa, ali kriju i mnoge zamke koje mogu dovesti do lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata (37).

Odabir početnica i proba

Prvi korak upotrebe metode PCR je dobar odabir početnih oligonukleotida koji se vežu za ciljnu DNA te služe kao kalup Taq DNA-polimerazi; početnice su najčešće dužine 20 parova baza s ne više od 50 % udjela [G + C] kako bi temperatura sparivanja početnice na ciljnu DNA bila od 55 do 65° C. Potom se PCR mora optimizirati mijenjanjem jednog po jednog parametra (koncentracija početnica, magnezija i drugih komponenti reakcije) (38).

Za brzu detekciju obitelji mikroorganizma često se koriste početnice odabrane u sačuvanoj regiji genoma. Primjerice, za identifikaciju prokariota koriste se početnice odabrane u vrlo konzerviranoj ribozomalnoj DNA (regija između 16S i 23S bakterijskog rDNA te 18S i 5.8S rDNA gljiva) (39). Slično, za detekciju obitelji virusa, npr. HPV-a, koriste se zajedničke početnice komplementarne regiji L1 koja kodira za kapsidni protein virusa (40). Za detekciju spolnih HPV-tipova najčešće se koriste tzv. početnice MY09/11 (41) i GP5+/GP6+ (42); ove posljednje se mogu koristiti u izravnom ili ugniježđenom PCR-u nakon umnažanja s prethodnim početnicama. Za detekciju još šireg spektra HPV-tipova, kožnih (b-HPV) i genitalnih (a-HPV) koriste se početnice FAP59 i FAP64 koje su također komplementarne regiji L1 HPV-a (43). Za određivanje pojedinog tipa HPV-a najjednostavnije je odabrati početnice u varijabilnim regijama genoma HPV-a, kao npr. E6 i E7, te ih koristiti u pojedinačnom ili višestrukom PCR-u (21). Mnoge metode genotipizacije HPV-a zasnivaju se na analizi produkta PCR-a dobivenog zajedničkim početnicama koji se može pocijepati restriksijskim enzimima, dobiveni fragmenti razdvojiti elektroforezom te prema dobivenom profilu fragmenata DNA odrediti tip HPV-a (40); metoda nije idealna i vremenski je

zahtjevna. Alternativna metoda je metoda hibridizacije produkta PCR sa HPV-tip-specifičnim probama vezanim na najlon membranu gdje se hibrid detektira kolorimetrijski; komercijalne metode na tom principu su INNO-LiPA HPV *Genotyping Assay* (Innogenetics Group, Gent, Belgium) i Roche LBA (*Molecular Systems*, Pleasanton, CA, USA), obje dizajnirane za identifikaciju visokorizičnih i niskorizičnih tipova HPV-a. Međutim, ti komercijalni testovi genotipizacije HPV-a su korisni za epidemiološke studije, ali ne i za klinička ispitivanja zbog svojih prednosti i mana (44). Jedini klinički validirani testovi za primarni cervikalni probir HPV-om su HC2, GP5+/6+ PCR, Cobas® 4800 PCR (Roche Molecular Systems Inc., Alameda, CA, USA) i Abbott Real Time PCR (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA) (45).

Provjera uspješnosti reakcije

Da bi reakcija PCR bila uspješna, treba voditi računa o kontroli kvalitete izrade reakcije PCR. Za svaku seriju reakcija treba uzeti u obzir nekoliko parametara: 1) negativna (smjesa bez DNA te smjesa sa neutralnom DNA) i pozitivna kontrola (pročišćena DNA mikroorganizma ili poznate ciljane DNA koja se želi umnožiti); 2) interna (geni prisutni u svim uzorcima kao npr. albumin, β -globin, α - i β -aktin, α - i β -tubulin, 18S i 28S rRNA) ili egzogena kontrola (dodana u uzorak prije ekstrakcije DNA ili u smjesu PCR-reakcije prije umnažanja); te 3) čista (primjerice, stolica i sputum sadrže više inhibitora od seruma ili plazme, a izolirana DNA najmanje) i optimalna količina DNA koja se umnaža (uvijek je bolje u reakcijsku smjesu staviti manje nego više ciljane DNA) (38).

Kontaminacije

U molekularnom laboratoriju se treba ponašati kao u visoko zaraznom okruženju i voditi računa o dobroj laboratorijskoj praksi kako bi se izbjegle kontaminacije s jednog biološkog uzorka na drugi, pogotovo ako se radi o dijagnostici virusa. Najbolje je postupke izolacije DNA, pripreme smjese PCR-a, reakciju PCR i analizu produkata PCR-a raditi u posebnim prostorijama ili radnim prostorima. Osim toga, svaki postupak treba raditi s posebnim mikropipetama i novim rukavicama uz čišćenje mikropipeta nakon svakog pipetiranja novog uzorka biološkog materijala ili DNA. Stoga je za uspješnost PCR-a i sestrinskih metoda iznimno važno voditi računa o edukaciji djelatnika koji rade molekularne metode te redovnom održavanju laboratorijskih instrumenata (38).

ZAKLJUČAK

Testovi molekularne biologije, hibridizacija, konvencionalni PCR-u i PCR u stvarnom vremenu, osjetljivi su, objektivni, lako izvodljivi i manje su zahtjevni od klasičnih mikrobioloških metoda, u smislu edukacije i osiguranja kvalitete i stoga sve češće nadopunjuju ili zamjenjuju klasične testove u kliničkim laboratorijima. Kako mnogi virusi, gljive i bakterijske vrste nastanjuju usnu šupljinu, PCR u kombinaciji sa sekvencioniranjem DNA omogućit će njihovu bolju dijagnostiku i epidemiološku sliku. Sljedeći logičan korak bit će analiza transkripata kako bi se razumjele veze između razina i promjena usne šupljine. U tome će zasigurno pomoći nova generacija sekvencioniranja (46,47).

ZAHVALA

Zahvaljujem ing. Jasminki Golubić Talić i dr.sc. Ivanu Sabolu na ustupljenim slikama prikazanim u ovom radu.

LITERATURA

1. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human papillomaviruses. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 2007.
2. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJF i sur. Human Papillomavirus and Diseases of the Upper Airway: Head and Neck Cancer and Respiratory Papillomatosis. *Vaccine* 2012; 30 (Supplement 5): F34-F54.
3. Arduino PG, Porter SR. Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2008; 37: 107-21.
4. Maitland N, Flint S, Scully C, Crean SJ. Detection of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in labial salivary glands in Sjogren's syndrome and non-specific sialadenitis. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 1995; 24: 293-8.
5. Vouloumanou EK, Rafailidis PI, Falagas ME. Current diagnosis and management of infectious mononucleosis. *Curr Opin Hematol* 2012; 19: 14-20.
6. Bravender T. Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and infectious mononucleosis. *Adolesc Med State Art Rev* 2010; 21: 251-64, ix.
7. Lalla RV, Patton LL, Dongari-Bagtzoglou A. Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. *J Calif Dent Assoc* 2013; 41: 263-8.

8. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5721-32.
9. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R i sur. The oral metagenome in health and disease. *ISME J* 2011; 6: 46-56.
10. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA i sur. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. *Cell Host Microbe* 2011; 10: 497-506.
11. Sonnenberg A. Review article: historic changes of *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 329-42.
12. Gall-Troselj K, Mravak-Stipetić M, Jurak I, Ragland WL, Pavelić J. *Helicobacter pylori* colonization of tongue mucosa--increased incidence in atrophic glossitis and burning mouth syndrome (BMS). *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2001; 30: 560-3.
13. Brailo V, Vučičević-Boras V, Alajbeg IZ, Alajbeg I, Lukenda J, Aeurkovic M. Oral burning symptoms and burning mouth syndrome--significance of different variables in 150 patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006; 11: E252-5.
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning - A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
15. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503-17.
16. Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 63: 378-83.
17. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-50.
18. Cuschieri KS, Beattie G, Hassan S, Robertson K, Cubie H. Assessment of human papillomavirus mRNA detection over time in cervical specimens collected in liquid based cytology medium. *J Virol Methods* 2005; 124: 211-5.
19. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; 89: 213-28.
20. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* 2006; 110: 525.
21. Husnjak K, Grce M, Magdić L, Pavelić K. Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods* 2000; 88: 125-34.
22. Markoulatos P, Georgopoulou A, Siafakas N, Plakokefalos E, Tzanakaki G, Kourea-Kremastinou J. Laboratory Diagnosis of Common Herpesvirus Infections of the Central Nervous System by a Multiplex PCR Assay. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4426-32.
23. Vrioni G, Kalogeropoulos C, Gartzonika C, Priavali E, Levidiotou S. Usefulness of Herpes Consensus PCR methodology to routine diagnostic testing for herpesviruses infections in clinical specimens. *Virology* 2007; 4: 59.
24. Lehmann LE, Hunfeld K-P, Emrich T i sur. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 2008; 197: 313-24.
25. Gunson RN, Collins TC, Carman WF. Practical experience of high throughput real time PCR in the routine diagnostic virology setting. *J Clin Virol* 2006; 35: 355-67.
26. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM i sur. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 165-256.
27. Wu DY, Wallace RB. The ligation amplification reaction (LAR)--amplification of specific DNA sequences using sequential rounds of template-dependent ligation. *Genomics* 1989; 4: 560-9.
28. Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M i sur. Rapid Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infection by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 951-5.
29. Suzuki R, Yoshikawa T, Ihira M i sur. Development of the loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of cytomegalovirus DNA. *J Virol Methods* 2006; 132: 216-21.
30. Hagiwara M, Sasaki H, Matsuo K, Honda M, Kawase M, Nakagawa H. Loop-mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus type 6, 11, 16, and 18. *J Med Virol* 2007; 79: 605-15.
31. Kim H-J, Tong Y, Tang W i sur. A rapid and simple isothermal nucleic acid amplification test for detection of herpes simplex virus types 1 and 2. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2011; 50: 26-30.
32. Kim CJ, Jeong JK, Park M i sur. HPV oligonucleotide microarray-based detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesions. *Gynecol Oncol* 2003; 89: 210-7.
33. Rautava J, Kuuskoski J, Syrjänen K, Grenman R, Syrjänen S. HPV genotypes and their prognostic significance in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 2012; 53: 116-20.
34. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-7.
35. Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Peña R, Cisneros JM, McConnell MJ. Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2710-7.
36. Sabol I, Čretnik M, Hadžisejdić I, Si-Mohamed A i sur. A new approach for the evaluation of the human papillomavirus type 16 variability with high resolution melting analysis. *J Virol Methods* 2009; 162: 142-7.
37. Grce M, Matovina M, Milutin-Gasperov N, Sabol I. Advances in cervical cancer control and future perspectives. *Coll Antropol* 2010; 34: 731-6.
38. Park DJ, ed. *PCR Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 2011.
39. Louie RF, Tang Z, Albertson TE, Cohen S, Tran NK, Kost GJ. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* 2008; 36: 1487-92.
40. Milutin Gašperov N, Sabol I, Matovina M, Spaventi Š, Grce M. Detection and Typing of Human Papillomaviruses Combining Different Methods: Polymerase Chain Reaction,

Restriction Fragment Length Polymorphism, Line Probe Assay and Sequencing. *Pathol Oncol Res* 2008; 14: 355-63.

41. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Levvis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-14.

42. Van den Brule AJC, Pol R, Fransen-Daalmeijer N, Schouls LM, Meijer CJLM, Snijders PJF. GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 779-87.

43. Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquist B, Göran Hansson B. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J Gen Virol* 1999; 80: 2437-43.

44. Sabol I, Salakova M, Smahelova J i sur. Evaluation of Different Techniques for Identification of Human Papillomavirus Types of Low Prevalence. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1606-13.

45. Arbyn M, Ronco G, Anttila A i sur. Evidence Regarding Human Papillomavirus Testing in Secondary Prevention of Cervical Cancer. *Vaccine* 2012; 30 (Supplement 5):F88-F99.

46. Zaura E. Next-generation sequencing approaches to understanding the oral microbiome. *Adv Dent Res* 2012; 24: 81-5.

47. Kamalakaran S, Varadan V, Janevski A i sur. Translating next generation sequencing to practice: Opportunities and necessary steps. *Mol Oncol* 2013; 7: 743-55.

S U M M A R Y

MOLECULAR DIAGNOSIS OF ORAL INFECTIONS

M. GRCE

Rudjer Bošković Institute, Department of Molecular Medicine, Zagreb, Croatia

Many viruses, fungi and bacteria inhabit the mouth. Most of these microorganisms can be easily cultured and identified by classical microbiological tests, but some of them, such as human papilloma virus, can only be identified by the methods of molecular biology. Some microorganisms are present in a very small amount and cannot be detected by classical tests; therefore, in this case, molecular diagnosis is also a logical alternative. Molecular biology assays are sensitive, objective, easy to perform and less demanding than conventional microbiological methods in terms of training and quality assurance. This paper describes the molecular methods that are commonly used for the detection of microorganisms that colonize the oral cavity.

Key words: viruses, fungi, bacteria, mouth, diagnosis