

# Mikrobiološka dijagnostika u parodontologiji

Dominik Štajdohar<sup>1</sup>  
dr. sc. Larisa Musić<sup>2</sup>

[1] student 4. godine, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

[2] Zavod za parodontologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Današnji pristup terapiji bakterijskih bolesti uključuje najčešće jedan od dva smjera liječenja: kauzalno i simptomatsko. Mikrobiološka dijagnostika kao klinički alat za dijagnosticiranje uzročnika i primjenu adekvatne antibiotske terapije ipak (još uvijek) nije svakodnevni postupak u dentalnoj medicini. Antibiotska terapija najčešće se propisuje empirijski (iskustveno). Ima li, međutim, i koja je uloga mikrobiološke dijagnostike u kauzalnom parodontološkom liječenju?

Parodontitis je multifaktorijska bolest koja nastaje uslijed bakterijske disbioze u osjetljivog domaćina (1, 2). Kauzalno parodontološko liječenje (i.e. inicijalna, nekirurška parodontološka terapija) uključuje mehaničku instrumentaciju površine korijena zuba. Ta vrsta terapije smatra se **zlatnim standardom** u liječenju. Valja naglasiti da je antibiotska terapija u liječenju parodontitisa samo dodatan oblik terapije koji, ako se primjenjuje, slijedi tek **po završetku** mehaničke instrumentacije (o indikacijama dalje u tekstu). U većini slučajeva inicijalnom se terapijom postižu željeni rezultati kroz kontrolu infekcije, i.e. značajna redukcija broja parodontopatogena čime se eliminira prisutnost upale (3). Bez upotrebe antibiotika njome se postiže redukcija dubine džepova od 1 – 1.7 mm i zatvaranje do 74% džepova (4). Valja napomenuti da su posljednje Smjernice u liječenju parodontitisa stadija I – III jasno definirale da se rutinska upotreba antibiotika kao dodatne terapije uz nekirurško liječenje **ne** preporučuje, već se njihova upotreba može razmotriti u pojedinim kategorijama pacijenata (pa-

cijenti mlađe dobi s generaliziranim parodontitisom stadij III) (5).

Kod pacijenata kod kojih je izostao uspjeh nekirurške terapije te je prisutna progresija bolesti, mikrobiološka dijagnostiku može pružiti vrijedne informacije o uzročnicima. Nadalje, mješoviti biofilm sadrži bakterije koje se, između ostalog, razlikuju i u svojoj osjetljivosti na različite antibiotike, a ta saznanja mogu pomoći u individualiziranijem propisivanju antibiotika.

## Kako se uzima uzorak za mikrobiološku analizu?

Prikupljanje uzoraka subgingivnog plaka možemo izvršiti kiretama ili endodontskim papirnatim štapićima. Svaka od metoda ima svoje indikacije i varira u rezultatima. Npr. kirete će skupiti sav plak iz džepa, dok će štapić upiti samo površinski sloj (za koji se smatra da sadrži više patogena). Način uzorkovanja odabire kliničar ili se vodi preporukama institucije koja vrši analizu. Ako je namjera sakupiti plak smješten u apikalnijem području, kireta se smatra boljim instrumentom za sakupljanje uzorka od štapića. Uzorkovanje mora biti provedeno što opreznije kako bi se spriječila njegova kontaminacija. Stoga se mjesto s kojeg se uzima uzorak najprije očisti od supragingivnih naslaga i osuši. Zatim se, u slučaju da se koristi *paper point*, štapić uvodi do dna džepa te ostavi u džepu 10 sekundi, ili prema preporukama koje je dao laboratorij za analizu ili proizvođač korištenog komercijalnog testa. Štapić se pažljivo izvadi i odloži u sterilnu epruvetu s ili bez transportnog medija, ovisno o

metodi koju će koristiti laboratorij (6, 7) samples were taken first with a paper point and then with a curet at the same site (single-rooted teeth with probing depth >5 mm).

Video snimku načina uzorkovanja za analizu koja se vrši komercijalnim testom PET test (MIP Pharma GmbH, Blieskastel, Njemačka) možete pogledati skeniranjem QR koda koji se nalazi u sklopu članka.



QR kod. Skenirajte mobitelom za pogled video snimke uzimanja mikrobiološkog uzorka. Alternativno, unesite sljedeću poveznicu u internet preglednik: <https://www.youtube.com/watch?v=k98U9PrbOSI>

## Koje su postojeće metode za analizu mikrobioloških uzoraka?

Do danas je razvijeno više metoda laboratorijskih metoda za analizu uzorka biofilma. One uključuju mikroskopiju tamnog polja/fazni kontrast, bakterijske kulture, enzimatske i imunološke testove, testove za nukleinske kiseline i PCR (8, 9).

Prednost mikroskopije je što se ona u teoriji može izvoditi u samoj ordinaciji (ako ordinacija posjeduje mikroskop) i ne

zahtijeva posebna bojanja preparata. Tim postupkom promatraju se samo oblici bakterija i mogućnost njihove migracije stoga se ne mogu utvrditi točne vrste, no može se odrediti aktivnost džepa. Prisutnost nepomičnih koka i štapića govori u prilog manje, a spirohetaveće aktivnosti džepa. Kako ova metoda dijagnostike ne pomaže u određivanju antimikrobnog sredstva i predviđanju tijeka bolesti, nije u uobičajenoj primjeni. Jedna od njenih mogućih prednosti jest motivacija pacijenta kroz vizualni prikaz bakterija u vidnom polju mikroskopa (10, 11).

Kultiviranje bakterija smatra se zlatnim standardom u mikrobiologiji, no ova metoda ima i značajne prepreke za primjenu u parodontologiji. Njome se može odrediti i osjetljivost bakterija na antimikrobne lijekove što uvelike pomaže u daljnjoj terapiji. Ipak, kultivacija parodontopatogenih bakterija koje su ponajviše anaerobi predstavlja problem u vidu uzimanja, skladištenja i transporta uzoraka. Kolonije pojedinih vrsta dugo rastu te se vrlo teško uzgajaju na hranilištima (npr. spirohete). Kada uračunamo velike troškove, vrijeme i teškoću izolacije uzročnika ova metoda možda i nije najbolje rješenje (12, 13).

Bakterije koje sadrže enzim nalik tripsinu mogu se dokazati enzimatskim testovima (BANA test). Mehanizam testa je promjena boje papira impregniranog s N-benzoil-DL-arginin-2-naftilamidom (BANA) koji mijenja boju iz bezbojne u tamno plavu u ovisnosti o količini bakterija. Na tržištu je više testova različitih proizvođača, stoga se potrebno držati uputa tijekom testiranja. Sama reakcija traje 15-ak minuta i odvija se na 37°C u posebnim bočicama s reagensima. Test može biti negativan, slabo ili jako pozitivan što se procjenjuje intenzitetom boje. Relativno je lako izvediv, no ima i svoje nedostatke. Kako je cilj testa dokazati prisutnost (samo) *T. denticole*, *T.*

*forsythenis* i *P. gingivalis* lažno pozitivni rezultati koje daju neki manje patogeni organizmi smetaju dijagnostici, stoga ga je bolje koristiti u kombinaciji s još nekim metodama (14–16).

Imunološke metode daju ipak nešto više specifičnosti. U njih pripadaju testovi kao što je lateks aglutinacija, ELISA ili imunofluorescencija. Sve one se zasnivaju na reakciji antigen-antitijelo u kojemu je jedno od antitijela označeno. Na taj način dolazi u konačnici do uočavanja promjenljive boje ako reakcija zadovoljava. ELISA je jedna od jednostavnijih metoda za izvedbu. Ovisno o načinu izvođenja radi se o „antigen capture“ ili „antibody capture“. Princip je sličan, a za izvođenje su potrebne obilježene podloge i set reagensa s antitijelima. Ovi testovi su jeftini, brzi i specifični na određene mikroorganizme. Nažalost, njihova dostupnost za ordinacije je upitna.

Molekularnobiološke se metode također smatraju visoko osjetljivima. U tom području danas se primjenjuju testovi hibridizacije nukleinskih kiselina i PCR.


Hibridizacija je zasnovana na sparivanju oligonukleotidnih ulomaka označenih radioaktivnim ili enzimatskim markerom s bakterijskim. Nakon razdvajanja i fragmentacije, bakterijska DNA (odnosno RNA) fiksira se za membranu te ju se izloži označenim ulomcima. Slijedi ispiranje nevezanih proba te analiza. Za ovu metodu nisu potrebne žive bakterije što je velika prednost, posebno u uvjetima duljeg transporta.

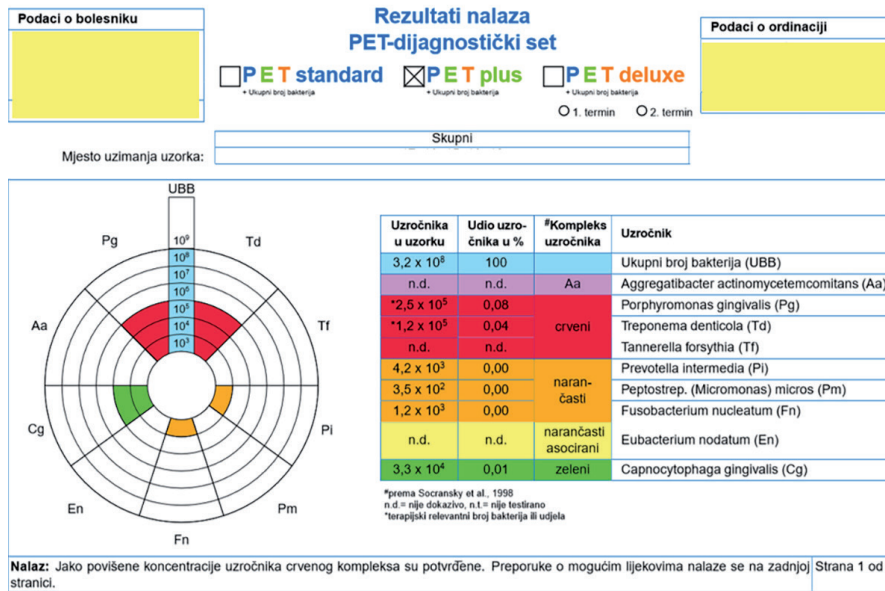
Lančana reakcija polimeraze ili PCR (engl. *polymerase chain reaction*) najosjetljiviji je od svih testova. Radi se metodi umnožavanja DNA u velik broj kopija pa čak i kad je uzorak veoma mali. DNA se razdvaja na visokoj temperaturi, veže s primerima i pomoću polimeraze otporne na toplinu udvostručuje. Tako dobivamo veću količinu DNA koja olakšava daljnju

analizu.

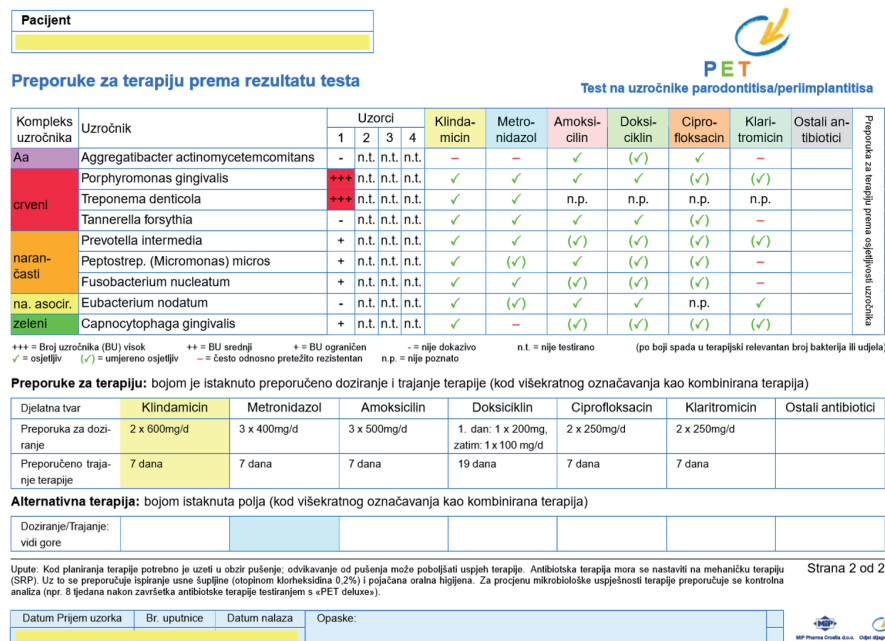
Ove zadnje dvije metode zahtjevnije su za izvođenje i vrše ih posebni laboratoriji. Rezultati su vrlo informativni. Rezultati daju podatak o broju bakterija u džepu (*real-time* PCR) i njihov udio u %. Uzorci i analiza može se učiniti za pojedini džep ili se uzorak može uzeti iz više džepova u ustima (grupni uzorak – najčešće najdublji džep u svako kvadrantu). Pojedine kompanije koje vrše taj tip analize sugeriraju i potrebu za antibiotikom te odabir antibiotika s obzirom na bakterijski sastav (17, 18). Primjer rezultata dobivenih ovim tipom analize prije i nakon terapije prikazan je na Slikama 1 i 2.

Zaključno, više je različitih metoda za mikrobiološku analizu koje se mogu primijeniti u kliničkom radu u parodontologiji. U liječenju kompleksnijih parodontoloških bolesnika i onih koji ne pokazuju znakove poboljšanja samom mehaničkom terapijom, treba razmisliti o korištenju ovih metoda, između ostalog iu svrhu individualiziranijeg antimikrobnog liječenja.

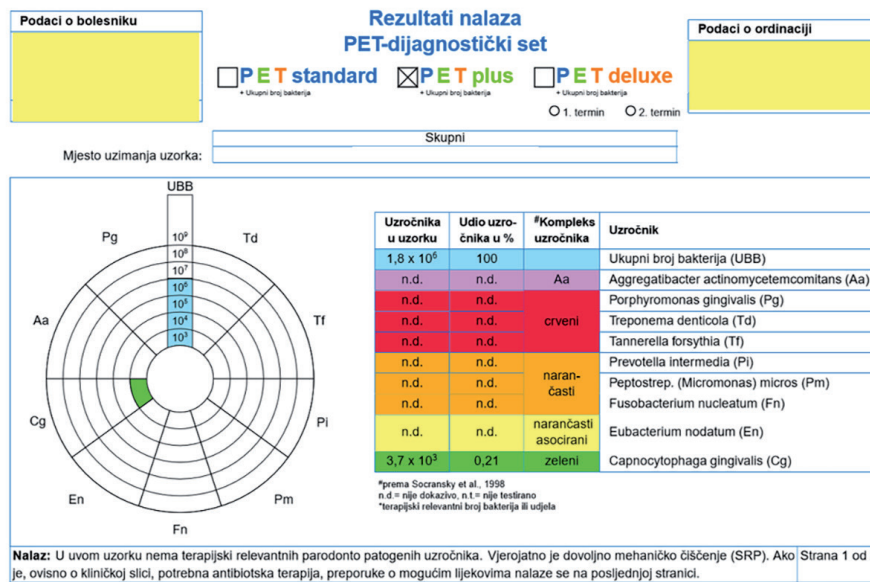
**Napomena:** Odabir i prikaz rezultata korištenog komercijalnog *real-time* PCR testa temeljeni su isključivo na njegovoj upotrebi na Zavodu za parodontologiju. Autori članka nisu ni na koji način povezani s proizvođačem testa. 



**Slika 1.** Rezultati mikrobiološke real-time PCR analize subgingivnog uzorka prije provedene nekirurške parodontološke terapije (prvi pregled – rujan 2020.) Koršten je PET test (MIP Pharma GmbH, Blieskastel, Njemačka). Nalaz ustupila dr. Musić.



**Slika 2.** Preporuke za antibiotsku terapiju prema rezultatu analize. Kliničar procjenjuje potrebu za dodatnom antibiotskom terapijom uz nekirurško liječenje (indikacije su veoma ograničene – konzultirati tekst članka).



**Slika 3.** Rezultati mikrobiološke real-time PCR analize subgingivnog uzorka nakon provedene nekirurške parodontološke terapije (re-evaluacija – prosinac 2020.) Vidljiva je značajna razlika u količini i udjelu prisutnih parodontopatogena. Nalaz ustupila dr. Musić.

## LITERATURA

- Socransky SS, Haffajee AD. The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts. *Journal of Periodontology*. 1992 Apr;63(4s):322–31.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134–44.
- Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol* 2000. 2017 Oct;75(1):152–88.
- Suvan J, Leira Y, Moreno Sancho FM, Graziani F, Derks J, Tomasi C. Subgingival instrumentation for treatment of periodontitis. A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2020 Jul;47(S22):155–75.
- Sanz M, Herrera D, Kerschull M, Chapple I, Jepsen S, Beglundh T, et al. Treatment of stage I–III periodontitis—The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*. 2020 Jul;47(S22):4–60.
- Jervøe-Storm P-M, Alahdab H, Koltzsch M, Fimmers R, Jepsen S. Comparison of curet and paper point sampling of subgingival bacteria as analyzed by real-time

- polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2007 May;78(5):909–17.
- Renvert S, Wikström M, Helmersson M, Dahlén G, Claffey N. Comparative study of subgingival microbiological sampling techniques. *J Periodontol*. 1992 Oct;63(10):797–801.
- Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2004;34:49–56.
- Listgarten MA. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. *J Periodontol*. 1992 Apr;63(4 Suppl):332–7.
- Listgarten MA, Schifter C. Differential dark field microscopy of subgingival bacteria as an aid in selecting recall intervals: results after 18 months. *J Clin Periodontol*. 1982 Jul;9(4):305–16.
- Greenstein G, Polson A. Microscopic monitoring of pathogens associated with periodontal diseases. A review. *J Periodontol*. 1985 Dec;56(12):740–7.
- Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*. 2002 Jul;29(7):638–44.
- Rosenberg ES, Torosian JP, Hammond BF, Cutler SA. Routine anaerobic bacterial cul-

- ture and systemic antibiotic usage in the treatment of adult periodontitis: a 6-year longitudinal study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1993;13(3):213–43.
- Bretz WA, Lopatin DE, Loesche WJ. Benzoyl-arginine naphthylamide (BANA) hydrolysis by *Treponema denticola* and/or *Bacteroides gingivalis* in periodontal plaques. *Oral Microbiol Immunol*. 1990 Oct;5(5):275–9.
- Loesche WJ, Kazor CE, Taylor GW. The optimization of the BANA test as a screening instrument for gingivitis among subjects seeking dental treatment. *J Clin Periodontol*. 1997 Oct;24(10):718–26.
- Kozlovsky A, Gordon D, Gelernter I, Loesche W, Rosenberg M. Correlation between the BANA Test and Oral Malodor Parameters. *J Dent Res*. 1994 May;73(5):1036–42.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006 Jun;27(2–3):95–125.
- Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics*. 2007 Jun;8(4):234–51.