

Mikrobiološka dijagnostika u parodontologiji

Marijana Bićanić¹

Domagoj Vražić, dr.dent.med.², Prof.dr.sc. Darije Plančak²

[1] studentica 4. godine

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

Parodont, s glavnom funkcijom u pričvršćivanju zuba uz koštano tkivo čeljusti i zadržavanju integriteta površine mastikatorne sluznice usne šupljine, podložan je razaranju od strane različitih mikrobnih patogena. Parodontne bolesti i karijes najraširenije su bolesti današnjice. Najvažniji etiološki čimbenik za njihov nastanak jest zubni plak, ali i mnogi čimbenici okoline, sistemske bolesti, kao i vlastita, genetska sklonost. Dodatno su komplicirane mogućnošću prijenosa: vertikalnog (prijenos s roditelja na dijete) i horizontalnog (prijenos mikroorganizma između pojedinaca izvan veze roditelj - dijete) (1). U slučaju parodontnih promjena potrebni su nalazi kojima ćemo utvrditi dijagnozu i prognozu bolesti. Nalaze čini medicinska i stomatološka

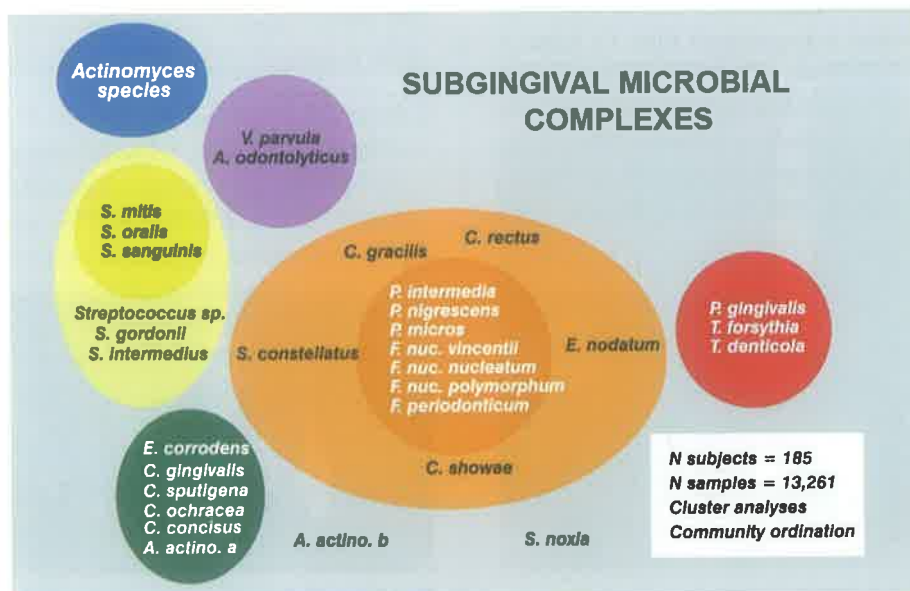
anamneza, klinički pregled te rendgenska dokumentacija.

Kod težih slučajeva, onih koje je prognostički teško procijeniti, potrebna je daljnja obrada i dodatna dijagnostika koja između ostalog uključuje mikrobiološke testove. Mikrobiološkim postupcima otkrivamo broj i vrstu glavnih parodontopatogenih bakterija – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* – članove tzv. crvenog kompleksa i mnoge druge (slika 1). Stoga su mikrobiološki testovi indicirani kod agresivnih parodontitisa, refraktornih oblika i u pacijenata kod kojih je težak parodontitis povezan sa sistemskim bolestima (2). Primarni parodontopatogeni, pretežno anaerobi, vrlo su agresivni i pa-

togeni. To potvrđuje i studija koja pokazuje da su i nakon vađenja svih zubi ovi mikroorganizmi i dalje perzistirali u flori usne šupljine. Uglavnom su se zadržali na jeziku i u slini u niskim koncentracijama. Reduciran je broj A.a. i *P. intermedia*, a još izrazitija redukcija bila je za *P. gingivalis*, odnosno *T. forsythia* koja nestaje u bezubim ustima. Problem nastaje kada u takvim bezubim ustima postavimo implantate. Rezultat je velika mogućnost nastanka periimplantitisa jer su time ponovno stvoreni pogodni okolišni uvjeti za njihovo umnožavanje (3).

Prisutnost specifičnih mikroorganizama smatra se sekundarnim obilježjem agresivnog parodontitisa. Sistematizirani pregled literature jasno ukazuje da se na temelju prisutnosti ili odsutnosti specifičnih parodontopatogena kao npr. A.a. ne može u potpunosti diferencirati pacijente s agresivnim parodontitisom od pacijenata s kroničnim parodontitisom. Kod pacijenata koji nemaju A.a. je 10 puta vjerojatnije da boluju od kroničnog nego od agresivnog parodontitisa, dok je kod pacijenata koji imaju A.a. samo 3 puta vjerojatnije da boluju od kroničnog oblika bolesti (1).

Iako samo mikrobiološko testiranje ne može razlučiti kronični od agresivnog parodontitisa, nalaz koji pritom dobijemo može poboljšati krajnji ishod terapije, te ukazivati na potrebu dodatka konvencionalnoj terapiji u vidu antibiotika i izbora antimikrobnog lijeka. Interventne studije sugeriraju da je A.a. iznimno teško suzbijati klasičnom mehaničkom terapijom (1). Mikrobiološka informacija stoga može biti korisna u različitim fazama terapije,



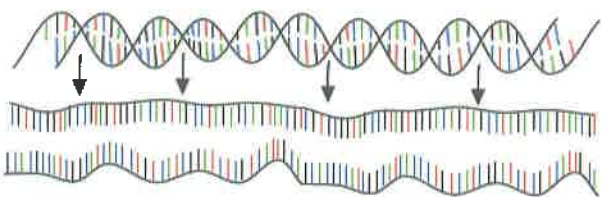
Slika 1. Dijagram povezanosti bakterijskih vrsta, adaptirano prema Socransky et al. 1998. (preuzeto iz 1)

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

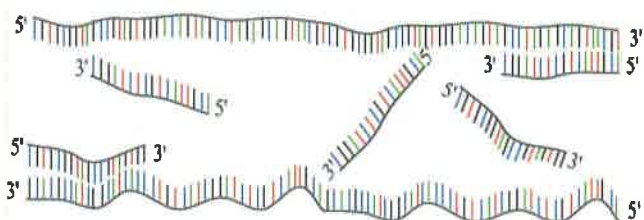
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

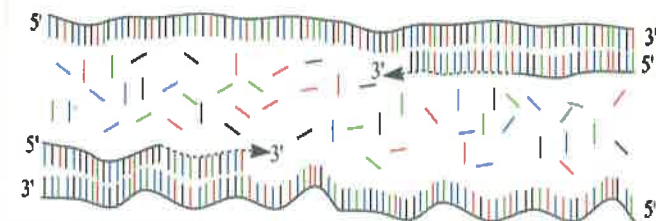
45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C
only dNTP's



(Andy Vierstraete 1999)

Slika 2. Izvođenje PCR

kao npr. kod početne dijagnoze, kod reevaluacije i faze recall-a.

Mikrobiološke pretrage imaju veliku važnost u procjeni potrebe nadopune mehaničke terapije antibiotikom te u procjeni učinka liječenja. Metode koje se koriste:

1. Tehnika kultivacije mikroorganizama
2. Tehnika direktnih razmaza
3. DNA ili RNA testovi
4. Imunološka ispitivanja
5. Biokemijska ispitivanja

Tehnika kultivacije mikroorganizama

Tehnika kultivacije je referentna metoda za određivanje sastava bakterijskog plaka. Omogućuje identifikaciju glavnih komponenti i njihovu osjetljivost na antibiotike in vitro. Predstavlja smjernice za utvrđivanje razine patogenosti mikroorganizama u niskom, srednjem ili visokom riziku za pacijente. Tehnika kultivacije je vrijedna u bolesnika koji ne odgovaraju na konvenci-

onalnu terapiju i njome možemo usmjeriti antibiotiku terapiju. Ova mikrobiološka tehnika zahtjeva vrijeme, mikrobiološko znanje te potrebnu laboratorijsku opremu. Rezultati se dobiju nakon 3 tjedna. Prednost kultivacije je mogućnost izvođenja antibiograma čime dobivamo saznanje na koji je antibiotik određena bakterija osjetljiva ili rezistentna.

Materijal za kultivaciju uzima se iz usne šupljine najčešće sterilnim papirnatim štapićem srednje tvrdoće, zatim struganjem instrumentima ili skalpelom, upotrebom zubne svile, skupljanjem uzoraka sline i ispirkom iz usta. Prije toga je područje uzimanja potrebno očistiti od supragingivnog plaka i posušiti. Štapić se uvodi do dna džepa i drži 10 sekundi. Kod odstranjivanja ne smije doći u dodir s okolnom sluznicom, slinom ili gnojem. Može se uzeti samo jedan uzorak za specifičnu stranu, ali možemo uzeti i više uzoraka iz najdubljeg džepa za svaki kvadrant ili više

uzoraka iz različitih džepova. Bitno je za-bilježiti mjesto i datum uzimanja uzorka. Dobiveni se uzorci nasađuju na obogaćene i selektivne podloge (2).

U obogaćene podloge ubrajamo moždano-srčani agar, triptoza-soja agar i srčani agar, druge jednostavne ili poboljšane podloge s 10% ili 5% defibrinirane ovčje, kuničje ili konjske krvi. Njihovom upotrebom dobivamo ukupan broj kultiviranih mikroorganizama ili jedinica koje formiraju kolonije. Bolje su od selektivnih jer omogućuju rast većeg broja specifičnih mikroorganizama.

Selektivne podloge jesu manitol slani agar, Ragosa SL agar, Sabouraud agar, Nickerson agar, mitis-salivarius agar s teluritom, triptoza-soja s krvlju, mendi-onom, Kanamicinom, Vankomicinom, i drugi. Ove se podloge upotrebljavaju za određivanje broja živih bakterijskih stanica ili jedinica koji formiraju kolonije specifične vrste mikroorganizama kao što su parodontopatogeni mikroorganizmi (4).

Tehnika direktnih razmaza

Ovom tehnikom možemo odrediti morfološku diferencijaciju bakterija i drugih mikroorganizama u usnoj šupljini. Za gledanje pod svjetlosnim mikroskopom potrebno je bojanje preparata za što postoje mnoge mono- i polikromatske metode.

Korištenje mikroskopije tamnog polja faznim kontrastom vrlo je jednostavno i brzo, ne zahtijeva bojenje ni fiksaciju. Isto tako, mogu se odrediti samo morfotipovi, odnosno oblik bakterije i njena pomičnost. Pritom, pretežno koki i nepomični štapići govore o manje aktivnoj patogenoj flori. Međutim, veliki broj pomičnih bakterija (spiroheta i štapića) govori o aktivnosti džepa odnosno aktivnoj patogenoj flori. Ovom metodom možemo značajno motivirati pacijenta prikažemo li mu na ekranu pomične bakterije i jedina je metoda kojom se mogu promatrati živi mikroorganizmi, uključujući brojne vrste spiroheta koje zbog izuzetno teške kultivacije još nisu identificirane.

Molekularnobiološki testovi

1. DNA testovi – lančana reakcija polimeraze, hibridizacija DNA probama
2. RNA/DNA testovi – IAI PadoTest



Slika 3. Uređaj za izvođenje PCR testa

Lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Koristi se za povećanje broja kopija određenog dijela DNA, tako da dobijemo dovoljnu količinu DNA za dokazivanje prisutnosti određenog uzročnika. Ova metoda može detektirati prisutnost izuzetno malog broja mikroorganizama u uzorku plaka. Provodi se na sljedeći način (slika 2):

- razdvajanje DNA lanca iz dvostruke uzvojnice na temperaturi 90-95°C u jednostruke lance
- vezanje primera na određenoj lokaciji na lancu DNA pri temperaturi od 40-60°C
- polimeraza udvostručuje sekvencu koristeći svaki lanac kao uzorak pri temperaturi od 70-75°C
- podizanje temperature na 90-95° i ponavljanje cijelog procesa kako bi se multiplicirali ciljani DNA segmenti (2)

Ova je metoda vrlo učinkovita, omogućuje otkrivanje i identifikaciju specifičnih parodontopatogenih bakterija u jednom danu (slika 3). Ciklusi su brzi i mogu se ponavljati, pa je moguće u nekoliko sati dobiti milijun kopija DNA lanca. Usporedbom PCR tehnike otkrivanja parodontopatogena i otkrivanja istih tehnikom kultiviranja, utvrđena je češća identifikacija *P. gingivalis* i *T. forsythia* PCR metodom nego kultivacijom. Stoga se smatra da bi se kultivacija trebala zamijeniti molekularnobiološkim testovima te bi oni trebali postati zlatni standard u dijagnostici (4).

Hibridizacija DNA probama

DNA probe utvrđuju specifične sekvence na DNA i omogućuju identifikaciju mikroorganizma. Postupak izvođenja je sljedeći:

- bakterije se razgrađuju
- dvostruki lanci DNA se razdvajaju
- pojedinačni se lanci fragmentiraju i fiksiraju na membranu
- označene genske probe nalaze komplementarne dijelove na ciljnoj DNA i s njima se hibridiziraju

Dokaz se postiže autoradiografski ili enzimatski (slika 4). Ova je tehnika osjetljivija nego tehnika kultiviranja. Može detektirati 10^3 mikroba. Testovi u upotrebi su DMDy-Patho test, Meridol test DNS probama 3/8, MicroDent test te Perio Bac test. Testovi su ograničeni na otkrivanje sedam mikroorganizama: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. a.*, *T. denticola*, *E. corrodens*, *C. rectus* i *F. nucleatum*.

Dobiveni rezultati raspoređuju se potom u tri grupe:

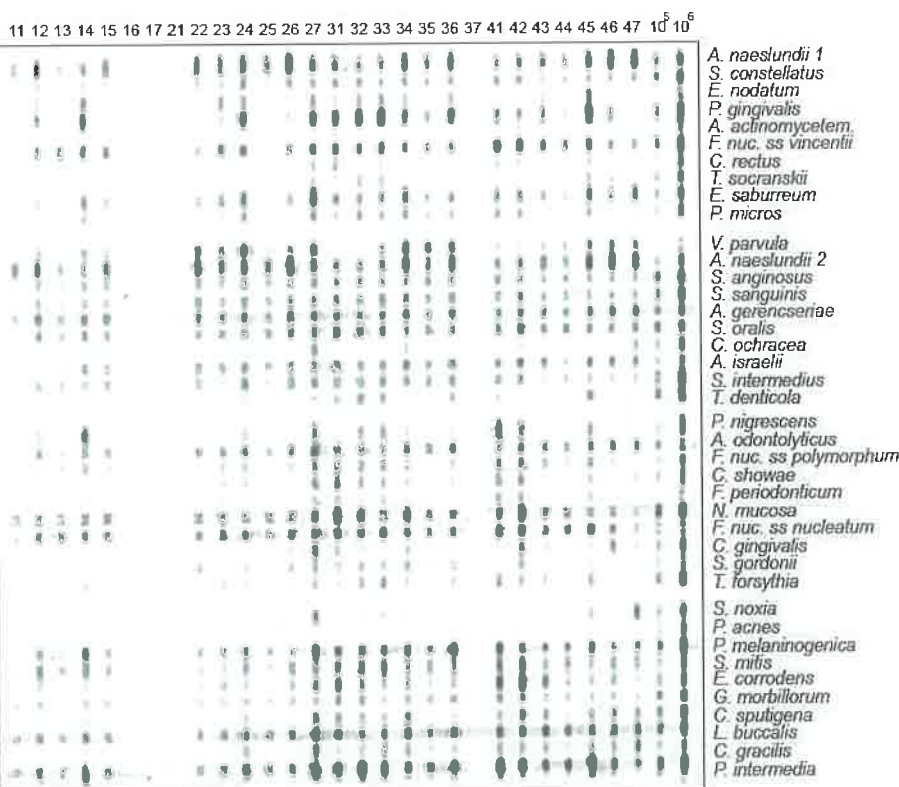
- niski rizik - do 10^3 mikroba
- srednji rizik - 10^3 - 10^4 mikroba
- visoki rizik - više od 10^5 mikroba.

IAI PadoTest

Ovim se testom mogu dokazati *A. a.*, *T. forsythia*, *P. gingivalis* i *T. denticola*. Uzima se uzorak subgingivnog plaka sterilnim papirnatim štapićem iz najdublje džepa, zatim se stavi u prienosni spremnik (epruvetu) koji se čvrsto zatvori. Ukoliko se radi DNA test, papirnat štapić stavljamo u praznu, suhu epruvetu. Ako radimo rRNA test, potrebna je stabilizacijska tekućina u epruveti jer je rRNA kemijski osjetljiva. Uzorci se šalju na analizu u specijalizirani laboratorij. Rezultati su gotovi unutar nekoliko dana. Dobivamo podatke o broju i udjelu glavnih bakterija, ukupnom udjelu svih bakterija, statističku usporedbu tih rezultata i tipizaciju džepova.

Imunološka ispitivanja

Ovi se testovi temelje na reakciji antigen-antitijelo. Korisni su za identifikaciju specifičnih bakterija određivanjem nivoa antitijela na određene patogene. Imunološko detektiranje bakterija pro-



Slika 4. „Checkerboard“ DNA-DNA hibridizacija - metoda korištena pri detekciji 40 različitih bakterijskih vrsta na uzorku od 28 subgingivnih mjesta s plakom kod jednog pacijenta (preuzeto iz 1)

vodi se pomoću specifičnih antigenskih površinskih markera na koje se veže specifično monoklonalno antitijelo. Da bi reakcija bila vidljiva, antitijela se označavaju tzv. reporter molekulama. To se može učiniti i izlaganjem kompleksa antigen-antitijelo obojenim fluorescentnim tvarima, što predstavlja test imunofluorescencije.

Razlikujemo direktnu i indirektnu imunofluorescenciju. Ona nam omogućuje promatranje reakcije antigen-antitijelo na fluorescentnom mikroskopu. Tim promatranjem obuhvaćene su i mrtve i žive bakterije.

Imunološki su testovi sve više u upotrebi zbog sve veće potrebe preciznih mikrobioloških nalaza, pa se koriste npr. za diferencijaciju serotipova.

ELISA Test

Primarno antitijelo otkriva se kolorimetrijskom reakcijom koja se katalizira putem enzima (peroksidaza) (slika 5). ELISA probe koristile su se za praćenje nivoa antitijela zbog osjetljivosti. Ipak, nisu svi pacijenti pokazivali porast antitijela kada su bili inficirani parodontopatogenima. Nedostatak je tehnike što otkriva samo one vrste za koje postoji specifično antitijelo. Prije se više koristila, sve do razvoja PCR tehnike.

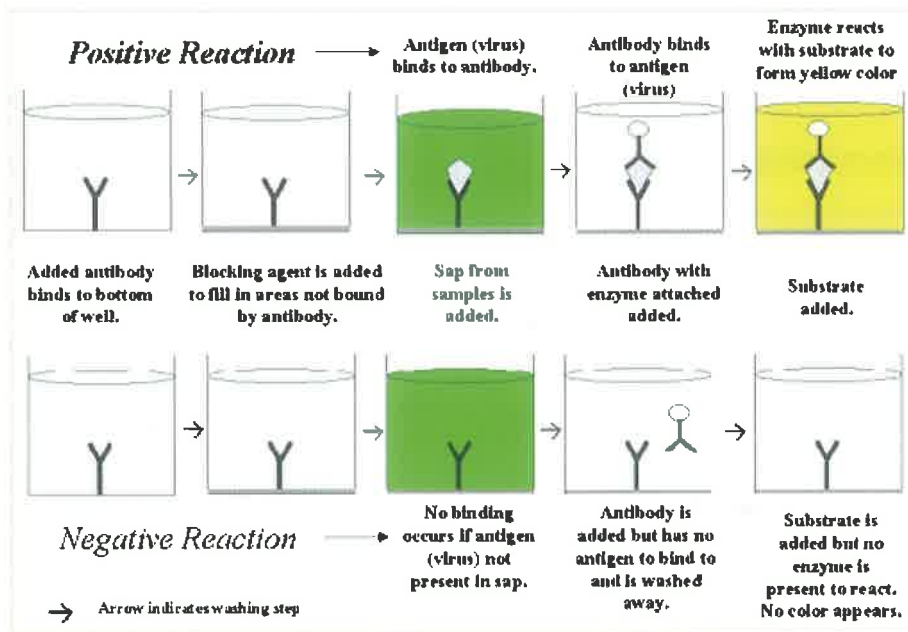
Screening Test (Perioalert)

Ovaj test procjenjuje antitijela na pet patogena. Koristi se uzorak krvi dobiven ubodom u prst. Proizvođač tvrdi da se testom može detektirati imuni odgovor prije manifestacije parodontne bolesti. Na taj je način moguće procijeniti rizik u još zdravih pacijenata, ali test još uvijek nije ušao u rutinsku primjenu.

Biokemijska ispitivanja

Enzimatski bakterijski testovi - BANA Test

Određeni parodontopatogeni mogu razgraditi α -benzoid-DL-arginin-2-naftilamid (BANA) pomoću enzima sličnog tripsinu. Produkt te razgradnje je β -naftilamid koji postaje vidljiv tijekom reakcije i koristi se za dokaz bakterija. Test je jeftin, brz i jednostavan. Ukoliko kao rezultat dobijemo izrazitu pozitivnost, to bi trebao biti znak da je uz mehaničku terapiju




Slika 5. Odvijanje ELISA testa

ju potrebno uvesti i antibiotsku terapiju. Nedostatak BANA-testa je nemogućnost dokazivanja A.a.. Isto tako, druge manje patogene bakterije mogu učiniti test pozitivnim što je dodatni nedostatak. Ovaj test nije više u komercijalnoj upotrebi zbog navedenih nedostataka (2).

Zaključak

A.a. i *P. gingivalis* mogu biti preneseni od strane parodontoloških pacijenata na članove svoje obitelji. Stoga bi mikrobiološko testiranje supružnika, djece ili braće i sestara od pacijenata s agresivnim parodontitisom moglo biti indicirano kako bi rano dijagnosticirali bolest kod podložnih pojedinaca (1).

Sve navedene tehnike mikrobiološke dijagnostike od velike su koristi u pronalaženju uzročnika parodontnih bolesti, u usmjerjenju antibiotske terapije, kao i u praćenju učinkovitosti liječenja i prognoze bolesti. Kao zlatni standard još se uvijek smatra i koristi tehnika kultivacije mikroorganizama na podlogama. Međutim, sve veći značaj u parodontologiji, a time i prednost i potrebu korištenja kao zlatnog standarda, zauzimaju molekularnobiološke tehnike (DNA probe i PCR). Za razliku od njih, imunološke metode su najbrže, ali preskupe i dostupne samo dobro opremljenim laboratorijima. 

REFERENCJE

- Lindhe J, Lang N P, Karring T. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2008.
- Wolf H F, Rateitschak-Plüss E M, Rateitschak K H. Parodontologija: Stomatološki atlas. 3. prerađeno i prošireno izdanje. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2009.
- Van Assche N, Van Essche M, Pauwels M, Teughels W, Quirynen M. Do periodontopathogens disappear after full-mouth tooth extraction? J Clin Periodontol. 2009; 36(12):1043-47.
- Kolega D. Mikrobiološka dijagnostika rapidno progresivnog parodontitisa: Diplomski rad. Zagreb: Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2000.