

Dijagnostički postupci u procjeni mikrobne flore parodontitisa

Marija Ivić-Kardum¹
Nataša Bader²
Greta Štaudt-Škaljac³

¹Zavod za parodontologiju
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

²Zavod za mikrobiologiju s
parazitologijom
Medicinski fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

³Zavod za dentalnu patologiju
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu

Sažetak

Iako oralnu floru čini više od 300 bakterijskih vrsta, smatra se da samo nekoliko vrsta, pojedinačnih ili u kombinaciji, inicira progresiju parodontitisa. Parodontnim patogenima smatraju se: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola* i drugi. Već su više od 20 godina tehnike kulture primarne metode za identifikaciju i proučavanje patogena. Tehnike kulture omogućuju da se otkrije najširi spektar bakterija iz subgingivne flore, odrede bakterijske vrste i antibakterijska osjetljivost. Selektivne kulture uključuju upotrebu medija ograničenih za određene mikroorganizme, a neselektivni mediji osiguravaju maksimalni rast najizraženijih mikroorganizama flore. S obzirom na tehničke poteškoće, kultiviranje mikroorganizmima može biti nepovoljno i vremenski i financijski. Zato su imunotestovi, enzimski i DNA testovi razvijeni kao brze i financijski povoljne alternative tehnikama kulture.

Molekularne dijagnostičke tehnike, DNA sonde i lančana reakcija polimeraze, PCR, osobito su korisne za otkrivanje bakterija i virusa koji se ne mogu uzgojiti in vitro ili su neosjetljivi na današnje tehnike kultiviranja. Senzitivnost i specifičnost tih testova pokazala se je optimalnom s obzirom na postojanje brojnih bakterija u uzorcima plaka.

Ključne riječi: parodontitis, mikrobna flora, mikrobiološki testovi.

Acta Stomat Croat
2001; 133-136

STRUČNI RAD

Primljeno: 13 srpnja 2000.

Adresa za dopisivanje:

Marija Ivić-Kardum
Zavod za parodontologiju
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
Gundulićeva 5, 10000 Zagreb

Uvod

U parodontnoj su dijagnostici primjenom suvremenih mikrobioloških metoda vidljivi znatni pomaci. Tako dijagnostički testovi imaju sve veće značenje u pravodobnoj kliničkoj dijagnostici, u određivanju optimalnih terapijskih postupaka i u

povećanoj uspješnosti terapije. Oni se temelje na otkrivanju bakterija plaka, bilo pronalaženjem upalnih medijatora, raspalih produkata tkiva ili otkrivanjem bakterijskih antigena.

Prema Socranskom (1) potrebno je postojanje četiriju čimbenika za nastanak i razvitak parodontnog procesa: sklonost domaćina zbog oslabljenja

obrambenog mehanizma, povoljno lokalno okružje, povećani broj patogenih bakterija i reducirani broj nepatogenih čimbenika koji inhibiraju proces.

Danas postoji mišljenje da se pri parodontnoj bolesti u prvome redu radi o polibakterijskoj manifestaciji povezanoj s djelovanjem određenih bakterijskih patogena (1, 2).

Unatoč postojanja velikoga broja mikroorganizama identificiranih iz parodontnog džepa, parodont patogeni smatraju se: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* i *Treponema denticola*.

Prema najnovijim spoznajama Pagea (3) uloga bakterija je odlučujuća, no čimbenici domaćina određuju nazočnost, progresiju te ishod bolesti.

Tako su epidemiološka i klinička ispitivanja parodontitisa navela kliničare i istraživače da parodontitis povezuju s obilježjima osoba rizičnih za parodontnu bolest. Naime, bolest se manifestira fazama aktivnosti i remisije tako da većina oboljelih često nema aktivnu fazu bolesti (može biti povremena i neredovita). No, u malom postotku parodontitisa progresija bolesti je česta i rapidna te nepovoljno reagira na terapijske zahvate. Kako ne možemo predvidjeti aktivne od inaktivnih faza bolesti, nameće se i pitanje razlikovanja osoba s visokim rizikom na parodontnu bolest od osoba s niskim rizikom na tu parodontnu bolest.

Po najnovijim smjernicama u parodontologiji, prema Pageu (4), nastoji se razjasniti povezanost oralnoga zdravlja i sustavskih bolesti. Štoviše, progresija bolesti parodonta nastaje učinkom mehanizama koji mogu imati uzrok u čvrstoj vezi oralnih i sustavskih bolesti. To može uključiti: aktivaciju odgovora domaćina, prijelaz upalnih medijatora u cirkulaciju te porast gram - negativnih bakterija i njihovih sastavnica u subgingivnom biofilmu.

Mikrobna kolonizacija, proliferacija i plak formacija na površini zuba koji je pokriven različitim vrstama tkiva parodonta navode na razmišljanje je li parodontitis jedinstveni entitet. Tako Lindhe (5) smatra da je parodontitis zbog svojeg anatomskog obilježja jedinstven entitet bolesti. U novije vrijeme govori se o sudjelovanju herpes virusa u etiologiji i patogenezi nekih agresivnih oblika parodontitisa, nazvanih herpes virusu pridružena parodontna bo-

lest. Epstein Barr virus tip 1 (EBV-1) napada parodontne B-limfocite i ljudski citomegalovirus (HCMV), parodontne monocite/makrofage i T-limfocite. U parodontnim lezijama koje su pridružene herpes virusnoj infekciji često se nalazi povišena razina parodont patogenih bakterija (6).

Patogenetski gledano, parodontni patološki proces može biti posljedica ili primarno virusne infekcije i replikacije ili virusom posredovanog oštećenja obrane domaćina.

Testovi za procjenu parodontnih patogena

Suvremene spoznaje o etiopatogenezi (7) parodontnih bolesti pomažu da se bolje razumijevaju nastanak i tijek parodontnih bolesti, otkrivaju aktivne faze bolesti i prepoznavanju aktualni čimbenici koji mogu uzrokovati oštećenje mehanizama obrane domaćina. Uz to, saznanja o aktivnosti bolesti i mehanizmima patogeneze omogućit će praktičaru da parodontnu bolest liječi pravodobno i djelotvorno.

Odnos između parodontnih patogena i aktivnosti bolesti služi kao osnova za primjenu mikrobioloških testova u parodontologiji. Razne vrste mikrobioloških testova mogu se rabiti za: evaluaciju etioloških čimbenika, procjenu aktivnosti bolesti, određivanje učinka tretmana i praćenje recall intervala.

Postoje mnogi testovi koji se upotrebljavaju da bi se dokazali subgingivni mikroorganizmi, kao što su faznokontrastna mikroskopija, mikroskopija tamnoga polja, bakterijska kultura, imunološki testovi, testovi nukleinskih kiselina, enzimski testovi i PCR (lančana reakcija polimeraze).

Kakvoća mikrobioloških testova mjeri se procjenom standardnih kriterija, kao što su senzitivnost, specifičnost, točnost, najčešće u usporedbi s bakterijskom kulturom koja služi kao "zlatni standard" (7).

Fazno kontrastna mikroskopija i mikroskopija tamnoga polja

Tom metodom procjenjuje se veličina, oblik i pokretljivost bakterija. Međusobno se razlikuju uzorci plaka povezani sa zdravim stanjem koje obilježava malen broj većinom nepokretnih koka i uzorci plaka povezani s bolešću koju obilježava

veliki broj različitih bakterijskih morfotipova. Dok je kliničko ispitivanje izravna mjera gingivne upale, mikroskopija tamnoga polja i faznokontrastna mikroskopija mogu dati informacije koje nisu klinički vidljive. Klinička djelotvornost terapijskoga postupka i učinkovitost oralne higijene mogu se tako prikazati pomacima od flore povezane s bolešću do flore povezane sa zdravljem (8).

Bakterijska kultura

Mikroorganizmi koji se danas smatraju odgovornim za parodontnu bolest većinom su anaerobne bakterije. Kultivacija anaerobnih bakterija relativno je spora, komplicirana i skupa. Osobit problem predstavljaju testovi osjetljivosti, odnosno određivanja rezistencije, pogotovo kod terapijski rezistentnih parodontitisa. Osnovni mehanizam otpornosti na antibiotike jest produkcija beta-laktamaza. Oko 70% sojeva *Prevotella spp.* i *Porphyromonas spp.* osjetljivi su na penicilin, ampicilin i skupinu anti-pseudomonas penicilina (tikarcilin, mezlocilin, piperacilin), ali unutar skupine *Bacteroides fragilis* samo 5-20%. Posljednjih desetak godina pojavljuju se sojevi rezistentni na metronidazol i amoksicilin-klavulanska kiselina (9).

Bakterijska kultura rabi se kao zlatni standard prema kojoj se druge metode vrjednuju. Znatan je problem u tome što se bakterije iz parodontnih džepova teško mogu uzgojiti, a to rezultira lažno negativnim testom u komparaciji s mikrobiološkim testovima koji ne zahtijevaju kultivirajuće ili žive bakterije da bi se te vrste otkrile. Testovi kulture određuju bakterijske stanice ili jedinice koje tvore kolonije, a imunotestovi i sonde nukleinskih kiselina mjere antigene i sekvence nukleinskih kiselina. Loeshe i sur. (10) uspoređivali su različite mikrobiološke testove testiranjem 204 uzorka plaka na 4 vrste parodontnih patogena s pomoću testa kulture, imunoloških testova, DNA sondi i BANA testom. Bakterijska kultura bila je najmanje pouzdana, s točnošću od 61-79%, a DNA sonde bile su najtočnije metode, s pouzdanošću od 88-96%.

Uporaba neselektivnih i selektivnih hranjivih podloga pridonosi bržem i boljem prepoznavanju i identifikaciji. Neselektivne podloge se s obzirom na svoj sastav razlikuju prema sposobnosti potpomaganja rasta određenih skupina bakterija. Selektivne

podloge uz dodatak antibiotika služe za izolaciju, primjerice gram-negativnih štapića. Tako se upotrebljava TSBV, selektivna hranjiva podloga uz dodatak antibiotika i konjski serum za izolaciju *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (11,12).

Enzimski testovi

Spoznaja da se infekcija može dijagnosticirati tako da se otkriju aktivnosti enzima usmjerenih prema proteinima i peptidima potakla je razvoj enzimskih testova. Takav enzim je BANA (N-benzoyl-DL-arginin-2 naphthylamide). *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* i *Treponema denticola* proizvode tripsinu sličan enzim čija se aktivnost mjeri hidrolizom sintetskog peptida, BANA. Ta reakcija omogućuje da ih se otkrije. Ti testovi upućuju na postojanje skupina parodontnih patogena otkrivanjem njihovih enzima, kao što su kolagenaze, peptidaze i tripsinu sličnih enzima koji razaraju parodontno tkivo. Oni ipak ne omogućuju da se otkriju patogeni koji nemaju određeni enzimski profil kao što je npr. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (13,14).

Imunološki testovi

Temelje se na specifičnom vezanju monoklonalnih protutijela na površinski antigen određenoga mikroorganizma. Za prikazivanje reakcije antigen-protutijelo upotrebljavaju se fluorescentne boje i radioaktivni izotopi. Glavni im je nedostatak unakrsna reaktivnost te nemogućnost detekcije patogena za koji još ne postoji protutijelo (13,14).

Jedna tehnika, imunofluorescentna mikroskopija, čini se, pouzdano otkriva bakterijske razine već od 10×10^3 . Druga učinkovita tehnika ELISA dovodi do kolorimetrijske reakcije sekundarno vezujući protutijelo i enzimsku aktivnost.

Molekularno-dijagnostičke tehnike DNA sondi i PCR

DNA analitička metoda

Primjena DNA oligonukleotidnih sondi temelji se na specifičnoj vezi odsječaka jednoga lanca nukle-

inske kiseline s komplementarnim slijedom nukleinske kiseline bakterije. Načelo detekcije produkta hibridizacije specifičnog slijeda nukleinske kiseline s komplementarnim slijedom najčešće je radioaktivni ili enzimski. DNA sonda najviše se primjenjuje za identifikaciju *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* i *Prevotella intermedia* te drugih parodontnih patogena. Prednost je metode što omogućuje visoku specifičnost i određivanje približnoga broja testiranih patogena te detekciju već kod 10^3 bakterija u uzorku. Nedostatak je u činjenici da određeni mikroorganizmi imaju slične gene te nemogućnost da se odredi osjetljivosti patogena na antibiotik (15). Socransky i sur. opisali su godine 1994. tehniku DNA-DNA hibridizacije za identifikaciju 40 subgingivnih vrsta (16).

Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Lančana reakcija sinteze DNA s pomoću DNA polimeraze ili lančana reakcija polimeraze (PCR, polymerase chain reaction) je *in vitro* postupak umnažanja DNA, u tijeku kojeg se selektivno uvišestrukuju (amplificiraju) traženi slijedovi gena. Preduvjet za izradbu reakcije jest da se zna slijed nukleotida rubnih dijelova odsječaka DNA, na temelju kojega se konstruiraju početni oligonukleotidi (primer) i postojanje barem jedne početne molekule DNA koja u reakciji ima ulogu kalupa. Osnovni ciklus PCR-a sastoji se od triju koraka koji se izvode u istoj zatvorenoj epruveti, ali na različitim temperaturama.

Metoda PCR smatra se najbržom i najosjetljivijom metodom za dokazivanje postojanja bakterijskih slijedova DNA, a o njezinoj se je primjeni u identifikaciji parodontnih mikroorganizama izvještavalo u najnovijim radovima (17,18).

Zaključak

Genetski, imunološki i enzimski bakteriološki testovi jesu brze i povoljne alternative za evaluaciju infektivnih organizama parodonta. Glavni nedostatak specifičnih metoda jest taj da su dostupne samo za mali broj parodontnih patogena. Osim toga, njima nije moguće odrediti antibiotsku osjetljivost. Komercijalni dijagnostički testovi za rutinsku upotrebu, slični laboratorijskim testovima, naširoko će se upotrebljavati za procjenu rizičnih mjesta i za praćenje uspjeha terapije u parodontnih pacijenata.

Literatura

1. SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concept. *J Periodontol* 1992; 63: 322-31.
2. HAFFAJEE AD. AND SOCRANSKY SS. Microbial etiologic agents in destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000; 5: 78-111.
3. PAGE RC. The Pathobiology of periodontal Diseases by Affect Systemic Diseases: Inversion of a Paradigm. *Annals of Periodontology* 1998;3:108-20.
4. PAGE RC. Oral health - systemic health: A two-way street *J Clin Periodont* 2000; 27: (Suppl): 13.
5. LINDHE J. Is periodontitis a unique disease entity? *J Clin Periodont* 2000; 27:(Suppl): 11.
6. CONTRERAS A, SLOTS J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodont Res* 2000; 35: 3-16.
7. ZAMBON JJ. Principles of Evaluation of the Diagnostic Value of Subgingival Bacteria. *Annals of Periodontology* 1997; 2: 138-48.
8. LISTGARTEN MA. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. *J Periodontol* 1992; 63: 332-7.
9. WEXLER HM, DOERN GV. Susceptibility testing of anaerobic bacteria, u: Murray et al. *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington DC, 1995: 1350-5.
10. LOESCHE WJ, LOPATIN DE, GIORDANO J et al. Comparison of the benzoyl-DL-arginine naphthylamide (BANA) test, DNA probes and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 427-33.
11. MOORE WEC. Microbiology of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1987; 22:335-41.
12. SLOTS J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *J Clin Microbiol* 1982; 15: 606-9.
13. SLOTS J, TING M. Microbiological diagnostics in periodontitis. *Compend Contin Educ Dent* 1997; 18: 861-76.
14. NEWMAN MG, SANZ M. Advanced diagnostic techniques. U: Carranza FA Jr, Newman MG. *Clinical Periodontology*, 8 th edition. Philadelphia: WB Saunders Co., 1996.
15. DEWHIRST FE, PASTER BJ. DNA probe analyses for the detection of periodontopathic bacteria in clinical samples. *Quintessence* pp. 1991;367-77.
16. SOCRANSKY SS, SMITH C, MARTIN L. et al. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17:788-92.
17. GRIFFEN AL, LEYS EJ, FUERST PA. Strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* using the polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1992;43:147-55.
18. BURSTAIN JM, GRIMPREL E, LUKEHART SA et al. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 29: 62-9.