

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Eva SODJA

**PRIMERJAVA KLASIČNE BAKTERIOLOŠKE
DIAGNOSTIKE IN MOLEKULARNE METODE ZA
DOKAZOVANJE PARODONTOPATOGENIH
BAKTERIJ V VZORCIH IZ PARODONTALNIH
ŽEPOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Eva SODJA

**PRIMERJAVA KLASIČNE BAKTERIOLOŠKE DIAGNOSTIKE IN
MOLEKULARNE METODE ZA DOKAZOVANJE
PARODONTOPATOGENIH BAKTERIJ V VZORCIH IZ
PARODONTALNIH ŽEPOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF CLASSICAL BACTERIOLOGICAL DIAGNOSIS
AND MOLECULAR METHOD FOR DETECTION OF
PERIODONTOPATHOGENIC BACTERIA IN SAMPLES FROM
PERIODONTAL POCKETS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih okužb in v Laboratoriju za molekularno biologijo in diagnostiko hepatitsa in aidsa Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Katjo Seme, dr.med. in za recenzenta prof. dr. Maria Poljaka, dr. med.

Mentorica: doc. dr. Katja Seme, dr. med.

Recenzent: prof. dr. Mario Poljak, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: Prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: Doc. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: Prof. dr. Mario POLJAK, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Eva Sodja

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 616.314-078:579.08:577.2.08(043)=863
KG klasična bakteriološka diagnostika/molekularna bakteriološka diagnostika/
parodontitis/ parodontopatogene bakterije
AV SODJA, Eva
SA SEME, Katja (mentorica)/POLJAK, Mario (rezendent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija
mikrobiologije
LI 2006
IN PRIMERJAVA KLASIČNE BAKTERIOLOŠKE DIAGNOSTIKE IN
MOLEKULARNE METODE ZA DOLOČANJE PARODONOTPATOGENIH
BAKTERIJ V VZORCIH IZ PARODONTALNIH ŽEPOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIII, 94 str., 15 pregl., 20 sl., 112 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Prevalenca parodontitisa in drugih parodontalnih bolezni s starostjo narašča in zaradi staranja populacije se bo število posameznikov s parodontitism v nekaj naslednjih desetletjih povečalo. Tako bo parodontitis postal eden izmed glavnih izgube zob pri odraslih po 35. letu starosti. Za razvoj parodontitisa so vedno potrebne parodontopatogene bakterije, medtem ko ostali dejavniki, kot so kajenje, genetska predispozicija, slaba ustna higiena, sistemske bolezni in stres, vplivajo na resnost bolezni in njen odziv na zdravljenje. Mikrobiološka diagnostika kot pomoč pri zdravljenju parodontitisa je relativno nov vendar hitro se razvijajoč koncept v dentalni medicini. Zaradi številnih slabosti klasične bakteriološke diagnostike se razvijajo molekularne metode. V diplomski nalogi smo primerjali klasično kultivacijo vzorca ter osamitev in identifikacijo in molekularno metodo micro-IDent (Hain Lifescience, Nehren, Nemčija) za dokazovanje parodontopatogenih bakterij v vzorcih iz parodontalnih žepov. V raziskavo smo vključili 65 vzorcev iz parodontalnih žepov in 34 vzorcev sline, ki so bili odvzeti 16 bolnikom s parodontitism pred in po mehanskem zdravljenju. Molekularna metoda se je izkazala za hitrešo, bolj občutljivo in preprostejšo možnost dokazovanja parodontopatogenih bakterij. Najboljše ujemanje rezultatov obeh metod smo zasledili za bakterijo *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Klasična diagnostika se je izkazala za nezanesljivo v osamitvi vrste *Porphyromonas gingivalis* iz vzorcev in v razlikovanju vrste *Prevotella intermedia* od sorodne vrste *Prevotella nigrescens*. Pred mehanskim zdravljenjem smo z molekularno metodo dokazali *Bacteroides forsythus* pri 93,8 %, *Treponema denticola* pri 75 %, *P. gingivalis* pri 68,8 %, *A. actinomycetemcomitans* pri 50 % in *P. intermedia* pri 31,3 % vseh bolnikov. Mehansko zdravljenje je uspešno znižalo delež pozitivnih vzorcev za večino parodontopatogenih bakterij. Izjema je le bakterija *A. actinomycetemcomitans*, ki smo jo po mehanskem zdravljenju dokazali v podoben deležu vzorcev oziroma bolnikov kot pred njim.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 616.314-078:579.08:577.2.08(043)=863
CX classical bacteriological diagnosis/ molecular bacteriological diagnosis/
periodontitis/ periodontopathogenic bacteria
AU SODJA, Eva
AA SEME, Katja (supervisor)/POLJAK, Mario (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in
Microbiology
PY 2006
TI A COMPARISON OF CLASSICAL BACTERIOLOGICAL DIAGNOSIS AND
MOLECULAR METHOD FOR DETECTION OF PERIODONTOPATHOGENIC
BACTERIA IN SAMPLES FROM PERIODONTAL POCKETS
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 94 p., 15 tab., 20 fig., 112 ref
LA sl
AL sl/en
AB The prevalence of periodontitis and other periodontal diseases increases with age and as more people are living longer, the number of people developing periodontitis will increase in the next decades. Periodontitis will become one of the most important causes for tooth loss in people over 35. year of age. For periodontitis to evolve the presence of periodontopathogenic bacteria is always required, while other factors, including smoking, genetic predisposition, poor oral hygiene, systemic diseases and stress, determine the resulting disease severity and less-predictable response to treatment. Microbial identification as an aid to patient management is a relatively new concept in dental medicine. Because of several disadvantages of classical bacteriological diagnosis (culture) the molecular methods are evolving. In the present study classical culture and molecular method micro-IDent (Hain Lifescience, Nehren, Germany) for detection of periodontopathogenic bacteria in samples from periodontal pockets were compared. 65 samples from periodontal pockets and 34 saliva samples, which were obtained from 16 periodontitis patient before and after mechanical treatment were included in the study. Molecular method has proved to be faster, easier and more sensitive option for detection of periodontopathogenic bacteria. The best agreement between two methods was noticed for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Classical bacteriological diagnosis has proved to be unreliable for isolation of *Porphyromonas gingivalis* from samples and in distinguishing of *Prevotella intermedia* from related species *Prevotella nigrescens*. Using molecular method before mechanical treatment the presence of *Bacteroides forsythus* was detected in 93,8 %, *Treponema denticola* in 75 %, *P. gingivalis* in 68,8 %, *A. actinomycetemcomitans* in 50 % and *P. intermedia* in 31,3 % of patients with periodontal disease. Mechanical treatment has successfully lowered the ratio of positive samples for the majority of periodontopathogenic bacteria. The exception is *A. actinomycetemcomitans*, which was detected in comparable percent of samples and patients after mechanical treatment.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NORMALNA MIKROBNA FLORA ČLOVEŠKE USTNE VOTLINE	3
2.1 PARODONTITIS	4
2.1.1 Razvoj zobne obloge in njena kompleksnost	5
2.2.1.1 Nespecifična teorija o razvoju zobne obloge	7
2.2.1.2 Specifična teorija o razvoju zobne obloge	8
2.1.2 Oblike parodontitisa	9
2.1.3 Epidemiologija parodontalnih bolezni	11
2.1.4 Parodontitis je dejavnik tveganja za kardiovaskularno bolezen	11
2.1 OBRAMBA GOSTITELJA	12
2.1.1 Obstojče protimikrobne ovire	12
2.3.1.1 Obrambna vloga sline	12
2.3.1.2 Tkivo dlesni kot oksidativna ovira za anaerobne bakterije	13
2.1.2 Imunski odziv gostitelja	13

2.1.3	Ali je parodontitis deden?	15
2.1	PARODONTOPATOGENE BAKTERIJE	15
2.1.1	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	16
2.1.2	<i>Rodova Prevotella in Porphyromonas</i>	19
2.1.3	<i>Bacteroides forsythus (Tannerella forsythensis)</i>	21
2.1.4	Ustne treponeme	22
2.1.5	Druge parodontopatogene bakterije	23
2.1.6	Mikrobni kompleksi v zobni oblogi	24
2.1.7	Prisotnost parodontopatogenih bakterij v slini	25
2.1	DOKAZOVANJE PARODONTOPATOGENIH BAKTERIJ	26
2.1.1	Odvzem in transport vzorcev	26
2.1.2	Klasična bakteriološka diagnostika parodontopatogenih bakterij	27
2.5.2.1	Gojišča za osamitev parodontopatogenih bakterij	28
2.5.2.2	Identifikacija parodontopatogenih bakterij	29
2.5.2.3	Hitri identifikacijski sistemi	32
2.1.3	Molekularna bakteriološka diagnostika	33
2.5.3.1	Komercialno dostopni molekularni testi	33
2.1	ZDRAVLJENJE PARODONTITISA	35
2.1.1	Tradicionalno mehansko zdravljenje	35
2.1.2	Antibiotično zdravljenje	37
3	MATERIAL IN METODE	38
3.1	MATERIAL	38
3.2	METODE	39
3.2.1	Odvzem, transport in hranjenje vzorcev	39
3.2.2	Obdelava vzorcev za klasično bakteriološko diagnostiko in pogoji inkubacije	40
3.2.3	Klasična bakteriološka diagnostika	40
3.2.3.1	Osamitev parodontopatogenih bakterij	40
3.2.3.2	Identifikacija parodontopatogenih bakterij	41
3.2.4	Molekularna bakteriološka diagnostika	43

3.2.4.1	Izolacija DNK iz vzorcev iz parodontalnih žepov in vzorcev sline	43
3.2.4.2	Izolacija DNK iz po Gramu negativnih bakterij	44
3.2.4.3	Sestava reakcijske mešanice in pogoji PCR	44
3.2.4.4	Dokaz pridelkov PCR z reverzno hibridizacijo	45
3.2.5	Statistična obdelava podatkov	47
4	REZULTATI	48
4.1	Rezultati pred mehanskim zdravljenjem	48
4.1.1	Rezultati klasične bakteriološke diagnostike	48
4.1.2	Rezultati molekularne metode	52
4.2	Rezultati po mehanskem zdravljenju	56
4.2.1	Rezultati klasične bakteriološke diagnostike	56
4.2.2	Rezultati molekularne metode	59
4.3	Uspešnost mehanskega zdravljenja	61
4.4	Primerjava klasične bakteriološke diagnostike in molekularne metode	65
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	68
5.1	RAZPRAVA	68
5.2	SKLEPI	77
6	POVZETEK	78
7	VIRI	80

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Oblike parodontitisa glede na klasifikacijski sistem AAP- angl. American Academy of Periodontology (Loesche in Grossman, 2001)	9
Preglednica 2: Obrambni mehanizmi, ki jih gostitelj razvije kot odgovor na stalno prisotnost velikega števila bakterij v parodontalnem žepu (Loesche in Grossman, 2001)	14
Preglednica 3: Bakterije, ki so vpletene v razvoj parodontitisa	16
Preglednica 4: Pigmentirane vrste iz rodov <i>Prevotella</i> in <i>Porphyromonas</i> , ki jih najdemo v ustni votlini človeka (Jousimies-Somer in sod., 1995)	19
Preglednica 5: Profil občutljivosti posameznih anaerobnih bakterij in bakterijskih skupin za antibiotike vankomicin, kanamicin in kolistin (Jousimies-Somer in sod., 1995)	31
Preglednica 6: Sestava transportnega gojišča VMGA III (Doan in sod., 1999)	38
Preglednica 7: Sestava gojišča KVLB (Summanen in sod., 1993)	39
Preglednica 8: Sestava gojišča Dentaid-1 (Alsina in sod., 2001)	39
Preglednica 9: Pogoji pomnoževanja vrstno značilnih odsekov DNK petih parodontopatogenih bakterij	45
Preglednica 10: Dokazovanje petih parodontopatogenih bakterij z molekularnim testom micro-IDent v 36 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih bolnikom s parodontitisom pred mehanskim zdravljenjem	52

Preglednica 11: Dokazovanje petih parodontopatogenih bakterij z molekularnim testom micro-IDent v 29 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih 15 bolnikom s parodontitisom po mehanskem zdravljenju 59

Preglednica 12: Primerjava dokazovanja parodontopatogenih bakterij s klasično bakteriološko diagnostiko in molekularno metodo micro-IDent pred in po mehanskem zdravljenju pri bolnikih s parodontitisom 62

Preglednica 13: Primerjava dokazovanja parodontopatogenih bakterij s klasično bakteriološko diagnostiko in molekularno metodo micro-IDent pred in po mehanskem zdravljenju za vzorce iz parodontalnih žepov odvzetih bolnikom s parodontitisom 62

Preglednica 14: Primerjava dokazovanja bakterijskih vrst *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in *P. intermedia* v vzorcih iz parodontalnih žepov in vzorcih sline s klasično bakteriološko diagnostiko in molekularnim testom micro-IDent 66

Preglednica 15: Občutljivost, specifičnost in napovedne vrednosti za klasično bakteriološko diagnostiko in molekularni test micro-IDent 67

KAZALO SLIK

Slika 1: Odvzem vzorca iz parodontalnega žepa s papirnatim šilcem (Conrads, 2001)	27
Slika 2: Izolat <i>P. gingivalis</i> osamljen iz vzorca iz parodontalnega žepa 45 ML pri bolniku P6	49
Slika 3: Profil odpornosti izolata <i>P. gingivalis</i> na antibiotike vankomicin, peniclin, kanamicin, rifampin in kolistin	49
Slika 4: Izolat <i>P. intermedia</i> osamljen iz vzorca iz parodontalnega žepa 15 DP pri bolniku P8	49
Slika 5: Profil odpornosti izolata <i>P. intermedia</i> na antibiotike vankomicin, penicilin, kanamicin, rifampin in kolistin	49
Slika 6: Značilna morfologija bakterijskega izolata <i>A. actinomycetemcomitans</i> osamljenega iz vzorca iz parodontalnega žepa 25 DB pri bolniku P16	49
Slika 7: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih s klasično bakteriološko diagnostiko v 36 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih 16 bolnikom s parodontitisom pred mehanskim zdravljenjem	50
Slika 8: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih s klasično bakteriološko diagnostiko pri 16 bolnikih s parodontitisom pred mehanskim zdravljenjem	51
Slika 9: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih z molekularnim testom micro-IDent v 36 vzorcih iz parodontalnih	

žepov odvzetih 16 bolnikom s parodontitisom pred mehanskim zdravljenjem 53

Slika 10: Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z lovkami značilnimi za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano za različne vzorce iz parodontalnih žepov odvzetih 16 bolnikom s parodontitisom pred in po mehanskem zdravljenju 54

Slika 11: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih z molekularnim testom micro-IDent pri 16 bolnikih s parodontitisom pred mehanskim zdravljenjem 55

Slika 12: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih s klasično bakteriološko diagnostiko v 29 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih 15 bolnikom s parodontitisom po mehanskem zdravljenju 57

Slika 13: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih s klasično bakteriološko diagnostiko pri 15 bolniki s parodontitisom po mehanskem zdravljenju 58

Slika 14: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih z molekularnim testom micro-IDent v 29 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih 15 bolnikom po mehanskem zdravljenju 59

Slika 15: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih z molekularnim testom micro-IDent pri 15 bolnikih po mehanskem zdravljenju 60

Slika 16: Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z lovkami značilnimi za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano za

vzorce iz parodontalnih žepov 27 DP in 45 DL odvzetih bolniku s parodontitisom P2 pred (levo) in po (desno) mehanskem zdravljenju 63

Slika 17: Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z lovki značilnimi za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano za vzorce iz parodontalnih žepov 33 ML in 45 ML odvzetih bolniku s parodontitisom P 6 pred (levo) in po (desno) mehanskem zdravljenju 63

Slika 18: Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z lovki značilnimi za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano za vzorce iz parodontalnih žepov 34 DL in 45 DB odvzetih bolniku s parodontitisom P 13 pred (levo) in po (desno) mehanskem zdravljenju 64

Slika 19: Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z lovki značilnimi za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano za vzorce iz parodontalnih žepov 15 DB in 25 DB odvzetih bolniku s parodontitisom P 16 pred (levo) in po (desno) mehanskem zdravljenju 64

Slika 20: Delež posameznih vrst parodontopatogenih bakterij *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in *P. intermedia* dokazanih v vzorcih iz parodontalnih žepov in vzorcih sline s klasično bakteriološko diagnostiko in molekularnim testom micro-IDent 65

SEZNAM OKRAJŠAV

AAP	American Academy of Periodontology
AP-PCR	naključni PCR (angl. arbitrarily primed polymerase chain reaction)
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	brain heart infusion
bp	bazni par
CFU	colony forming units
CRP	C-reaktivna beljakovina (angl. C-reactive protein)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidtrifosfati
IL-1	interlevkin 1
KVLB	kanamycin-vancomycin laked blood
LPS	lipopolisaharid
McF	McFarland
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PROS	pathogen-related oral spirohetes
rRNK	ribosomalna ribonukleinska kislina
RTF	reducirano transportno gojišče (angl. reduced transport fluid)
TNF α	tumorje nekrozirajoči dejavnik α
TSBV	tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin
VMGA	Viability-maintaining Gothenburg anaerobe

1 UVOD

S pojmom parodontalne bolezni zajamemo vrsto bolezenskih stanj, ki ogrožajo oporna in obzobna tkiva. Mednje prištevamo tudi parodontitis, katerega osrednje dogajanje predstavlja specifičen vnetni odziv, ki se razvije v obzobnem tkivu kot odgovor na bakterijsko akumulacijo na zobu. Le-ta je povezan z aktivnim izražanjem katabolnih citokinov in matriksnih metaloproteaz, ki povzročijo poškodbo tkiva dlesni in razvoj parodontalnih žepov. Vnetni odziv, ki je odgovoren za razvoj parodontitisa, je pravzaprav dvorezni meč, na eni strani uničuje vdirajoče parodontopatogene, na drugi strani pa sproži poškodbo obzobnega tkiva (Grošelj in Gubina, 2002; Teng, 2003).

Prevalenca parodontalnih bolezni s starostjo narašča in ker vse več ljudi živi dlje, naj bi se število posameznikov s parodontalnimi boleznimi v nekaj naslednjih desetletjih povečalo. Tako naj bi parodontitis postal eden izmed glavnih vzrokov izgube zob pri odraslih po 35. letu starosti. V razvoj parodontitisa je vpletenih več dejavnikov, predvsem parodontopatogene bakterije, genetska predispozicija, ki se odraža v imunskejem odzivu, slaba ustna higiena, kajenje, sistemske bolezni in stres. Za začetek parodontitisa je vedno potrebna prisotnost bakterij, medtem ko ostali dejavniki odločajo o resnosti bolezni in o njeni odzivnosti na zdravljenje (Kornman, 2001; Loesche in Grossman, 2001).

Ustna votlina človeka nudi okolje kompleksni in heterogeni mikrobni združbi. Normalno je v njej prisotnih nekaj sto različnih bakterijskih vrst, katerih večina je neškodljivih (Kroes in sod., 1999; Paster in sod., 2001). Z razvojem parodontitisa so povezali skupino močno patogenih, anaerobnih bakterij. Med najpomembnejše povzročitelje parodontitisa prištevamo vrste *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia* in *Treponema denticola*. Seveda pa je naše znanje o parodontopatogenih bakterijah omejeno na rezultate bakterioloških gojitvenih metod, ki bistveno podcenjujejo raznolikost mikrobne združbe v parodontalnih žepih. Številne parodontopatogene bakterije tvorijo virulenčne dejavnike, ki bodisi sami po sebi bodisi preko imunskega odziva prispevajo svoj delež k razvoju parodontalne bolezni (Loesche in Grossman, 2001).

Zaradi dejstva, da so primarni vzrok parodontitisa naštete paradontopatogene bakterije, je vsekakor potrebna specifična diagnostika, ki je še vedno relativno nov vendar hkrati hitro se razvijajoč koncept v dentalni medicini. Identifikacija parodontopatogenih bakterij bi lahko usmerila zobozdravnika v specifično antibiotično zdravljenje, kar je zlasti pomembno v primerih kronične parodontalne bolezni, ki se ne odziva na tradicionalno zdravljenje, in agresivne parodontalne bolezni (Listgarten in Loomer, 2003).

Klasična bakteriološka diagnostika za dokazovanje parodontopatogernih bakterij je zamudna, zapletena in manj zanesljiva, saj obsega delo s striktno anaerobnimi bakterijami in je zato potrebna primerna obdelava vzorca (najbolje v anaerobni komori). Za osamitev parodontopatogenih bakterij so potrebna številna selektivna gojišča (Alsina in sod., 2001; Jousimies-Somer in sod., 1995; Summanen in sod., 1993).

Zaradi številnih problemov, ki jih prinaša klasična bakteriološka diagnostika, molekularne metode na drugi strani ponujajo hitrejšo, preprostejšo in bolj občutljivo možnost dokazovanja parodontopatogenih bakterij (Jousimies-Somer in sod., 1995).

1.1 NAMEN IN DELOVNE HIPOTEZE

V diplomski nalogi smo žeeli primerjati učinkovitost molekularne metode in klasičnih bakterioloških diagnostičnih metod (osamitve, kultivacije in identifikacije bakterij) za določanje parodontopatogenih bakterij.

Pričakovali smo, da bo molekularni test veliko hitrejši, bolj občutljiv in preprostejši kot klasična bakteriološka diagnostika za določanje parodontopatogenih bakterij v vzorcih iz parodontalnih žepov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NORMALNA MIKROBNA FLORA ČLOVEŠKE USTNE VOTLINE

Ustna votlina človeka predstavlja okolje, ki ga naseljuje kompleksna in heterogena mikrobna flora. Zobje in ustna votlina so neprestano v stiku z mikrobi iz okolice. Bakterije se v ustih naseljujejo postopoma. Ob porodu je ustna votlina sterilna, vendar jo že po nekaj urah (4-12 ur po porodu) poselijo bakterije, ki jim kisik ne škoduje. To so predvsem streptokoki (*Streptococcus salivarius*) in laktobacili. V prvem letu življenja prevladujejo vrste iz rodov *Streptococcus* (*S. salivarius*), *Staphylococcus* (*Staphylococcus epidermidis*), *Neisseria* spp., *Veillonella* spp. Po izrastu prvih zob se v ustni votlini naselijo bakterije, ki so prilagojene za rast na zobni površini in v gingivalnem sulkusu. To so *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Rothia dentcariosa*, *Capnocytophaga* spp. Pri prenosu bakterij igra pomembno vlogo slina. Sčasoma, ko otrok uživa vse bolj raznoliko hrano, začno prevladovati v ustih mikroaerofilne in anaerobne paličaste bakterije, tako da se normalna ustna flora med 2. in 4. letom starosti že dokončno oblikuje. Pri zdravih otrocih do pubertete najdemo naslednje bakterije: vrste *Streptococcus* (*S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mutans*), *Actinomyces* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leptotrichia bucalis*, *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp. S poglabljanjem gingivalnih žepov po izrastu stalnih zob se ustvari niša za anaerobne bakterije. V zdravih ustih odraslih je delež anaerobnih bakterij vedno manjši od 1 % vse mikrobne flore. Oralna mikrobna flora pri odraslih je kompleksna in jo sestavljajo *Streptococcus* spp., *Neisseria* spp., *Corynebacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Rothia* spp., *Capnocytophaga* spp. V ustih odraslih lahko najdemo tudi treponeme (*Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Treponema vincentii*, *Treponema pectinovorum*). V velikih količinah jih najdemo v subgingivalni mikroflori, medtem ko jih na zdravi sluznici le redko zasledimo. Ustna votlina starostnikov je podobna dojenčkovim in tako ni možnosti za razrast anaerobnih bakterij. Prevladujejo *S. salivarius*, *S. epidermidis*, *Neisseria* spp., *Corynebacterium* spp., *Veillonella* spp. (Seme, 2002; Grošelj in Gubina, 2002).

2.1 PARODONTITIS

Pojem parodontalne bolezni zajema vrsto bolezenskih stanj, ki prizadenejo oporna in obzobna tkiva in mednje prištevamo tudi parodontitis (Grošelj in Gubina, 2002). Parodontitis se v odvisnosti od imunskega sistema posameznika razvije v tkivu okoli zoba kot odgovor na bakterijsko akumulacijo (zobno oblogo) na zobu. Bakterije redko povzročijo očitno okužbo, toda imunski odgovor, ki ga sprožijo, je brez dvoma vzrok napredajoči izgubi kolagenske povezave zoba na spodaj ležečo čeljustnico (Loesche in Grossman, 2001). Parodontalna bolezen je napredajoči gingivitis. Tudi pri slednjem obolenju osrednjo vlogo odigra nespecifičen vnetni odziv dlesni kot odgovor na prisotnost bakterijske oblage na zobnem vratu. Napredajoče vnetje zajame pozobnico in čeljustnico, kar lahko imenujemo parodontalna bolezen oziroma parodontitis. Zanjo je značilno, da se gingivalno prirastišče premika apikalno, kar klinično opazimo kot poglabljanje parodontalnih žepov (Grošelj in Gubina, 2002). Parodontalni žepi so nastale špranje med zobno površino in bližnjega tkiva dlesni in njihova globina se giblje med 4 do 12 mm. Taki žepi, odvisno od njihove globine in obsega, nudijo nišo kar od 10^7 do skoraj 10^9 bakterijskim celicam. Krvavenje iz dlesni in izguba kolagenske povezave, ki sta spremeljevalna dejavnika parodontalne bolezni, sta ponavadi neboleča in jih zato posameznik hitro spregleda. Bolnik se pogosto prvič zaveda problema, ko ga zobozdravnik opozori na prisotnost parodontalnih žepov v njegovi ustni votlini, ki so globlji od 4 mm. (Loesche in Grossman, 2001).

Parodontitis je v primerjavi z gingivitisom nepovratno stanje. Pri zdravljenju ne pride do popolne obnove. Potrebni so ukrepi kot ustreza ustna higiena, mehansko luščenje in glajenje koreninske površine. V nasprotnem primeru se globina parodontalnih žepov na vnetnem predelu lahko še poveča. S tem se razširi ekološka niša za bakterije, ki tako niso več izpostavljene naravnemu izpiranju s slino in mehanskim vplivom žvečenja ter krtačenja. Zaradi vnetja se resorbira alveolarna kost (čeljustnica). Prirastišče dlesni se pomakne iz prizadetega okolja v apikalni smeri proti zdravi koreninski površini. Ob prizadetih zobeh nastajajo globoki parodontalni in kostni žepi (Grošelj in Gubina, 2002).

Za parodontitis lahko rečemo, da je oportunistična okužba, za katero morajo biti izpolnjeni trije pogoji:

- prisotnost primerenega števila izbranih bakterij, ki so sicer normalno prisotne,
- primerne ekološke niše, ki omogočajo razvoj anaerobnih bakterij in
- oslabljeni gostiteljevi obrambni mehanizmi zaradi dejavnikov kot so genetska predispozicija in različna kronična obolenja (Grošelj in Gubina, 2002).

V razvoj parodontitisa je torej vpletenih več dejavnikov, predvsem parodontopatogene bakterije (Socransky in Haffajee, 1992), genetska predispozicija, ki se odraža v imunskega odziva (Kornman, 2001), slaba ustna higiena (Loesche in Grossman, 2001), kajenje (Bergstrom in sod., 2000; Persson in sod., 2001) in stres (Loesche in Grossman, 2001). Sistemske bolezni oziroma kakršnokoli zdravstveno stanje, ki vpliva na obrambni mehanizem človeka, prav tako poveča možnost za razvoj parodontitisa. Med taka stanja štejemo sladkorno bolezen, okužbo z virusom imunske pomanjkljivosti in nevtrofilne nepravilnosti (Loesche in Grossman, 2001).

2.1.1 Razvoj zobne oblage in njena kompleksnost

Bakterijska kolonizacija gladkih zobnih površin se pojavi kot rezultat čvrste povezave posameznih bakterijskih celic na zubo površino in na že pritrjene bakterijske celice, kateri sledi rast bakterij v obliki mikrokolonij. Že kmalu po čiščenju zob se na zubo površini razvije organska prevleka, debela nekaj mikrometrov, zaradi pritrditve kislih glikoproteinov, ki so prisotni v slini. Ta prevleka nudi bakterijam mesto, kamor se lahko pritrdi in rastejo. Kolonizacija glikoproteinske prevleke je močno specifična in v njo je vpletenih le nekaj vrst rodu *Streptococcus* (*S. sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *S. mutans* in *Streptococcus mitis*). Zaradi rasti teh bakterij pride do razvoja debelejše bakterijske prevleke, ki jo imenujemo obloga. V nadalnjem razvoju oblage se pojavijo filamentozne bakterije, predvsem vrste iz rodu *Fusobacterium*. V povezavi s filamentoznimi bakterijami in stretokoki se v oblogi pojavijo pozni kolonizatorji, med katere uvrščamo spirohete, po Gramu pozitivne in negativne bacile in po Gramu negativne koke. V znatnih oblogah lahko

prevladujejo anaerobne vrste iz rodu *Actinomyces* (Jin in Yip, 2002; Madigan in sod., 2000; Marsh, 2004).

Anoksične razmere se razvijejo zaradi delovanja fakultativnih bakterij, ki rastejo aerobno na organskem materialu. Gosta mreža oblage zmanjšuje difuzijo kisika do zobne površine in tako še dodatno prispeva k razvoju anaerobnega okolja. Zaradi aktivnosti bakterij v zobni oblogi se poleg gradienta kisika razvijeta še gradient vrednosti pH in gradient razpoložljivih hrani (Madigan in sod., 2000; Marsh, 2004).

Točno število bakterijski vrst, ki soobstajajo v zobni oblogi ni znano, je pa to število veliko (Kroes in sod., 1999; Paster in sod., 2001). Ocene bakterijske raznolikosti v ustni votlini, ki temeljijo tako na kultivacijskih metodah kot tudi na metodah, ki niso odvisne od kultivacije, nakazujejo okoli 500 različnih bakterijskih vrst. V samo zobni oblogi, ki se tvori pod mejo dlesni, naj bi bilo okoli 415 različnih bakterijskih vrst (Kolenbrander in sod., 2002). To številčnost različnih bakterijskih vrst lahko razložimo s heterogenostjo okolja, ki ga predstavlja zobna obloga (Marsh, 2004). Sestava zobne oblage in odziv dlesni na njeno prisotnost sta bili intenzivno raziskovani z uporabo t.i. modela eksperimentalnega gingivitisa. Številne raziskave na to temo so vključevale prostovoljce z zdravimi dlesnimi, ki so opustili vse oblike ustne higiene. Kot že omenjeno, začetni bakterijski kolonizatorji zobne površine so predvsem streptokoki, ki predstavljajo kar od 60 do 90 % vseh bakterij, vendar se že po nekaj dneh mikrobna združba spremeni in v njej prevladujejo vrste iz rodu *Actinomyces* ter druge po Gramu pozitivne in negativne bakterijske vrste, kot so *Capnocytophaga* spp., *Eikenella* spp., *Haemophilus* spp., *Prevotella* spp., *Propionibacterium* spp. in *Veillonella* spp. (Kolenbrander in sod., 2002; Syed in Loesche, 1978). Tri tedne stara zobna obloga predstavlja kompleksno mikrobno združbo. Moore in sod. (1982) so iz samo štirih posameznikov in 96 vzorcev zobne oblage osamili 166 različnih bakterijskih vrst. S staranjem zobne oblage se v njej, sicer v manjšem številu, poveča število anaerobnih vrst, kot so na primer spirohete. To nakazuje, da so vrednosti oksidacijsko-reduksijskega potenciala padle in tako ustvarile okolje, v katerem se lahko uveljavijo mikroaerofilne in anaerobne vrste. Po 3 do 4 tednih se eksperimentalni gingivitis zaradi etičnih razlogov prekine.

Ob tolikšni bakterijski raznolikosti je težko povezati razrast določene bakterijske vrste z razvojem parodontitisa. Različne raziskave so pokazale, da razvoj parodontalne bolezni lahko povežemo s povečanim deležem po Gramu negativnih anaerobnih vrst v zobni oblogi (Kroes in sod., 1999; Loesche in Grossman, 2001).

Bakterijske vrste, katere je možno gojiti na umetnih gojiščih, predstavljajo okoli 60 % vseh bakterij, ki smo jih uspeli identificirati z molekularnimi metodami, kar pomeni, da je zobna obloga ena izmed najboljše opisanih mešanih mikrobnih združb. Ostale bakterijske vrste, ki jih ni mogoče gojiti na umetnih gojiščih, je možno identificirati z uporabo hitro se razvijajočih molekularnih metod. Choi in sod. (1994) so v enem samem vzorcu zobne oblage z oligonukleotidno lovko specifično za treponeme dokazali 23 različnih vrst, od katerih jih je bilo kar 19 še neznanih vrst. Čeprav se število kultiviranih spirohet (*T. denticola* in *T. vincentii*) poveča v zobni oblogi na prizadetih mestih, pa le-te niso najštevilčnejše (Motter in sod., 1998). Do podobnega zaključka so prišli tudi Nadkarni in sod. (2004). S pomočjo verižne reakcije s polimerazo (PCR) v realnem času so pokazali raznolikost bakterijskih vrst iz rodu *Prevotella* in podobnih bakterij v vzorcih iz kariozne zobovine. Velika večina pridobljenih sekvenc je predstavljala še neznane vrste, ki so bile hkrati tudi številčno najpogostejše, medtem ko so bile kultivirane vrste prisotne v manjšem številu. Bakterijske vrste, ki jih ni mogoče gojiti na umetnih gojiščih, je vsekakor potrebno upoštevati kot možne parodontopatogene bakterije.

2.2.1.1 Nespecifična teorija o razvoju zobne oblage

Nespecifična teorija o razvoju zobne oblage sega v 19. stoletje, ko je Willoughby Miller, učenec Roberta Kocha, skušal z razvojem kariesa povezati specifične bakterijske vrste. Zaradi omejenega znanja o ustnih bakterijah in ob neupoštevanju specifičnih mikrobnih niš v ustni votlini, je prišel do sklepa, da je karies bakteriološko nespecifičen. Ker kislina nastala iz ogljikovih hidratov povzroča razgrajevanje zobovine in ker praktično vse bakterije v zobni oblogi tvorijo kislino, je Miller sklepal, da so vse bakterije odgovorne za nastanek kariesa.

Zgoraj opisana kompleksnost zobne oblage podpira nespecifično teorijo o nastanku zobne oblage in trdi, da nespecifična razrast bakterij sproži imunski odziv gostitelja. Številni mehanizmi, s katerimi bakterije izzovejo imunski sistem gostitelja, so nespecifični kot na primer imunski odziv na bakterijski endotoksin ozziroma lipopolisaharidni sloj bakterijske celične stene LPS (Loesche in Grossman, 2001; Offenbacher in Salvi, 1999). Številne vrste v zobni oblogi tvorijo hlapne maščobne kisline (butirat, propionat in izobutirat) in različne sulfide (vodikov sulfid in metil merkaptan). S številnimi študijami na tkivnih kulturah so pokazali, da so te spojine toksične za tkivo dlesni (Loesche in Grossman, 2001; Niederman in sod., 1996; Ratcliff in Johnson, 1999). V nekaj raziskavah so pokazali, da je vnetni odziv v tkivu dlesni direktno in statistično pomembno povezan s tvorbo hlapnih, kratkoverižnih maščobnih kislin ne pa tudi s posameznimi bakterijskimi vrstami ali kombinacijami določenih bakterijskih vrst. Pri bolnikih z resnejšo obliko parodontitisa so koncentracije hlapnih maščobnih kislin v parodontalnih žepih bistveno večje kot pri bolnikih z lažjo obliko bolezni in so poleg ostalih kliničnih parametrov povezane tudi s skupno bakterijsko koncentracijo v žepu (Loesche in Grossman, 2001; Niederman in sod., 1996; Niederman in sod. 1997).

2.2.1.2 Specifična teorija o razvoju zobne oblage

Zaradi bakterijske tvorbe kisline iz ogljikovih hidratov, vrednosti pH v ustni votlini hitro pada na 5.0 do 5.5. Večina bakterij v zobni oblogi lahko tvori kislino, vendar pa niso aktivne pri tako nizkih vrednostih pH. Zaradi aktivnosti ustnih bakterij se torej ustvari okolje, ki favorizira rast in namnožitev zelenečih streptokokov in laktobacilov. Razvoj zobne gnilobe je torej povezana s selekcijo specifičnih bakterijskih vrst. Tudi za parodontitis lahko rečemo, da je bakteriološko specifičen, kar potrjuje preko 200 raziskav, ki so bile izvedene v zadnjih 25 letih. Rezultati raziskav so v osnovi z razvojem parodontitisa povezali omejeno število bakterijskih vrst, med katerimi prevladujejo po Gramu negativne anaerobne bakterije (Loesche in Grossman, 2001).

2.1.2 Oblike parodontitisa

Parodontitis zajema več bolezenskih stanj, ki jih lahko razdelimo kot prikazuje preglednica 1. V nadaljevanju so opisane oblike parodontitisa, ki so omenjene kasneje v tekstu.

Preglednica 1: Oblike parodontitisa glede na klasifikacijski sistem AAP- angl. American Academy of Periodontology (Loesche in Grossman, 2001)

Nova razvrstitev (1999)	Stara razvrstitev (1989)
I. Kronični parodontitis	Parodontitis pri odraslih (> 35 let; angl. adult periodontitis)
Lokalni	Refraktorni parodontitis
Razširjen	Nekrotični ulcerozni parodontitis
Refraktorni	Parodontitis povezan s sistemskimi boleznimi
II. Agresivni parodontitis	Parodontitis pri mladih (≤ 35 let; angl. early-onset periodontitis)
Lokalni	Pubertetni
Razširjen	Lokalni
Refraktorni	Razširjen
	Juvenilni (do 20. leta starosti)
	Lokalni
	Razširjen
	Hitro napredujoč (med 20-35. letom starosti)
III. Parodontitis kot manifestacija sistemske bolezni	
Povezan s krvnimi nepravilnostmi	
Povezan z genetskimi napakami	
IV. Nekrotična parodontalna bolezen	

Lokalni juvenilni parodontitis se razvije pri najstnikih in je v klasični obliki omejen na zobe, ki izpadajo okoli 6. leta starosti (kočniki in sekalci). Globoki parodontalni žepi se razvijejo ponavadi šele po puberteti in le-ti vsebujejo majhne količine zobne obloge. Z razvojem LJP so povezali mikraerofilno bakterijo *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, glede na to, da je njena prevalenca višja pri bolnikih z LJP kot pri bolnikih s kroničnim parodontitisom ali pri zdravih posameznikih (Loesche in Grossman, 2001; Mandell in Socransky, 1981; Slots, 1982).

Agresivne oblike parodontitisa prizadanejo osebe stare od 14. do 35. leta starosti, kamor lahko uvrstimo tudi pravkar opisano obliko parodontitisa, LJP, vendar pa so te agresivne oblike parodontitisa povezane z razvojem večjih količin zobne obloge in zognega kamna in se končajo z izgubo zob že pred 20. letom starosti. Glavne parodontopatogene bakterije, ki sprožijo razvoj agresivnih oblik so anaerobne bakterije kot so *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* in *Bacteroides forsythus* (Kamma in sod., 1994; Kuru in sod., 1999; Loesche in Grossman, 2001).

Najpogostejsa oblika parodontitisa je kronični parodontitis, ki se razvije pri posameznikih nad 35. letom starosti. Najpogostejsje bakterijske vrste, ki jih osamimo iz vzorcev odvzetih pri bolnikih s kroničnim parodontitisom, so *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *P. intermedia*, *T. denticola* in ostale spirohete. Vse naštete bakterije so anaerobne vrste in so prisotne v 80 do 100 % vzorcev (Loesche in sod., 1992; Loesche in Grossman, 2001).

Posebna oblika parodontalnih bolezni je akutni nekrotični ulcerozni gingivitis, ki se pojavlja pri mladih posameznikih, ponavadi mladih moških, kadilcih s slabo ustno higieno. Klinični znaki so nenaden začetek, akutna bolečina in nekroza tkiva med zobmi. Če se bolnik ne zdravi, lahko vnetje napreduje v nekrotični parodontitis ali stomatitis. Različne raziskave, ki so primerjale obolela in zdrava mesta, so pokazale pomembno povečanje števila spirohet in vrste *P. intermedia* v vzorcih odvzetih z obolelih mest (Grošelj in Gubina, 2002; Loesche in Grossman, 2001).

2.1.3 Epidemiologija parodontalnih bolezni

Parodontitis postaja vse pogosteji vzrok izgube zob pri odraslih po 35. letu starosti. Njegova prevalenca s starostjo narašča in zaradi staranja populacije naj bi se število ljudi s parodontitisom povečalo. Približno 50 % odrasle populacije ima razvit gingivitis (vnetje dlesni brez izgube kosti in parodontalnih žepov globljin od 3mm) okoli treh oziroma štirih zob in 30 % ima razvit parodontitis (tri je ali več zob s parodontalnimi žepi globljinimi od 4 mm). Približno 5 do 15 % bolnikov s parodontitisom razvije napredujočo obliko bolezni s parodontalnimi žepi globljinimi od 6 mm. Agresivne oblike parodontitisa prizadenejo posameznike med 14. in 35. letom in zajamejo le 3 do 4 % populacije. (Loesche in Grossman, 2001).

2.1.4 Parodontitis je dejavnik tveganja za kardiovaskularno bolezen

Kronični, asimptomatski parodontitis pogosto poteka neopazno. Nedavne raziskave so pokazale, da lahko take kronične okužbe služijo kot vir vnetnih mediatorjev, LPS iz bakterijske celične stene in drugih bioaktivnih molekul, ki lahko sprožijo kardiovaskularno bolezen. V razvoju le-te naj bi bila vpletena C-reaktivna beljakovina (CRP; angl. C-reactive protein) oziroma povišana koncentracija omenjene beljakovine v serumu. (Kiechl in sod., 2001; Noack in sod., 2001; Slade in sod., 2000). V primeru parodontalne bolezni je bila moč povezave s koncentracijo CRP primerljiva s povezavo v primeru kroničnega bronhitisa in kajenja in je bila najmočnejša pri posameznikih brez drugih zdravstvenih dejavnikov tveganja, torej pri zdravih posameznikih (Slade in sod., 2000).

Drug mehanizem, preko katerega parodontopatogene bakterije verjetno sprožijo razvoj kardiovaskularne bolezni, je antigenska podobnost nekaterih bakterijskih beljakovin z gostiteljevimi beljakovinami (npr.: beljakovine stresa Hsp60; angl. heat shock protein). Številna človeška tkiva, tudi endotelijski sloj krvnih žil, tvorijo beljakovino Hsp60 kot odgovor na nekatere stresne dejavnike, kot sta na primer visok krvni pritisk in LPS. V razvoju ateroskleroze naj bi bil verjetno vpletten avtoimunski mehanizem, pri katerem se gostitelj odzove na bakterijski Hsp60 (Xu in sod., 1999). Serum in vneto tkivo dlesni

bolnikov s parodontalno boleznijo kažeta pozitivno serološko reakcijo tako za Hsp, ki ga je tvorila bakterija *Porphyromonas gingivalis* (GroEL Hsp60) kot tudi za humani Hsp60. Protitelesa, uperjena proti GroEL Hsp60, so navzkrižno reagirala s humanim Hsp60 in obratno. Očitno protitelesa, ki so uperjena proti beljakovinam Hsp *P. gingivalis*, lahko reagirajo s humanimi Hsp, ki so izpostavljeni na endoteliju kardiovaskularnega sistema, kar posledično vodi v poškodbo tkiva (Tabeta in sod., 2000).

2.1 OBRAMBA GOSTITELJA

2.1.1 Obstojče protimikrobne ovire

2.3.1.1 Obrambna vloga sline

Slina sama po sebi ni bogato gojišče za bakterije. Vsebuje okoli 0,5 % raztopljenih soli, katerih polovica je anorganskih (predvsem kloridi, bikarbonati, fosfat, natrij, kalcij, kalij in elementi v sledovih). Glavna organska komponenta sline so encimi, mukoproteini in serumske beljakovine. V slini najdemo tudi manjše količine ogljikovih hidratov, uree, amonija, aminokislin in vitaminov. Poleg naštetega pa so v slini odkrili še številne protibakterijske substance, od katerih sta najpomembnejša encima lizocim in laktoperoksidaza, ki imata protibakterijsko delovanje. Vrednosti pH sline so pod kontrolo bikarbonatnega puferskega sistema in se gibljejo med 5,7 in 7,0 s povprečno vrednostjo pH okoli 6,7. Sestava sline se razlikuje od posameznika do posameznika. Na njeno sestavo lahko vplivajo fiziološki dejavniki kot sta prehrana in stres. Kljub aktivnosti protibakterijskih substanc predstavlja ustna votlina ugodno okolje za razrast mikrobov zaradi prisotnosti delcev hrane in ostankov epitelija (Madigan in sod., 2000). Globoki parodontalni žepi nudijo bakterijam okolje, ki je nedostopno spiranju s slino (Grošelj in Gubina, 2002).

2.3.1.2 Tkivo dlesni kot oksidativna ovira za anaerobne bakterije

Tkivo dlesni je prepredeno z mrežo žil, ki predstavljajo učinkovito oksidativno oviro za anaerobne bakterije in posledično onemogoča prodiranje bakterij iz zobne obloge v okoliško tkivo dlesni. Parcialni tlak kisika (pO_2) v parodontalnem žepu globine 6 mm je okoli 13 do 15 mm Hg, medtem ko je v tkivu dlesni bistveno višji, okoli 140 do 150 mm Hg. V takem okolju anaerobne bakterije ne morejo preživeti (Loesche in sod., 1983, Loesche in Grossman, 2001). Nekatere bakterije kot na primer *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in spirohete so že dokazali v tkivu, vendar pa so redko sposobne povzročiti nekrozo tkiva. Do nekroze pride pri posameznikih z oslabelim imunskim odzivom. Kajenje in stres sta dejavnika, ki zožita periferne arteriole, in sta posledično dejavnika tveganja za razvoj parodontitisa. Zmanjšan pretok krvi omogoča določenim invazivnim anaerobom preživeti dovolj dolgo v tkivu, da njihovi produkti aktivirajo latentne kolagenaze (Loesche in Grossman, 2001).

2.1.2 Imunski odziv gostitelja

Globina parodontalnih žepov odraža vnetni odziv posameznika, ki povzroči otekanje tkiva dlesni in izgubo kolagenske povezave zoba na spodaj ležečo alveolarno kost. Globlji kot je žep, tem bolj je mikrobna združba nedostopna čiščenju zob. Število bakterij v parodontalnem žepu ostane bolj ali manj konstantno in njihova počasna rast je uravnotežena z izpiranjem ohlapno vezanih ali mrtvih bakterijskih celic iz parodontalnega žepa s tkivno tekočino ozziroma serumskim transudatom. Kot odgovor na stalno prisotnost velikega števila bakterij v parodontalnem žepu gostitelj v tkivu dlesni razvije številne obrambne mehanizme (preglednica 2), ki preprečujejo bakterijsko rast in njihovo invazijo v okoliško tkivo dlesni (Loesche in Grossman, 2001).

Kot odgovor na spremembe v bakterijski sestavi (povečanje deleža po Gramu negativnih vrst) v zobni oblogi se v okoliškem tkivu dlesni razvije vnetni odziv, ki preprečuje rast bakterij v tkivu, odstranjuje produkte kot so antigeni, LPS bakterijske celične stene in encimi, ki so prodrali v okoliško tkivo, in je povezan s tvorbo specifičnih protiteles. Tkvna tekočina prinaša v tkivo dlesni fagocitne celice (nevtofilce in monocite ozziroma

makrofage). V začetnih fazah vnetnega odziva prevladujejo v tkivu celice T, medtem ko kasneje začno prevladovati celice B. Celice B povezujemo s tvorbo zaščitnih protiteles in posledično obvladanje okužbe. Lahko pa ta protitelesa niso zaščitna kar vodi v poškodbo tkiva. Kljub številnim virulenčnim dejavnikom, ki jih tvorijo parodontopatogene bakterije, je danes splošno sprejeto, da je za večino škode odgovoren specifičen imunski odziv. Le-ta vključuje aktivno izražanje katabolnih citokinov in vnetnih mediatorjev (interlevkina 1, interlevkin 6, tumorje nekrozirajočega dejavnika α , prostaglandina E₂), ki so produkt aktiviranih monocitov oziroma makrofagov, limfocitov, fibroblastov in drugih vpletenih celic. Ti citokini in vnetni mediatorji lahko sami ali skupaj aktivirajo matriksne metaloproteinaze, ki so odgovorne za izgubo kolagenske povezave in posledično za nastanek in poglabljanje parodontalnih žepov (Gemmell in sod., 2002; Loesche in Grossman, 2001; Teng, 2003). K aktivaciji metaloproteaz prispevajo tudi protezae, ki jih tvorijo nekatere parodontopatogene bakterije, in reaktivne kisikove spojine obrambnih celic (Loesche in Grossman, 2001; Sorsa in sod., 1992).

V zdravem tkivu fibroblasti tvorijo različne tipe kolagena. Kot odgovor na bakterijski endotoksin in vnetne mediatorje, ki se izražajo na prizadetih mestih, fibroblasti utišajo gene za tvorbo kolagena in gene za sintezo tkivnih inhibitorjev metaloproteaz, hkrati pa se začno prepisovati geni za sintezo matriksnih metaloproteaz, ki z uničenjem tkiva dlesni odprejo pot vnetnim celicam (Gemmell in sod., 2002)

Preglednica 2: Obrambni mehanizmi, ki jih gostitelj razvije kot odgovor na stalno prisotnost velikega števila bakterij v parodontalnem žepu (Loesche in Grossman, 2001)

Obrambni mehanizmi gostitelja

- večji pretok krvi
 - veliko število nevtroflicev v tkivnem izcedku
 - veliko število mononuklearnih celic v epiteliju
 - povečani titri specifičnih protiteles razreda G (IgG) in A (IgA)
 - tvorba tkivnih protimikrobnih peptidov
 - pospešeno obnavljanje epitelija dlesni
-

2.1.3 Ali je parodontitis deden?

Bakterije so potrebne za začetek in razvoj parodontitisa, medtem ko dejavniki, kot je na primer genetska predispozicija, lahko vplivajo na resnost bolezni in odziv na zdravljenje.

Z agresivnimi in resnejšimi oblikami parodontitisa lahko povežemo tri mediatorje vnetnega odziva v tkivu dlesni: interlevkin 1 (IL-1), prostaglandin E2 in encime matriksne metaloproteaze. IL-1 je primarni regulator slednjih dveh (Kornman, 2001). Asuma in sod. (1998) so z eksperimentalnim paradontitisom povzročenim pri opicah odkrili, da specifično blokiranje IL-1 in tumorje nekrozirajočega dejavnika α (TNF α), bistveno zmanjša izgubo kosti in vpliva na vnetni odziv poskusne živali.

Že nekaj let je znano, da nekateri ljudje tvorijo več IL-1 kot obrambni odgovor na prisotnost parodontopatogenih bakterij. Visoka tvorba IL-1 se deduje in je povezana z določenimi različicami gena za IL-1, ki ob prisotnosti bakterij poskrbijo za njegovo prekomerno tvorbo. Približno 30 % bele rase ima ta genetski potencial (Kornman, 2001). Podobno, je verjetno tudi polimorfizem gena za TNF α dejavnik tveganja za razvoj parodontitisa (Gemmell in sod., 2002).

McGuire in Nunn (1999) sta pri bolnikih s parodontitisom ugotovila, da sta genetska predispozicija in kajenje močno povezana z razvojem in potekom parodontitisa. Za bolnike z genetsko predispozicijo je bilo 2,7-krat verjetnejše, da bodo izgubili zobe, kot za bolnike brez genetske predispozicije in za kadilce je bilo kar 2,9-krat verjetnejše, da bodo izgubili zobe kot za bolnike z genetsko predispozicijo. Kombiniran vpliv genetske predispozicije in kajenja poveča tveganje za izgubo zob za 7,7-krat.

2.1 PARODONTOPATOGENE BAKTERIJE

Med nekaj sto bakterijskimi vrstami, ki so normalno prisotne v ustni votlini človeka (Paster in sod., 2001), je le nekaj takih, ki lahko sprožijo razvoj parodontalne bolezni in so predstavljene v preglednici 3. Le-te sodijo v skupino močno patogenih, striktno anaerobnih

bakterij in so primarni vzrok progresivne parodontalne bolezni. Med najpomembnejše parodontopatogene bakterije štejemo vrste *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* in *T. denticola* (Loesche in Grossman, 2001). Številne med njimi tvorijo virulenčne dejavnike, ki sami po sebi ali preko imunskega odziva prispevajo k razvoju parodontitisa (Sorsa in sod., 1992).

Preglednica 3: Bakterije, ki so vpletene v razvoj parodontitisa

Pogosto povezane	Včasih povezane
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Bacteroides forsythus</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>Treponema spp.</i>	<i>Capnocytophaga spp.</i>
<i>Campylobacter rectus</i>	
<i>Eubacterium nodatum</i>	

Parodontopatogene bakterije glede na odnos do kisika sodijo v skupino anaerobnih in mikroaerofilnih bakterij. Morfološko so to po Gramu negativni bacili ter nitaste in spiralne bakterije (Grošelj in Gubina, 2002).

Parodontopatogene bakterije, katere bomo podrobneje predstavili v sledečih poglavjih, v manjših količinah lahko dokažemo tudi pri nižjem deležu zdravih posameznikov (posameznikov brez parodontitisa), zato so za razvoj parodontitisa pomembne le velike količine parodontopatogenih bakterij (Eick in Pfister, 2002; Griffen in sod., 1998; Tran in Rudney, 1999).

2.1.1 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Bakterija sodi v rod *Actinobacillus* (družina *Pasteurellaceae*), katerega predstavniki so fakultativno anaerobni, negibljivi, po Gramu negativni bacili. Na rutinskih trdnih gojiščih so celice majhne, kokoidne oblike, v tekočih gojiščih s serumom in na gojiščih, ki

vsebujejo sladkorje, pa so celice daljše, paličaste oblike. Predstavniki rodu *Actinobacillus* so nagnjeni k bipolarnemu obarvanju. Celice se urejajo posamično, v pare ali kratke verižice.

Številne vrste iz rodu *Actinobacillus* so osamili iz vzorcev živali. Poleg *A. actinomycetemcomitans* pri človeku najdemo tudi *Actinobacillus ureae* in *Actinobacillus hominis*. *A. actinomycetemcomitans* je glede na homologijo DNK in sekvenco 16S rRNK bližje *Haemophilus aphrophilus* in *Haemophilus parahaemophilus* kot ostalim aktinobaciom. Normalno ga najdemo v ustni votlini človeka ne pa tudi pri živalih.

Rast aktinobacilov zahteva obogatena gojišča in je izboljšana v atmosferi s 5 do 10 % ogljikovim dioksidom (CO_2). Kolonije *A. actinomycetemcomitans* imajo prvotno temnejši center, ki se tekom nadaljnje inkubacije razvije v zvezdasto strukturo, kar da kolonijam videz prekrižanih cigar. Sveži klinični izolati v tekočih gojiščih s serumom rastejo v obliki zrn, ki so pritrjena na stene ali na dno epruvete. Viabilnost v tekočih gojiščih je omejena (von Graevenitz in sod., 1995). Zrna predstavljajo lepljiv, težko odstranljiv, gost biofilm, ki ga tvori bakterija kadar raste na trdnih površinah kot sta na primer plastika ali hidroksiapatit. Za tako močno povezano biofilma na trdne površine so odgovorni dolgi, v šop zaviti pili, ki se tvorijo na celični površini. Biofilm je zelo težko odstraniti z detergenti, proteazami, vročino, ultrazvokom ali vorteksiranjem. V primerjavi s prostimi celicami biofilm izkazuje povečano odpornost na antibiotike. Zaradi naštetih lastnosti je bakterija sposobna kolonizirati ustno votlino in tam povzročiti bolezen, kar so že dokazali na podganjem modelu, verjetno pa enako velja za človeka (Kaplan in sod, 2003; Schreiner in sod., 2003).

A. actinomycetemcomitans so povezali z lokalnim juvenilnim parodontitisom in drugimi agresivnimi oblikami parodontitisa. Bakterijo pridobimo v zgodnjem otroštvu, verjetno od družinskih članov (Loesche in Grossman, 2001). *A. actinomycetemcomitans* je ena izmed redkih bakterij v zobni oblogi, ki lahko prodre v tkivo dlesni. Njena navzočnost sproži povečanje titra protiteles proti antigenu LPS, proti ogljikovim hidratom, ki so specifični za serotip, in proti levkotoksinom.

Glede na površinske ogljikove hidrate ločimo pet serotipov. Serotipi od a do c so najpogostejši. Serotip b povezujejo s parodontitism, tvorbo β -laktmaz, bakteremijo in endokarditisom. Serotip c je v glavnem odgovoren za okužbe izven ustne votline, lahko pa je vpletен tudi v razvoj parodontitisa. Vrsta *A. actinomycetemcomitans* ima številne virulenčne dejavnike, med katerimi so najpomembnejši levkotoksini in kolagenaze. Levkotoksini so toksični za polimorfonuklearne levkocite in monocite in njihova tvorba ni vezana le na en serotip, najpogosteje pa je značilna za seve serotipa b. Prisotnost levkotoksinov določa virulenco, saj so pri bolnikih s parodontitism našli bistveno višje deleže sevov, ki tvorijo levkotoksine. Levkotoksini omogočajo bakteriji, da ostane v tkivu dlesni in iz ustne votline celo vstopi v krvni obtok ter povzroči okužbe izven ustne votline kot so bakteriemija, endokarditis in lokalni abscesi. Bakterijo skupaj s še nekaterimi drugimi bakterijskimi rodovi, ki jih prav tako lahko najdemo v ustni votlini človeka, uvrščamo v skupino HACEK (Loesche in Grossman, 2001; von Graevenitz in sod., 1995). Bakterija se lahko pojavlja v kombinaciji z *Actinomyces* spp., predvsem pri okužbah mehkih tkiv, kjer je lahko prisotna v žveplenih zrnih (von Graevenitz in sod., 1995).

Levkotoksini so imunogeni in sprožijo razvoj protiteles, ki omejijo okužbo le na prve zobe. Prisotnost teh protiteles selekcioniра seve, ki ne tvorijo levkotoksinov, v starejših posameznikih (Loesche in Grossman, 2001).

Morfološko in biokemično je bakterija *A. actinomycetemcomitans* zelo podobna *H. aphrophilus* (von Graevenitz in sod., 1995). Obe bakteriji lahko najdemo v vzorcih zobne obloge. Kljub podobnostim pa se bakteriji ločita v njuni vpleteneosti v razvoju parodontitisa, saj za *H. aphrophilus* ni dokaza, da bi bil sposoben povzročiti parodontitis (Tempro in Slots, 1986). Vzrok temu bi lahko bile razlike v sestavi in strukturi LPS, ki ga najdemo v celični steni obeh bakterij. LPS *A. actinomycetemcomitans* ob sprostitvi stimulira imunski sistem, ki poškoduje obzobno tkivo (Brondz in Olsen, 1989).

Za osamitev in gojenje bakterije so razvili različna selektivna gojišča, ki vsebujejo zaviralce rasti po Gramu pozitivnih vrst (Alsina in sod., 2001; Slots, 1982). Za dokaz *A. actinomycetemcomitans* lahko uporabljamo tudi PCR, katere tarče so gen za levkotoksin ali specifične sekvene gena za 16S rRNA. Tipizacija bakterije *A. actinomycetemcomitans* je

klasično serološka, toda določene prenose med družinskimi člani je lažje izslediti z molekularnimi metodami (Preus in sod., 1993). Bakterija *A. actinomycetemcomitans* je povečini občutljiva za cefalosporine, tetracikline in fluorokinolone, odpornost na penicilin, amikacin in makrolide je redka (von Graevenitz in sod., 1995).

2.1.2 Rodova *Prevotella* in *Porphyromonas*

Oba rodova, ki sta sprva spadala v rod *Bacteroides*, obsegata po Gramu negativne, anaerobne, paličaste bakterije in sta bila v nedavnih letih predmet številnih taksonomskeh sprememb na podlagi hibridizacije DNK-DNK in sekvenc gena za 16S rRNK. (Jousimies-Somer in sod., 1995; Summanen in sod., 1993). Rod *Prevotella* združuje pigmentirane in nepigmentirane, saharolitične vrste. V rod *Porphyromonas* so vključene pigmentirane in nepigmentirane vrste, ki so asaharolitične ali šibko saharolitične. Predstavniki obeh rodov povzročajo okužbe različnih delov telesa.

Pigmentirane, anaerobne paličaste bakterije predstavljajo tako saharolitične kot nesaharolitične vrste iz rodov *Prevotella* in *Porphyromonas* (Jousimies-Somer in sod., 1995). V preglednici 4 so naštete vrste, ki jih najdemo v ustni votlini človeka.

Preglednica 4: Pigmentirane vrste iz rodov *Prevotella* in *Porphyromonas*, ki jih najdemo v ustni votlini človeka (Jousimies-Somer in sod., 1995)

Rod <i>Prevotella</i>	Rod <i>Porphyromonas</i>
<i>P. corporis</i>	<i>P. endodontalis</i> ¹
<i>P. denticola</i>	<i>P. gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>P. catoniae</i> ²
<i>P. loescheii</i>	
<i>P. melaninogenica</i>	
<i>P. nigrescens</i>	
<i>P. pallens</i>	
<i>P. tannerae</i>	

¹v ustni votlini se nahajajo tudi nepigmentirni sevi, ²nepigmentirana vrsta

Nekatere od zgoraj naštetih vrst so pomembni povzročitelji okužb v ustni votlini, okužb po ugrizih živali in drugih okužb. *P. gingivalis* je pomembna parodontopatogena bakterija. Povezujejo jo z agresivnimi oblikami parodontitisa pri odraslih in, skupaj z vrsto *P. endodontalis*, je pogosto vpletena v okužbe zobne korenine in zaplete teh okužb (Matto in sod., 1997). Griffen in sod. (1998) so odkrili bakterijo *P. gingivalis* v 79 % vzorcev iz parodontalnih žepov, medtem ko je bila v skupini z zdravimi posamezniki prisotna v manjšem številu.

Od pigmentiranih vrst *Prevotella* najpogosteje v vzorcih iz ustne votline najdemo vrsti *P. intermedia* in *P. nigescens*. Prvotno sta bili to ena vrsta, ki pa so ju ločili pred približno desetimi leti na podlagi homologije DNK, seroloških testov, raziskav izoencimov in celokupnih celičnih beljakovin. Številni avtorji so poročali o različni zastopanosti obeh vrst v vzorcih iz različnih delov ustne votline. *P. intermedia* je tako pogostejša v vzorcih iz parodontalnih žepov, medtem ko je *P. nigescens* pogostejša v vzorcih odvzetih z zdravih mest. Fenotipsko sta obe vrsti zelo podobni, zato je biokemična in serološka ločitev težavna in pogosto nezanesljiva (Frandsen in sod., 1995; Gmur in Thurnheer, 2002; Jousimies-Somer in sod., 1995). Ostale pigmentirane vrste so redkeje dokazali v vzorcih iz parodontalnih žepov (Dahlen, 1993; Hillman in sod., 1993)

Pigmentirane vrste *Prevotella* in *Porphyromonas* lahko tekom rasti na gojiščih, ki vsebujejo kri, tvorijo pigment (hem oziroma železov protoporfirin IX) in ga kopičijo na celični površini. Za nastanek pigmenta so potrebne molekule hemoglobina in kisik. Skupki pigmenta na celični površini služijo kot ovira pred vdorom kisika in reaktivnih kisikovih spojin v notranjost celice in so tako pomemben virulenčni dejavnik (Smalley in sod., 2003). Vrste iz obeh rodov tvorijo še številne druge virulenčne dejavnike. Za *P. gingivalis* je zlasti značilna tvorba različnih proteinaz, ki cepijo protitelesa in komponente komplementnega sistema, medtem ko je za *P. intermedia* značilno zlepjanje eritrocitov in hemolitična aktivnost. Pomembno dejstvo je tudi to, da so klinični izolati *P. intermedia* odporni na določene antibiotike. *P. intermedia* tako predstavlja pomemben vir genov, ki posredujejo odpornost na antibiotike, in ti se lahko prenašajo na druge ustne bakterije (Duncan, 2003)

Podobna okolja kot zgoraj opisane bakterije naseljujejo tudi nepigmentirane, saharolitične vrste *Prevotella*, občutljive na žolčne soli, katerim pa pripisujejo manjši pomen v razvoju parodontitisa (Jousimies-Somer in sod., 1995).

2.1.3 *Bacteroides forsythus* (*Tannerella forsythensis*)

Bakterijo so prvič opisali leta 1979 kot vretenasto bakterijsko vrsto iz rodu *Bacteroides* in jo nekaj let kasneje poimenovali *Bacteroides forsythus* (Tanner in sod., 1979; Takemoto in sod., 1997). V preteklosti so bile v rod *Bacteroides* uvrščene številne nove vrste, ki so bile kasneje premeščene v nove bakterijske rodove. Analiza sekvenc 16S rRNK je vodila do sklepa, da je tudi *B. forsythus* napačno uvrščen v rod *Bacteroides* (Paster in sod., 1994). Leta 2002 so Sakamoto in sod. predlagali nov rod *Tannerella* z eno bakterijsko vrsto *Tannerella forsythensis*.

B. forsythus (*T. forsythensis*) je vretenasta, po Gramu negativna paličasta bakterija in jo pogosto osamijo skupaj z vrstami *Campylobacter rectus*, *F. nucleatum* in *P. gingivalis*, kar nakazuje na ekološko zvezo naštetih bakterij (Jousimies-Somer in sod., 1995; Takemoto in sod., 1997). Rast v tekočih medijih je minimalna saj potrebuje zunanj vir N-acetilmuraminske kisline za pomnoževanje in vzdrževanje celične stene. Ker je znano, da človek ne more tvoriti N-acetilmuraminske kisline, je bakterija odvisna od ostalih bakterij, ki so prisotne v parodontalnih žepih. Znano je, da metaboliti *F. nucleatum* stimulirajo rast *B. forsythus*. To potrjuje tudi dejstvo, da je rast pogosto izboljšana okoli kolonij drugih bakterij predvsem fuzobakterij (satelitski fenomen) (Dzink in sod., 1987; Jousimies-Somer, 1995; Wyss, 1989). V diagnostiki so pomembne njene številne encimatske aktivnosti kot so tripsinu podobna aktivnost in nekatere druge encimatske aktivnosti. (Jousimies-Somer, 1995; Loesche in sod., 1990).

Bakterija je pomemben parodontopatogen v napredajočih oblikah parodontitisa in oblikah parodontitisa, ki se ne odziva na zdravljenje. Kamma in sod. (1994) so s pomočjo klasične bakteriološke diagnostike dokazali vrsto *B. forsythus* v 53 % parodontalnih vzorcev odvzetih iz bolnikov z agresivnim parodontitisom. Uporaba molekularnih metod pa

nakazuje, da je njena prevalenca v vzorcih iz parodontalnih žepov pri bolnikih s parodontitisom višja (Lotufo in sod., 1994; Tran in Rudney, 1999). Bakterija je redko prisotna pri zdravih posameznikih (Tran in Rudney, 1999).

Predmet številnih raziskav so različni virulenčni dejavniki, ki jih tvori bakterija in imajo verjetno patološko vlogo v razvoju parodontitisa. Med najpomembnejše sodita tripsinu podoben encim in sialidaza (Arakawa in sod., 2000; Hasebe in sod., 2004; Sabet in sod., 2003; Saito in sod., 1997; Sharma in sod., 1998).

2.1.4 Ustne treponeme

V zobni oblogi lahko najdemo različne spirohete, med katerimi pa je le nekaj takih, ki so jih uspeli kultivirati na umetnih gojiščih. Tiste, ki so bile kultivirane in identificirane do vrste, spadajo v rod *Treponema* (Choi in sod., 1994). Treponeme so spiralno oblikovani mikroorganizmi, ki v premer merijo od 0.15 do 0.30 μm , v dolžino od 5 do 16 μm . Ti morfološki parametri se razlikujejo od vrste do vrste, vendar v osnovi treponem ne moremo ločiti na podlagi teh parametrov. Identifikacija treponem temelji na nekaterih biokemičnih parametrov, v pomoč pa nam je tudi mikroskopija v temnem polju (Norris in Larsen, 1995). Uporabno orodje za dokazovanje in identifikacijo treponem v vzorcih zobnih oblog so različne molekularne metode (Asai in sod., 2002; Moter in sod., 1998). Molekularne metode zajamejo tudi vrste treponem, ki jih ni mogoče gojiti na umetnih gojiščih (Choi in sod., 1994).

Ustne treponeme redko najdemo na zdravi sluznici. Njihovo število in prevalenca se povečata pri bolnikih z gingivitisom in parodonotitisom. Pri bolnikih s parodontitisom so prisotne kar v 88 do 97 % (Moore in sod., 1987; Loesche in Grossman, 2001). Najpogosteje osamljena vrsta je *T. socranskii*, sledita ji *T. denticola* in *T. pectinovorum*. V vzorcih iz parodontalnih žepov najdemo tudi *T. vincentii*, *Treponema skoliodontum* in spodaj opisane ustne treponeme PROS (angl. pathogen-related oral spirohetes) (Norris in Larsen, 1995).

Pri bolniki z akutnim nekrotičnim ulceroznim gingivitisom in parodontitisom so našli ustne spirohete, ki so reagirale z monoklonskimi protitelesi uporjenimi proti bakterijski vrsti *Treponema pallidum*. Označili so jih s kratico PROS. Z oligonukleotidnimi lovками so pokazali, da PROS predstavljajo heterogeno skupino spirohet (skupina TRE I), od katerih je *T. vincentii* edina kultivirana vrsta (Choi in sod., 1996; Norris in Larsen, 1995). S primerjavo vzorcev iz parodontalnih žepov in vzorcev odvzetih z zdravih mest, so spirohete iz skupine TRE I našli v vseh vzorcih iz globokih parodontalnih žepov, v vzorcih iz plitvih žepov pa so bile dokazane v 34 %. *T. vincentii* je bila redko prisotna v vzorcih iz globokih parodontalnih žepov, medtem ko je v vzorcih iz plitvih žepov niso uspeli dokazati. *T. denticola* je bila prisotna v 62 % vzorcev iz globokih parodontalnih žepov. Ti rezultati namigujejo, da čeprav je *T. denticola* povezana z razvojem parodontitisa, verjetno ni najpomembnejša med spirohetami (Motter in sod., 1998).

Ustne treponeme tvorijo številne virulenčne dejavnike kot so proteinaze in fosfolipaze, toksini, vnetni mediatorji (lipoproteini, lipopolisharidi), protifagocitne molekule in encimi, ki režejo komponente komplementnega sistema (Edwards in sod., 2003).

2.1.5 Druge parodontopatogene bakterije

Ostale parodontopatogene bakterije večinoma lahko uvrstimo med anaerobne bakterijske vrste. Med najpomembnejšimi so po Gramu negativni koničasti bacili *F. nucleatum*, po Gramu negativni koki iz rodu *Veillonella*, *Selenomonas* in *Centipeda*, po Gramu pozitivni koki *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius* in *Streptococcus constellatus*, po Gramu pozitivni bacili iz rodu *Eubacterium* itd (Hillier in Moncla, 1995; Jousimies-Somer in sod., 1995).

Z razvojem parodontitisa so v preteklosti povezali še nekatere mikroaerofilne bakterijske vrste oziroma rodove, med katerimi so omembe vredne vrste iz rodu *Capnocytophaga*, *Eikenella corrodens* in *C. rectus* (Jousimies-Somer in sod., 1995; Loesche in Grossman, 2001; von Graevenitz in sod., 1995).

Očitno je, da v razvoj parodontitisa ni vpletena le ena bakterijska vrsta, temveč je to polimikrobna okužba, ki vključuje več različnih organizmov.

2.1.6 Mikrobeni kompleksi v zobni oblogi

Socransky (1998) je na podlagi rezultatov svoje raziskave, ki je bila izvedena na velikem številu vzorcev zobne oblage, določil pet glavnih mikrobnih kompleksov oziroma skupin, ki soobstajajo v zobni oblogi. V prvi ali t.i. rdeči kompleks je uvrstil bakterijske vrste *B. forsythus*, *P. gingivalis* in *T. denticola*. Osrednja skupina drugega ali oranžnega kompleksa predstavlja bakterije *F. nucleatum/periodonticum* ssp., *P. intermedia*, *P. nigrescens* in *P. micros*. Temu kompleksu so pridružene še druge bakterijske vrste: *Eubacterium nodatum*, *C. rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* in *Streptococcus constellatus*. Tretji kompleks tvorijo številne vrste iz rodu *Streptococcus*, četrti kompleks vključuje *Capnocytophaga* spp., *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* in *A. actinomycetemcomitans* serotip a, v peti kompleks pa se uvrščata vrsti *Veillonella parvula* in *Actinomyces odontolyticus*. *A. actinomycetemcomitans* serotip b glede na rezultate raziskave ni bil povezan z nobenim od naštetih kompleksov.

Z nadaljnjo obdelavo rezultatov je Socransky (1998) ugotovil, da je rdeči kompleks povezan z oranžnim kompleksom, kar pomeni, da je bakterije iz prvega kompleksa redko dokazal v vzorcih zobne oblage brez predstavnikov oranžnega kompleksa. Povezanost obeh kompleksov oziroma njihovih posameznih predstavnikov so nakazale tudi druge raziskave (Diaz in sod., 2002; Kolenbrander in sod., 1995; Kolendrander in sod., 2002). Največ je znanega o bakterijski vrsti *F. nucleatum*, ki verjetno predstavlja most med začetnimi in poznimi kolonizatorji zobne oblage. *F. nucleatum* je najpogosteja po Gramu negativna bakterijska vrsta v vzorcih odvzetih z zdravih mest in njen število opazno naraste v vzorcih odvzetih z mest, kjer se razvija parodontitis. Njena prisotnost je pogosto dokazana skupaj z bakterijami *T. denticola*, *P. gingivalis* in *B. forsythus*, kar nakazuje, da je bakterija verjetno potrebna za njihovo kolonizacijo (Diaz in sod., 2002; Jousimies-Somer in sod., 1995; Kolenbrander in sod., 1995; Kolenbrander in sod., 2002; Takemoto in sod., 1997).

Rdeči kompleks je bil v raziskavi Socransky-a najmočneje povezan s kliničnimi parametri, ki so pomembni pri diagnosticiranju parodontitisa. Tako so posamezne vrste iz rdečega kompleksa in celoten kompleks izkazovale močno povezavo z globino parodontalnega žepa in krvavitvijo iz dlesni. Podobno, vendar bolj ohlapno povezavo s kliničnimi parametri parodontitisa, lahko pripišemo tudi oranžnemu kompleksu. Zanimivo je, da mehansko zdravljenje, kot sta mehansko luščenje in glajenje zobne korenine, učinkovito odstrani predstavnike rdečega kompleksa, medtem ko praktično nima vpliva na ostale bakterijske vrste (Cugini in sod., 2000; Haffajee in sod., 1997; Simonson in sod., 1992). Zato bi bilo pomembno z zdravljenjem vplivati tudi na bakterijske vrste iz oranžnega kompleksa, ki očitno pripomorejo k pojavu bakterijskih vrst iz rdečega kompleksa v razvijajoči se zobni oblogi.

2.1.7 Prisotnost parodontopatogenih bakterij v slini

Slina je primeren vzorec za dokazovanje parodontopatogenih bakterij saj vsebuje različne bakterijske vrste iz različnih delov ustne votline (jezik, parodontalni žepi), hkrati pa je njeno vzorčenje lahko. Ustna flora, ki jo najdemo v slini zdravih posameznikov, se razlikuje od tiste, ki jo najdemo pri bolnikih s parodontitisom (Sakamoto in sod., 2000, 2003). Matto in sod. (1998) so s PCR iskali bakterijo *P. gingivalis* v vzorcih sline. Ugotovili so, da njena prevalenca v slini s starostjo narašča (63 % vzorcev sline pozitivnih v starostni skupini od 31 do 80 let), hkrati pa je tudi pogostejša v slini posameznikov s parodontitisom. Pri bolnikih s kroničnim parodontitisom je bila dokazana kar v 70 % vseh vzorcev sline.

V različnih raziskavah so parodontopatogene bakterije kot so *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *P. gingivalis* in različne treponeme pogosteje našli v slini kot v vzorcih iz parodontalnih žepov (Sakamoto in sod., 2001; Umeda in sod., 1998). Za preiskavo se odvzame celotno slino, ki pa seveda vsebuje višje koncentracije tarčnih bakterij kot vzorec iz parodontalnega žepa. Koncentracija parodontopatogenih bakterij lahko zelo varira od žepa do žepa, kar vpliva na njihovo zastopanost v vzorcu. (Sakamoto in sod., 2003).

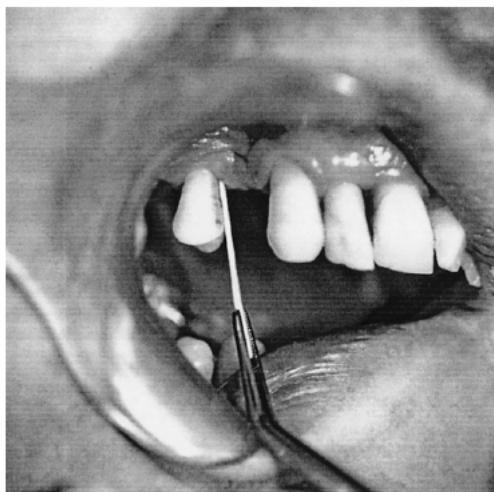
2.1 DOKAZOVANJE PARODONTOPATOGENIH BAKTERIJ

Dokazovanje parodontopatogenih bakterij kot pomoč pri usmerjanju zdravljenja parodontitisa je relativno nov koncept v dentalni medicini vendar se zelo hitro razvija v smislu tehničnih postopkov identifikacije, načina vzorčenja, kliničnih pokazateljev parodontitisa in standardizacije postopkov identifikacije med diagnostičnimi laboratoriji. Listgarten in Loomer (2003) sta se v svoji raziskavi spraševala ali je dokazovanje parodontopatogenih bakterij pravzaprav potrebno, glede na to, da večina zobozdravnikov še vedno prisega na tradicionalno neantibiotično zdravljenje parodontitisa. Celotna raziskava je bila zasnovana na 24 člankih, katerih večina je predstavljala opise primerov brez kontrol. 13 člankov je poročalo o dokazovanju parodontopatogenih bakterij kot pomoč pri zdravljenju parodontitisa, ostalih 11 člankov pa je poročalo o različnem kliničnem odzivu glede na izbrano zdravljenje parodontitisa. Zaključila sta, da sta antibiotično zdravljenje in torej dokazovanje parodontopatogenih bakterij zlasti pomembna za bolnike z agresivnim parodontitisom in za bolnike, ki se slabo odzivajo na tradicionalno zdravljenje.

2.1.1 Odvzem in transport vzorcev

Vzorce iz parodontalnih žepov odvzame zobozdravnik v zobozdravniški ordinaciji. Odvzemno mesto je pred vzorčenjem potrebno posušiti in po potrebi razkužiti. Sledi odstranitev zobne obloge, ki se je razvila nad mejo dlesni. Material iz parodontalnih žepov pridobimo z nežnim strganjem z ustreznim zobozdravniškim orodjem. Alternativno predstavljajo papirnata šilca, ki jih vstavimo v parodontalni žep za približno 10 sekund (slika 1). Ne glede na metodo vzorčenja pa je potrebno vzorec takoj shraniti v anaerobno transportno gojišče. Primera takih gojišč sta reducirano transportno gojišče RTF (angl. reduced transpor fluid) in gojišče VMGA III (angl. Viability-maintaining Gothenburg anaerobe) (Dahlen in sod., 1993; Jousimies-Somer H.R., 1995; Summanen in sod., 1993). Dahlen in sod. (1993) so primerjali obe transportni gojišči. Za boljše se je izkazalo gojišče VMGA III, saj je omogočalo preživetje višjega skupnega števila anaerobnih bakterijskih vrst. To si lahko razložimo z razlikami v sestavi in konsistenci obeh gojišč. Gojišče VMGA III je poltrdno gojišče in vzdržuje nizke vrednosti redoks potenciala tudi po vnosu vzorca v

gojišče. Lahko vsebuje tudi steklene kroglice, ki pospešijo razpad morebitnih agregatov v vzorcu. Za molekularno dokazovanje papirnata šilca vstavimo v prazno epruvetko.



Slika 1: Odvzem vzorca iz parodontalnega žepa s papirnatim šilcem (Conrads, 2001)

Pogoji in čas transporta naj ne bi vpliva na viabilnost in relativno zastopanost mikroorganizmov v vzorcu. Vzorci naj bi bili transportirani in hranjeni pri sobni temperaturi. Odsvetovano je shranjevanje vzorcev v hladilniku, ker kisik bolje difundira pri nižjih temperaturah, medtem ko hranjenje vzorca pri temperaturi inkubacije lahko vodi do razrasti določenih bakterijskih vrst in/ali izgube drugih bakterijskih vrst. Za molekularno dokazovanje niso potrebne žive bakterije, nasprotno pa je potrebno vzorce hrani v hladilniku (Jousimies-Somer H.R., 1995; Summanen in sod., 1993).

2.1.2 Klasična bakteriološka diagnostika parodontopatogenih bakterij

Klasična bakteriološka diagnostika parodontopatogenih bakterij vključuje osamitev in gojenje bakterij na ustreznih selektivnih gojiščih ter njihovo končno identifikacijo, ki temelji na biokemičnih oziroma fenotipskih lastnosti bakterij. Priporočljivo je, da so vsi koraki klasične bakteriološke diagnostike izvedeni v anaerobnem okolju (najbolje v anaerobnih komorah) z minimalno izpostavitvijo kisiku (Jousimies-Somer H.R., 1995; Summanen in sod., 1993).

2.5.2.1 Gojišča za osamitev parodontopatogenih bakterij

Za osamitev parodontopatogenih bakterij iz vzorcev so potrebna številna selektivna gojišča v kombinaciji z neselektivnim trdnim gojiščem, ki omogoča rast večine bakterij, in tekočim obogatitvenim gojiščem. Neselektivna trdna gojišča z različnimi osnovami se razlikujejo v njihovi sposobnosti podpirati rast določenih skupin anaerobnih bakterij. Izbiramo lahko med agarjem po Schaedler-ju, agarjem Brucella, gojiščem BHI (angl. brain heart infusion) itd. Vsem osnovnim gojiščem dodamo substrate (ovčja, konjska ali zajčja kri, vitamin K₁, hemin), ki podpirajo in izboljšajo rast anaerobov. Tekoče, tioglikolatno gojišče omogoča obogatitev kulture in tako predstavlja rezervo kulture, ki je potrebna kadar na gojiščih ni prisotna rast oziroma je le-ta minimalna. Tekočemu gojišču je potrebno dodati tudi določena hranila (npr.: N-acetilmuraminska kislina za *B. forsythus*) (Jousimies-Somer H.R., 1995; Summanen in sod., 1993).

Za osamitev pigmentiranih vrst *Prevotella* uporabimo gojišče KVLB (ang. kanamycin-vancomycin laked blood). To gojišče vsebuje dva antibiotika, kanamicin in vankomicin, in posebno obdelano ovčjo kri. Kri čez noč zamrznemo in naslednji dan odmrznemo. To sproži pokanje eritrocitov in s tem sproščanje hranil za anaerobne bakterije. Koncentracija vankomicina (7,5 µg/ml) zavira rast večine po Gramu negativnih, paličastih bakterij, med drugim tudi vrste iz rodu *Porphyromonas*. V tem primeru znižamo koncentracijo (2 µg/ml) omenjenega antibiotika (Jousimies-Somer H.R., 1995; Summanen in sod., 1993).

Za osamitev bakterije *T. forsythensis* so potrebna gojišča z različnimi osnovami (največkrat tryptic soy agar), katerim se doda kvasni ekstrakt, pepton in N-acetilmuraminska kislina. (Dzink in sod., 1987; Sabet in sod., 2003; Summanen in sod., 1993; Takemoto in sod., 1997).

Tudi za osamitev ustnih treponem iz vzorcev iz parodontalnih žepov potrebujemo selektivna gojišča, ki se razlikujejo od običajnih bakterioloških gojišč (Norris in Larsen, 1995; Edwards in sod., 2003). Taka gojišča so kompleksna po sestavi in vsebujejo peptone, kvasni ekstrakt, bistro rumensko tekočino in serum kot vir kratkih in dolgoverižnih

maščobnih kislin. Dodaten seleksijski pritisk lahko dosežemo z dodatkom antibiotikov kot sta rifampin ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) in polimiksin B ($800 \text{ U}/\text{ml}$). Na agar se nato položi sterilni nitrocelulozni filter s povprečno širino por med $0,15$ in $0,3 \mu\text{m}$, na katerega skupaj s 3% raztopljeno agarozo položimo sterilni obroč O. Na tako pripravljeno gojišče kapnemo vzorec. Treponeme so sposobne preiti preko filtra v spodaj ležeče gojišče, medtem ko ostale bakterije ostanejo ujete na površini. Po enem do dveh tednih inkubacije pri 37°C odstranimo nitrocelulozni filter. Meglen videz gojišča je znak prisotnosti treponem v vzorcu zobne oblage. Del gojišča, kjer je prisotna rast, lahko odstranimo in cepimo v tekoče ali poltrdno gojišče. Po dveh do treh dneh kulturo iz tekočega gojišča cepimo na trdno gojišče in tako dosežemo osamitev posameznih kolonij (Norris in Larsen, 1995; Edwards in sod., 2003).

Tudi vrsta *A. actinomycetemcomitans* ni izjema in za njeno osamitev iz parodontalnih vzorcev potrebujemo kompleksna, selektivna gojišča. Najpogosteje uporabljeno gojišče za osamitev *A. actinomycetemcomitans* je gojišče TSBV (ang. tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin) (Slots, 1982). Alsina in sod. (2001) so razvili novo gojišče na osnovi agarja BHI, imenovano Dentaid-1. To gojišče je v primerjavi z gojiščem TSBV bolj občutljivo za dokazovanje bakterije *A. actinomycetemcomitans* v vzorcih iz parodontalnih žepov. Hkrati bistveno bolje zavira rast morfološko podobne bakterije *H. aphrophilus*.

2.5.2.2 Identifikacija parodontopatogenih bakterij

Parodontopatogene bakterije so prisotne v mešanih kulturah skupaj z drugimi anaerobnimi in/ali aerobnimi oziroma fakultativnimi bakterijami. Na prisotnost anaerobov nakazujejo številni znaki kot so značilen vonj ob odprtju anaerobnih loncev ali vrečk, rast na selektivnih gojiščih in prisotnost črno pigmentiranih kolonij na gojišču KVLB ali neselektivnem gojišču. Pomembno je, da pozornost namenimo vsem morfološko različnim kolonijam. Pri precepljanju moramo biti hitri, saj nekatere anaerobne bakterijske vrste odmrejo že po relativno kratki izpostavitvi kisiku (npr: *F. nucleatum*, *Porphyromonas* sp.).

Bakterijo *A. actinomycetemcomitans* identificiramo na podlagi tipičnih kolonij, ki porastejo po 72 urah na selektivnem gojišču. Kolonije so okrogle, prosojne, lepljive z rahlo nepravilnimi robovi in premera 1 do 2 mm. V središču se tvori zvezdasta struktura. Vrsto potrdimo s pozitivno katalazno reakcijo in razmazom kulture obarvanim po Gramu. Od morfološko podobne vrste *H. aphrophilus* jo loči fermentacija laktoze in hidroliza ONPG (o-nitrofenil- β -D-galaktopiranozida) (Alsina in sod., 2001; Slots, 1982; von Graevenitz in sod., 1995).

Vrste iz rodu *Porphyromonas* je relativno lahko identificirati do vrstnega nivoja s pomočjo antibiotičnih diskov (preglednica 5) in rezultatov nekaterih testov kot so tvorba indola, katalaze in lipaze ter hitrih encimskih testov (API ZYM oziroma Rosco). Vrste, ki jih osamimo iz človeka, so večinoma katalaza negativne in občutljive na žolčne soli. Vrste lahko identificiramo tudi s pomočjo opečnato rdeče fluorescence pod UV lučjo, ki sicer ni značilna za vse vrste iz rodu *Porphyromonas*, in tvorbe pigmenta na gojiščih, ki vsebujejo kri. Kolonije po 48 urah inkubacije so majhne (< 1mm), sijoče in gladke. Pigment se navadno razvije šele po 3 do 7 dneh inkubacije. Rast je lahko izboljšana okoli kolonij drugih mikroorganizmov kot so stafilocoki (satelitski fenomen). Vrsto *P. gingivalis* lahko določimo na podlagi pigmentiranih kolonij, ki ne fluorescirajo pod UV lučjo, dalje na podlagi pozitivne tripinske reakcije, negativne fermentacije glukoze in laktoze in pozitivne tvorbe indola (Jousimies-Somer, 1995; Summanen, 1993).

Identifikacija pigmentiranih vrst iz rodu *Prevotella* pa je nasprotno precej težavna. Vrst *Prevotella loescheii*, *Prevotella tannerae*, *Prevotella* sp. sev DIC-20 in nekateri sevi *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella denticola*, *Prevotella enoeca* in *Prevotella veroralis* ni možno identificirati z običajnimi biokemičnimi testi; edina zanesljiva metoda je analiza celičnih maščobnih kislin (Jousimies-Somer, 1995).

Preglednica 5: Profil občutljivosti posameznih anaerobnih bakterij in bakterijskih skupin za antibiotike vankomicin, kanamicin in kolistin (Jousimies-Somer in sod., 1995)

Vrsta	vankomicin (5 µg)	kanamicin (1000 µg)	kolistin (10 µg)
skupina <i>B. fragilis</i>	R	R	R
<i>Porphyromonas</i> spp.	S	R	R
<i>Prevotella</i> spp.	R	Rs	V
<i>P. intermedia</i> - <i>P. nigrescens</i> - <i>P. pallens</i>	R	Rs	S
<i>P.loescheii</i>	R	R	V
ostale <i>Prevotella</i> sp.	R	R	V
<i>Campylobacter</i> spp.	R	S	S
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	R	S	S
<i>Capnocytophaga</i> spp.	R	S	R
<i>Leptotrichia</i> spp.	R	S	S
<i>Veillonella</i> spp.	R	S	S

R-odporen, S-občutljiv, Rs-večina izolatov odpornih, nekatere občutljive, V-variabilno

Indol in lipaza pozitivni kokobacili, ki tvorijo temen pigment ali rdeče fluorescirajo, lahko identificiramo kot skupino *P. intermedia*/*Prevotella nigrescens*. Obe vrsti sta si biokemično zelo podobni in ju prav tako na podlagi biokemičnih reakcij ne moremo ločiti. Razlikovanje *P. intermedia* in *P. nigrescens* temelji na elektroforetski gibljivosti določenih encimov (npr. glutamat dehidrogenaze in malat dehidrogenaze) ali molekularnih metodah (Dahlen in sod., 1996; Jousimies-Somer, 1995; Matto in sod., 1997). *Prevotella pallens* je podobna obema vrstama z razliko tvorbe lipaze, ki je negativna, in svetlejšega pigmenta. Vse indol negativne vrste je potrebno identificirati dalje z drugimi biokemičnimi testi. Lipaza pozitivni, indol negativni, pigmentirani gram negativni bacili so lahko vrsta *P. loescheii*. Večina pigmentiranih vrst je tudi hemolitičnih. Določeni sevi pigmentiranih *Prevotella* spp. potrebujejo za razvoj pigmenta več kot 21 dni (predvsem vrsta *P. loescheii*) in jih zato lahko zamenjamo z nepigmentirano vrsto *P. veroralis*. Vrste *Prevotella* lahko ločimo od rodu *Porhyromonas* (nesaharolitične vrste) s fermentacijo glukoze, ki je pri vrstah *Prevotella* pozitivna, in na podlagi profila odpornosti na določene antibiotike (preglednica 5). (Jousimies-Somer, 1995; Summanen, 1993).

Bakterijska vrsta *B. forsythus* je vretenast bacil, ki izkazuje različne encimske aktivnosti, med drugim tudi aktivnost tripsina, N-acetil-beta-glukozaminidaze, alfa-fukozidaze in beta-glukuronidaze. Omenjene encimatske aktivnosti in potreba po zunanjem viru N-acetilmuraminske kisline so diagnostično pomembne. Kolonije so roza ali rumeno bele barve, lisaste, včasih v obliki krofa s prosojno cono. Bakterija zato pogosto tvori satelitske kolonije okoli kolonij drugih mikroorganizmov, zlasti fuzobakterij (Jousimies-Somer in sod., 1995; Summanen in sod., 1993; Takemoto in sod., 1997).

Če so v vzorcu iz parodontalnih žepov prisotne spirohete, lahko hitro ugotovimo z mikroskopijo v temnem polju, ki nam hkrati da tudi informacijo o morfoloških lastnostih treponem. Za identifikacijo ustnih treponem je diagnostičnega pomena njihova gibljivost, ki jo izkoristimo že pri sami osamitvi treponem. Za določitev do vrste pa so pomembni naslednji biokemični parametri: zahteve po določenih hranih, fermentacija ogljikovih hidratov in encimatske aktivnosti (Norris in Larsen, 1995; Edwards in sod., 2003).

2.5.2.3 Hitri identifikacijski sistemi

Za identifikacijo anaerobnih bakterij so danes dostopni številni hitri sistemi (rezultati v 2 do 4 urah), ki temeljijo na encimatski razgradnji substratov pri čemer se sprostijo kromogeni in/ali fluorogeni substrati. Ti sistemi so primerni za identifikacijo počasi rastočih, zahtevnih, po Gramu negativnih bacilov in kokov, saj ni potrebna rast v testnem gojišču. Točnost hitrih identifikacijskih testov lahko povečamo z določenimi preprostimi testi. Dva izmed takih sistemov sta BBL Crystal Anaerobe (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, ZDA) in Rapid ID 32A (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija). Identifikacijski sistem BBL Crystal Anaerobe uspešno identificira večino testiranih sevov *Prevotella* in *Porphyromonas* do vrstnega nivoja. Pravilno uvrsti tudi 92,6 % testiranih sevov iz rodu *Fusobacterium* in 88,2 % sevov iz rodu *Peptostreptococcus*. Sistem Rapid ID 32A pa pravilno identificira 95,5 % testiranih sevov iz rodu *Fusobacterium*. Podobno pravilno uvrsti testirane seve *Prevotella* in *Porphyromonas* do nivoja rodu, vendar pa je manj natančen na vrstnem nivoju (Cavallaro in sod., 1997; Downes in sod., 1999; Jousimies-Somer in sod., 1995).

2.1.3 Molekularna bakteriološka diagnostika

Zaradi številnih pomanjkljivosti klasične bakteriološke diagnostike so se začele razvijati različne molekularne metode, ki predstavljajo hitro, preprostejšo in bolj zanesljivo možnost dokazovanja parodontopatogenih bakterij v vzorcih iz parodontalnih žepov. Molekularne metode temeljijo na različnih principih PCR kot so naključni PCR (AP-PCR; angl. arbitrarily primed polymerase chain reaction), PCR v realnem času, večkratni PCR (angl. multiplex PCR), različica večkratnega PCR t.i. kompetitivni PCR, zelo pogosto pa so v uporabi različne hibridizacijske metode (Boutaga in sod., 2005; Conrads, 2001; Doungudomdacha in sod., 2000; Gersdorf in sod., 1993; Lau in sod., 2004; Moncla in sod., 1990; Nonnenmacher in sod., 2004; Sakamoto in sod., 2001; Tran in Rudney, 1999). V številnih raziskavah so bile nove molekularne metode primerjane s klasično bakteriološko diagnostiko kot primarnim standardom in pogosto jim je bila pripisana visoka občutljivost in nizka specifičnost. Nizka specifičnost izhaja iz dejstva, da je nova molekularna metoda dosegla večje število pozitivnih vzorcev v primerjavi s klasično bakteriološko diagnostiko. To lahko pomeni, da je molekularna metoda dokazala bakterije, ki niso tarčne bakterije ali pa je klasična diagnostika nezanesljiva v zaznavanju tarčnih bakterij (Loesche in sod., 1992b).

2.5.3.1 Komercialno dostopni molekularni testi

V zadnjih nekaj letih so na tržišču postali dostopni različni molekularni testi, ki obljubljajo hitro in enostavno dokazovanje parodontopatogenih bakterij. Nekaj let je bil komercialno dostopen test DMDx/PATHOTEK ameriškega proizvajalca OmniGene Laboratory Services (Cambridge, ZDA), ki je temeljil na principu hibridizacijskih metod. Test sedaj lahko uporablja le nekateri laboratoriji, med katerimi je tudi laboratorij ANAWA (Wangen, Švica). V letu 2000 je bilo v Evropi izvedenih kar 16000 takih testov za dokazovanje parodontopatogenih bakterij. Na evropskem tržišču pa so prisotni tudi drugi molekularni testi, ki temeljijo na hibridizacijskih metodah. Molekularni test IAI Pado Test 4.5 (Institute for Applied Immunology, Zuchwil, Švica) je dostopen le v nekaterih evropskih državah (Švica, Nemčija in Nizozemska) in temelji na dokazu parodontopatogenih bakterij z

radioaktivno označenimi lovki. Proizvajalec LCL Biokey GmbH (Aachen, Nemčija) ponuja test LCL, ki temelji na podobni metodologiji, le da so lovki kemiluminiscentno označene. Oba proizvajalca letno izvedeta približno 10000 testov. Za test LCL je znano, da povpraševanje po njem hitro narašča (Conrads, 2001).

Da bi povečali specifičnost molekularnih metod za dokazovanje parodontopatogenih bakterij, so se na tržišču pojavili testi, ki združujejo različne molekularne tehnike (Conrads, 2001). Dva izmed takih testov sta tudi micro-IDent in micro-IDent plus proizvajalca Hain Lifescience (Nehren, Nemčija). Oba testa združujeta pomnoževanje značilnih odsekov parodontopatogenih bakterij s PCR (t.i. večkratni oziroma multiplex PCR) in nato dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z vrstno značilnimi lovki vezanimi na nitrocelulozno membrano. V procesu hibridizacije se na z biotinom označene produkte PCR veže konjugat streptavidina in encima alkalne fosfataze. Ob dodatku substrata za encim pride do barvne reakcije, intenziteta katere je v razmerju s količino DNK v vzorcu. Molekularni test micro-IDent omogoča dokazovanje petih parodontopatogenih bakterij (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* in *T. denticola*), medtem ko je molekularni test micro-IDent plus razširjena različica in omogoča dokazovanje dodatnih šestih pardontopatogenih bakterij (*P. micros*, *F. nucleatum/periodonticum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens* in *Capnocytophaga* sp). Proizvajalec priporoča uporabo obej testov pri bolnikih s parodontalnimi žepi globljimi od 4 mm in dobro ustno higieno. V primeru parodontalnih žepov globljih od 5 mm, je priporočljivo testirati vse bolnike. Rezultati obej testov so znani v bistveno krajšem času (5 do 6 ur), kot je to mogoče s klasično bakteriološko diagnostiko, pri kateri običajno od obdelave vzorca do končne identifikacije preteče 7 ali celo več dni. Glede na rezultate molekularnega testa zobozdravnik predpiše ustrezno kombinacijo mehanskega in antibiotičnega zdravljenja. Po končanem zdravljenju je molekularno testiranje priporočljivo ponoviti. V primeru pozitivnih rezultatov proizvajalec priporoča uporabo testa GenoType PST, ki omogoča dokazovanje polimorfizma v skupini genov za IL-1 in temelji na enakem principu kot omenjena molekularna testa.

V prihodnosti velik pomen pripisujejo hitrim molekularnim testom, ki omogočajo rezultate v roku ene ure (angl. chair-side DNA probe assay). Eden izmed takih testov je Periodontal Microbial Identification Test (Saigene Corp, Bothell, ZDA) (Conrads, 2001).

2.1 ZDRAVLJENJE PARODONTITISA

Zdravljenje parodontitisa lahko razdelimo na tradicionalno neantibiotično zdravljenje, antibiotično zdravljenje in kombinacijo obeh zdravljenj (Loesche in Grossman, 2001). Carvalho in sod. (2005) so v svoji raziskavi razdelili bolnike s parodontitisom v skupine z različnim načinom zdravljenja. Tri mesece po končanem zdravljenju so v vzorcih iz parodontalnih žepov s pomočjo hibridizacijske metode iskali spremembe v mikrobi ni združbi. Vsi načini zdravljenja so uspešno znižali koncentracije parodontopatogenih bakterij (*P. gingivalis*, *B. forsythus* in *Treponema denticola*). Za najbolj uspešne so se izkazale kombinacije različnih načinov zdravljenja.

2.1.1 Tradicionalno mehansko zdravljenje

Tradicionalno zdravljenje parodontitisa temelji na predpostavki, da je vzrok parodontitisa nespecifična razrast bakterij na zobni površini in da lahko rast bakterij kontroliramo s profesionalnim čiščenjem zob, ki vključuje mehansko luščenje, glajenje zbrane korenine in operacijske posege. Zobna obloga pogosto poapni, kar vodi v razvoj zognega kamna. Če se zobi kamen tvori pod mejo dlesni, je brez operacijskega posega težko odstranljiv s površine zbrane korenine. Kljub operativni odstranitvi zognega kamna še vedno ostanejo globoki parodontalni žepi, ki pa se jih prav tako lahko zmanjša z operacijo. Omenjeni zobozdravniški posegi skupaj z ustrezno ustno higieno in nadaljnji rednimi obiski zobozdravstvene ordinacije, lahko onemogočijo ponovno akumulacijo bakterij, s čimer je preprečena ponovitev vnetja in resorbkcije kosti. Takšen način zdravljenja parodontalne bolezni predstavlja osnovo v zdravljenju parodontitisa, ki je sicer relativno učinkovito vendar hkrati tudi drago (Loesche in Grossman, 2001).

Z omenjenimi postopki pogosto ne moremo odstraniti vseh bakterij z zobne površne. Le-te se lahko ponovno namnožijo do te mere, da ponovno pride do razvoja bolezni. Vir parodontopatogenih bakterij v takih primerih verjetno predstavljajo zobna korenina in kanalčki v zobovini. S pomočjo elektronskega mikroskopa je že bilo dokazano, da te bakterije lahko ponovno poselijo zobne površine (Loesche in Grossman, 2001). Hirschfeld in Wasserman (1978) sta v raziskavi, ki je trajala približno 20 let, opazila, da se vsi bolniki ne odzivajo enako na mehansko zdravljenje. Večina bolnikov (83,2 %) je predstavljala skupino z dobrim odzivom na zdravljenje, medtem ko so bili ostali bolniki (16,8 %) razdeljeni v skupine s slabim oziroma zelo slabim odzivom na zdravljenje. Ta dejstva si verjetno lahko razložimo z zgoraj naštetimi razlogi.

Haffajee in sod. (1997) so šest mesecev po končanem mehanskem zdravljenju (mehansko luščenje in glajenje koreninske površine) z različnimi vrstno-specifičnimi lovkami preučevali vpliv zdravljenja na mikrobno floro v vzorcih zobne oblage, ki so jih odvzeli bolnikom s kroničnim parodontitismom. 39 bolnikov (69 %) se je odzvalo na zdravljenje. V povprečju se je število parodontopatogenih bakterij (*P. gingivalis*, *T. denticola* in *B. forsythus*) pri slednjih bolnikih zmanjšalo, kar je bilo opazno tudi eno leto po končanem zdravljenju (Cugini in sod., 2000; Loesche in Grossman, 2001). V raziskavi so hkrati pokazali vzročno povezavo med kajenjem in razvojem parodontitisa, saj so se kadilci slabše odzivali na zdravljenje. Podoben odziv na zdravljenje so opazili tudi Colombo in sod. (1998). Bolniki, vključeni v to raziskavo, so prejeli mehansko luščenje in glajenje koreninske površine ter po potrebi parodontalno operacijo in sistemsko zdravljenje s tetraciklinom. Pri bolnikih s slabim odzivom na zdravljenje so bile v večjem številu prisotne bakterije iz rodu *Streptococcus*, predvsem *S. constellatus*. Poleg omenjene so bile prisotne tudi bakterije *Acinetobacter baumannii*, *Gemella haemolysans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus warneri* in *Pseudomonas aeruginosa*. Teh vrst običajno ne najdemo v vzorcih zobne oblage in njihova prisotnost bakterij je lahko posledica zdravljenja z antibiotiki (Colombo in sod., 1998; Loesche in Grossman, 2001).

Posamezni avtorji so poročali, da imajo bolniki s slabim odzivom na zdravljenje anaerobno floro, ki je značilna za kronične in agresivne oblike parodontitisa. V eni izmed takih raziskav so v vzorcih zobne oblage našli parodontopatogene bakterije kot so *B. forsythus* (v

84 % vzorcev), spirohete (83 %), vrste iz rodu *Fusobacterium* (68 %), *P. gingivalis* (63 %) in *A. actinomycetemcomitans* (16 %) (Listgarten in sod., 1993; Loesche in Grossman, 2001).

Pri bolnikih z dobrim odzivom na mehansko zdravljenje je bil opazen začetni upad števila bakterij, vendar pa so se koncentracije bakterij vrnile na vrednosti pred zdravljenjem. Za spirohete je ta čas približno 3 do 4 mesece. Če torej zobne obloge ne odstranjujemo pogosto, lahko zopet pride do vnetnega odziva dlesni in do povrnitve bolezni. Zobozdravniški standard tako priporoča, da naj bi se bolniki vračali na mehansko zdravljenje na vsake 3 do 6 mesecev do konca življenja (Loesche in Grossman, 2001).

2.1.2 Antibiotično zdravljenje

Najpogosteje uporabljen antibiotik je metronidazol zaradi dejstva, da so vzrok parodontitisa večinoma anaerobne bakterije. Metronidazol skupaj z mehanskim luščenjem in glajenjem koreninske površine se je izkazal za učinkovito dopolnilno zdravljenje. Pri bolnikih, ki so prejeli metronidazol, je prišlo do izboljšanja klinične slike in zmanjšanja števila parodontopatogenih bakterij hkrati pa je bila bistveno zmanjšana potreba po parodontalni operaciji kot pri bolnikih, ki so prejeli standardno zdravljenje (Loesche in sod., 1992a).

Spoznanje, da so v razvoj parodontitisa vpletene specifične bakterijske vrste, je sprožilo pretirano uporabo in zlorabo sistemskih antibiotikov za zdravljenje parodontitisa. Zaradi teh in drugih razlogov so začele farmacevtske družbe izdelovati nosilce, ki sproščajo antibiotik direktno v parodontalni žep. Njihova učinkovitost je podobna učinkovitosti sistemskih antibiotikov hkrati pa z njihovo uporabo obidemo probleme, ki nastopijo zaradi sistemskih antibiotikov (Loesche in Grossman, 2001).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

V okviru diplomskega dela smo uporabili naslednja gojišča:

- transportno gojišče za anaerobe VMGA III (preglednica 6)
- obogateno tioglikolatno gojišče
- agar po Schaedler-ju za izolacijo anaerobnih bakterij
- KVLB z zmanjšano koncentracijo vankomicina za izolacijo bakterijskih vrst iz rodov *Prevotella* in *Porphyromonas* (preglednica 7; Summanen in sod., 1993) in
- Dentaid-1 za izolacijo bakterije *A. actinomycetemcomitans* (preglednica 8; Alsina in sod., 2001).

Preglednica 6: Sestava transportnega gojišča VMGA III (Doan in sod., 1999)

Želatina	5 %
Pepton	0.05 %
Spran agar	0.2 %
Tioglikolna kislina	0.05 %
L-cistein-HCl	0.05 %
Na glicerofosfat	1.0 %
Fenilživosrebrov acetat	0.0005 %
Metilensko modrilo	0.0003 %
CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.024 %
KCl	0.42 %
NaCl	0.1 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 %

Preglednica 7: Sestava gojišča KVLB (Summanen in sod., 1993)

Agar Brucella	43 g
Raztopina hemina (5mg/ml)	1 ml
Raztopina vitamina K1 (1 mg/ml)	1 ml
Raztopina kanamicina (100 mg/ml)	0,75 ml
Destilirana voda	1000 ml
Raztopina vankomicina (2 mg/ml)	1 ml
Likirana ovčja kri (čez noč zamrznjena in nato odtajana)	50 ml

Preglednica 8: Sestava gojišča Dentaid-1 (Alsina in sod., 2001)

Agar BHI (brain heart infusion)	
Kvasni ekstrakt	5 g
Natrijev fumarat	1,5 g
Natrijev format	1 g
Raztopina vankomicina	9 µg/ml
Destilirana voda	1000 ml

Kot pozitivno kontrolo za test hidrolize ONPG smo uporabili standardni sev *E. coli* ATCC 25922, standardni sev *P. gingivalis* ATCC 33277 pa nam je služil kot pozitivna kontrola za test tvorbe indola in za molekularni test micro-IDent.

3.2 METODE

3.2.1 Odvzem, transport in hranjenje vzorcev

V raziskavo smo vključili 16 bolnikov s parodontitisom (10 žensk in 6 moških s starostjo med 26 in 70 let). Pri vsakem bolniku je zobozdravnik iz zasebne zobozdravnische ordinacije Simed (Zaloška 159, Ljubljana) s sterilnimi papirnatimi šilci odvzel vzorce iz najglobljih parodontalnih žepov (z globino ≥ 5 mm) in vzorce sline pred začetkom zdravljenja parodontitisa ter vzorčenje ponovil pri 15 bolnikih 3 do 4 tedne po mehanskem zdravljenju.

Vzporedno so bili odvzeti vzorci za klasično bakteriološko diagnostiko in za molekularno bakteriološko diagnostiko (za vsako skupno 99 vzorcev). Za klasično diagnostiko je dal zobozdravnik papirnata šilca takoj v 2 ml transportnega gojišča za anaerobe VMGA III, za molekularno metodo pa v sterilne epruvetke. Vzorci so bili preneseni v laboratorij v roku 3 ur po vzorčenju pri sobni temperaturi oziroma temperaturi atmosfere. Vzorce za klasično diagnostiko smo hranili pri temperaturi inkubacije, vzorce za molekularno diagnostiko pa smo do obdelave hranili največ en teden pri 4 °C.

3.2.2 Obdelava vzorcev za klasično bakteriološko diagnostiko in pogoji inkubacije

Vzorce za klasično bakteriološko diagnostiko smo obdelali takoj po njihovem prenosu v laboratorij. Pri tem smo pazili na čim krajšo izpostavitev kisiku. Vzorce smo najprej 3 minute vorteksirali, s čimer smo dosegli enakomerno razporeditev bakterij v vzorcu, in jih s pomočjo sterilne Pasteur-jeve pipete cepili v/na izbrana tekoča (obogateno tioglikolatno gojišče) in trdna gojišče (agar po Schaedler-ju ter selektivni gojišči KVLB in Dentaid-1). Pri klasični bakteriološki kultivaciji smo se osredotočili na tri parodontopatogene bakterije: *P. intermedia*, *P. gingivalis* in *A. actinomycetemcomitans*. Plošče s Schaedler-jevim agarjem in gojiščem KVLB smo inkubirali v anaerobnih loncih 48 ur pri temperaturi 37 °C, plošče z gojiščem Dentaid-1 pa v inkubatorju s 5 % CO₂ 72 ur pri 35 °C. Nacepljeno obogateno tioglikolatno gojišče smo inkubirali pri 37 °C.

3.2.3 Klasična bakteriološka diagnostika

3.2.3.1 Osamitev parodontopatogenih bakterij

Gojišča smo pregledali na morebitno rast šele po 48 urah, saj je večina anaerobnih bakterij najbolj občutljivih na kisik tekom logaritemske faze rasti. V primeru odsotnosti rasti na trdih gojiščih smo inkubacijo podaljšali na minimalno sedem dni, hkrati pa smo precepili obogateno kulturo iz tioglikolatnega gojišča. Plošče Dentaid-1 smo pregledali na prisotnost tipičnih kolonij *A. actinomycetemcomitans* po 72 urah.

Vse morfološko različne kolonije smo opisali in precepili na selektivno ali neselektivno gojišče za nadaljnjo 48 urno anaerobno inkubacijo. Poleg tega smo precepili kolonije na neselektivni krvni agar za test tolerance za kisik in razmaz kulture obarvali po Gramu. Primarne plošče smo ponovno inkubirali in jih po 48 urah pregledali na morebitne nove morfotipe in tvorbo pigmenta.

3.2.3.2 Identifikacija parodontopatogenih bakterij

Izolate, ki niso porasli na krvnem agarju pri aerobnih pogojih inkubacije, smo identificirali s hitrim identifikacijskim sistemom za anaerobe BBL Crystal Anaerobe (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, ZDA). V ta namen smo v testnem gojišču, ki je priloženo kompletu testa BBL Crystal Anaerobe, najprej pripravili bakterijsko suspenzijo gostote 4 McF (McFarland). Gostoto smo izmerili z nefelometrom proizvajalca BD Diagnostic Systems (Franklin Lakes, ZDA). Tako pripravljeno bakterijsko suspenzijo smo nalili v ustrezeni nosilec in pokrili s pokrovom, na katerega so bili nanešeni ustrejni substrati. Sledila je 4-urna inkubacija pri temperaturi 37 °C. Rezultate smo odčitali s čitalcem proizvajalca BD Diagnostic Systems. Izolate, ki jih nismo uspeli identificirati z omenjenim hitrim testom smo nato skušali identificirati s hitrim testom Rapid ID 32A (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija). Tudi v tem primeru smo pripravili gosto bakterijsko suspenzijo (več kot 3 McF), ki smo jo izmerili z nefelometrom proizvajalca bioMerieux (Marcy l'Etoile, Francija), in nato suspenzijo odpipetirali v nosilec z izbranimi substrati. Rezultate smo odčitali po 4 urah s čitalcem francoskega proizvajalca bioMerieux.

Večino izolatov (32 od skupno 41), ki smo jih s pomočjo hitrih sistemih za anaerobe identificirali kot vrsta *P. intermedia*, molekularni test ni potrdil. Zato smo te izolate skušali identificirati s klasičnimi biokemičnimi testi kot so tvorba indola, tvorba lipaze in profil odpornosti na izbrane antibiotike. Za ugotavljanje tvorbe indola smo omenjene izolate *P. intermedia* cepili v tekoče gojišče s triptofanom. Inkubirali smo do pojava vidne rasti in nato dodali nekaj kapljic Kovach-evega reagenta. V primeru pozitivne reakcije je prišlo na stiku reagenta in tekočega gojišča do razvoja rožnatega obroča. Vse omenjene izolate smo cepili tudi na gojišče z jajčnim rumenjakom za tvorbo lipaze. Inkubirali smo v anaerobnih

pogojih pri 37 °C in gojišča pregledovali na vsakih 48 ur. Bakterijske lipaze hidrolizirajo trigliceride do glicerola in prostih maščobnih kislin. Ker so maščobne kisline netopne, njihova prisotnost povzroči motnost in mavričen sijaj gojišča v bližini bakterijskih kolonij. Določeni bakterijski izolati potrebujejo za tvorbo lipaze nekoliko več časa, zato smo vse plošče z jajčnim rumenjakom inkubirali do enega tedna. Profil občutljivosti bakterijskih izolatov *P. intermedia* smo ugotavljali z difuzijsko metodo z diskami, in sicer za set antibiotikov za anaerobe Taxo (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, ZDA), ki vključuje antibiotike vankomicin, penicilin, kanamicin, rifampin in kolistin. Bakterijsko suspenzijo gostote 1 McF smo cepili na agar po Schaedler-ju in nato naj položili omenjene antibiotične diske. Po 48 urni anaerobni inkubaciji smo odčitali premer cone inhibicije. Tri izmed omenjenih izolatov smo obdelali po postopku za molekularno diagnostiko parodontopatogenih bakterij, ki je podrobnejše opisan v nadaljevanju.

Kolonije z zvezdasto notranjo strukturo smo cepili na Dentaid-1 in krvni agar za test tolerance za kisik. Plošče Dentaid-1 smo inkubirali od 24 do 48 ur v mikraerofilnih pogojih, medtem ko smo plošče s krvnim agarjem inkubirali v aerobnih pogojih pri 37 °C. Hkrati smo izvedli reakcijo za dokaz katalaze in razmaz kulture pobarvali po Gramu. Reakcijo za dokaz katalaze smo potrdili na subkulturi. Izolate smo testirali še za fermentacijo laktoze in fermentacijo maltoze. Za ugotavljanje obeh reakcij smo 24 ali 48-urno bakterijsko kulturo cepili v gojišče z laktozo oziroma maltozo kot edinim virom ogljika. Spremembo barve gojišča smo odčitali po 24 urah oziroma po 48 urah v primeru fermentacije laktoze, saj je večina izolatov *H. aphrophilus* pozitivnih šele po tem času. Vse izolate s tipičnimi kolonijami za *A. actinomycetemcomitans* smo testirali tudi za hidrolizo ONPG. Bakterijsko kulturo smo cepili v gojišče z ONPG, v katerega smo nato dodali kapljico toluena. Sledila je 20 minutna inkubacija pri temperaturi 37 °C. Razvoj rumene barve gojišča je pomenil pozitiven rezultat.

Vse izolate, ki smo jih identificirali kot *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* ali *P. gingivalis*, smo shranili na -80 °C.

3.2.4 Molekularna bakteriološka diagnostika

3.2.4.1 Izolacija DNK iz vzorcev iz parodontalnih žepov in vzorcev sline

Iz vzorcev odvzetih iz parodontalnih žepov smo najprej izolirali DNK z izolacijskim setom QiaAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Nemčija) po postopku izolacije DNK iz parodontopatogenih bakterij. V sterilni epruvetki smo za en vzorec združili 180 µl pufra ATL (angl. Tissue Lysis Buffer) in 20 µl encima proteinaze K ter dobro premešali. Po 200 µl pripravljene raztopine smo dodali v epruvetko z vzorcem (papirnatim šilcem) in vorteksirali 30 sekund. Sledila je 10-minutna inkubacija pri temperaturi 70 °C, v času katere je prišlo do lize bakterijskih celic. Po inkubaciji smo vzorce blago centrifugirali in nato dodali 200 µl pufra AL (angl. Lysis Buffer). Vzorce smo dobro premešali in inkubirali 5 minut pri temperaturi 95 °C. Po inkubaciji je sledilo blago centrifugiranje. V epruvetke smo nato dodali 200 µl etanola (96-100 %). Mešanico smo dobro premešali, blago centrifugirali in prenesli v mikrokolono vloženo v zbiralno epruvetko. Sledilo je enominutno centrifugiranje pri 8000 rpm. Izpirek smo zavrgli, mikrokolono pa prestavili v novo zbiralno epruveto in dodali 500 µl pufra za spiranje AW1 (angl. Wash Buffer 1). Ponovno je sledilo enominutno centrifugiranje pri 8000 rpm. Izpirek smo zavrgli, mikrokolono prestavili v novo zbiralno epruveto in dodali 500 µl drugega pufra za spiranje AW2 (angl. Wash Buffer 2). Vzorce smo centrifugirali 3 minute pri 14000 rpm. Da bi popolnoma odstranili pufer za spiranje, smo mikrokolono prestavili v novo zbiralno epruveto in ponovili centrifugiranje pri 14000 rpm, tokrat 1 minuto. Po centrifugiranju smo mikrokolono prestavili v 1,5 ml epruvetko, dodali 200 µl elucijskega pufra AE (angl. Elution Buffer) in inkubirali nekaj minut pri sobni temperaturi. Sledilo je enominutno centrifugiranje pri 8000 rpm. Z dodatkom omenjenega pufra dosežemo elucijo na filter vezane DNK. Postopek elucije DNK smo ponovili, s čimer smo pridobili večjo količino izolirane DNK. Izolirano DNK smo do nadaljnje obdelave hranili na -20 °C.

3.2.4.2 Izolacija DNK iz po Gramu negativnih bakterij

DNK seva *P. gingivalis* ATCC 33277 in treh izolatov, ki smo jih s klasično diagnostiko identificirali kot *P. intermedia*, smo izolirali po postopku izolacije DNK iz po Gramu negativnih bakterij. V epruvetko smo najprej dodali 180 µl pufra ATL. V tega smo prenesli nekaj kolonij *P. gingivalis* oziroma že omenjenih izolatov *P. intermedia*, ki so porasle po 48 urah na gojišču po Schaedler-ju. Dodali smo 20 µl encima proteinaze K in dobro premešali. Mešanico smo inkubirali 30 minut pri temperaturi 56 °C. Sledilo je blago centrifugiranje, dodatek 200 µl pufra AT in 10-minutna inkubacija pri temperaturi 70 °C. Ostali koraki izolacije DNK so podobni korakom pravkar opisanega postopka izolacije DNK iz vzorcev iz parodontalnih žepov in vzorcev sline. Izolirano DNK smo do nadaljnje obdelave hranili na -20 °C.

3.2.4.3 Sestava reakcijske mešanice in pogoji PCR

Pomnoževanje bakterijske DNK smo izvedli v inštrumentu Thermal Cycler (Eppendorf, Hamburg, Nemčija). Reakcijsko mešanico smo pripravili v hladnem bloku v prostoru brez proste DNK. Raztopino izolirane DNK smo dodali v ločenem prostoru. Za pomnoževanje DNK smo za en vzorec uporabili 17,5 µl raztopine PN, ki vsebuje vrstno značilne oligonukleotidne, dNTP (deoksinukleotidtrifosfat) in barvila (Hain Lifescience, Nehren, Nemčija), 2,5 µl 10x pufra za PCR (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija), 2 µl 25 mM raztopine MgCl₂ (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija), 0,2 µl (1U) FastStart Taq DNK polimeraze (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemčija), 0,3 µl sterilne vode in 2,5 µl izolirane DNK. Skupni volumen reakcijske mešanice je tako znašal 25 µl.

Reakcija PCR je potekala po naslednjem postopku (preglednica 9):

- a) Preinkubacija, ki je potekala 5 minut pri temperaturi 95 °C. Prvi korak je potreben za aktivacijo FastStart DNK plimeraze in razdvajanje tarčne DNK.
- b) Pomnoževanje kontrolnega odseka in vrstno značilnih odsekov gena za 16S rRNK, ki je potekalo v dveh različnih temperturnih ciklih:

- 10 temperturnih ciklov, kjer je razdvajanje tarčne DNK potekalo 30 sekund pri temperaturi 95 °C, pripajanje oligonukleotidnih začetnikov in sinteza nove verige DNK pa je potekalo 2 minuti pri temperaturi 58 °C
 - 20 temperturnih ciklov, kjer je razdvajanje tarčne DNK potekalo 25 sekund pri 95 °C, pripajanje oligonukleotidnih začetnikov na komplementarna mesta tarčne DNK 40 sekund pri 53 °C in sinteza nove verige DNK 40 sekund pri 70 °C.
- c) Zadnji podaljšan cikel je trajal 8 minut pri 70 °C.

Pridelke PCR smo hranili na -20 °C.

Preglednica 9: Pogoji pomnoževanja vrstno značilnih odsekov DNK petih parodontopatogenih bakterij

	Temperatura (°C)	Čas (s)	Število ciklov
Aktivacija FastStart			
in razdvajanje tarčne DNK	95	300	1
Podvajanje kontrolnega odseka	95	30	10
in vrstno značilnih odsekov gena za 16S rRNK	58	120	
	95	25	
	53	40	20
Končni podaljšan korak	70	40	
	70	480	1

3.2.4.4 Dokaz pridelkov PCR z reverzno hibridizacijo

Pred začetkom hibridizacije smo najprej pripravili ustrezne reagente. Hibridizacijski pufer HYB (angl. Hybridization Buffer) in raztopino za spiranje STR (angl. Stringent Wash Solution) smo ogreli na 45 °C. Ostale reagent, z izjemo koncentriranega konjugata CON-C (angl. Conjugate Concentrate) in koncentriranega substrata SUB-C (angl. Substrate Concentrate), smo ogreli na sobno temperaturo. CON-C in SUB-C smo razredčili 1:100 z

ustreznim pufrom (CON-C s pufrom CON-D in SUB-C s pufrom SUB-D), dobro premešali in postavili na sobno temperaturo. CON-C smo razredčili pred vsako uporabo, medtem ko sprotna priprava SUB-C ni bila potrebna, saj je razredčen substrat obstojen 4 tedne pri sobni temperaturi in zaščiten pred svetlobo.

Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z značilnimi lovkami za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano smo izvedli po naslednjem postopku. V kot banjice smo za vsak vzorec odpipetirali 20 µl denaturacijske raztopine DEN (angl. Denaturation Solution). Raztopini smo dodali 20 µl pomnoženega vzorca, dobro premešali in inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. V tem času je prišlo do razklenitve dvoverižne molekule DNK. Po inkubaciji smo dodali 1 ml ogretega hibridizacijskega pufra HYB. Raztopino smo blago premešali do homogene barve. Pri tem smo pazili, da se ne bi mešanica razlila v sosednje banjice, saj bi s tem zanesli nekaj DNK v drug vzorec in tako končni rezultati ne bi imeli pomena. S pinceto smo nato v banjice z vzorci položili nitrocelulozne membrane. Sledila je 30-minutna inkubacija pri temperaturi 45 °C v avtomatiziranem stresalniku in vodni kopeli AutoLipa (Innogenetics, Gent, Belgija). Ta inkubacija omogoča vezavo vrstno značilnih odsekov DNK pomnoženih v procesu PCR na lovke, ki so vezane na membrano. Po končani inkubaciji smo popolnoma odstranili hibridizacijski pufer in dodali 1 ml raztopine STR za spiranje nespecifično vezane DNK. Sledila je 15-minutna inkubacija pri temperaturi 45 °C. Vsi naslednji koraki so bili izvedeni pri sobni temperaturi. Raztopino STR smo popolnoma odstranili in nato izprali membrane z raztopino RIN (angl. Rinse Solution) ob rahlem stresanju na stresalniku. Po enominutni inkubaciji smo raztopino popolnoma odstranili in dodali 1 ml razredčenega konjugata. Sledila je 30-minutna inkubacija ob rahlem stresanju. Konjugat vsebuje na streptavidin vezan encim alkalno fosfatazo. Streptavidin posreduje vezavo na biotin, ki označuje odseke DNK pomnožene v procesu PCR. Raztopino konjugata smo odstranili in nato sprali nespecifično vezan konjugat dvakrat po eno minuto z 1 ml raztopine RIN in enkrat po eno minuto z 1 ml destilirane vode ob rahlem stresanju. Raztopino smo vsakič odstranili. Po spiranju smo v banjice dodali 1 ml razredčenega substrata, ki ga encim alkalna fosfataza razgradi do netopnih modro oziroma vijolično obarvanih produktov. Inkubirali smo v temi brez stresanja 3 do 20 minut. Podaljšana inkubacija vodi do povečanega obarvanja ozadja,

kar lahko oteži interpretacijo rezultatov. Reakcijo smo ustavili z dvakratnim spiranjem z destilirano vodo. Membrane smo s pinceto odstranili iz banjic in jih posušili s pivnikom.

3.2.5 Statistična obdelava podatkov

Razlike v rezultatih molekularne metode za pet parodontopatogenih bakterij pred in po mehanskem zdravljenju smo statistično ovrednotili s testom χ^2 (statistični program SPSS). V primeru *F. nucleatum*, *P. micros* in predstavnikov oranžnega kompleksa smo statistično ovrednotili razlike v rezultatih klasične bakteriološke diagnostike. Kot statistično značilno smo upoštevali vrednost $p < 0,05$.

4 REZULTATI

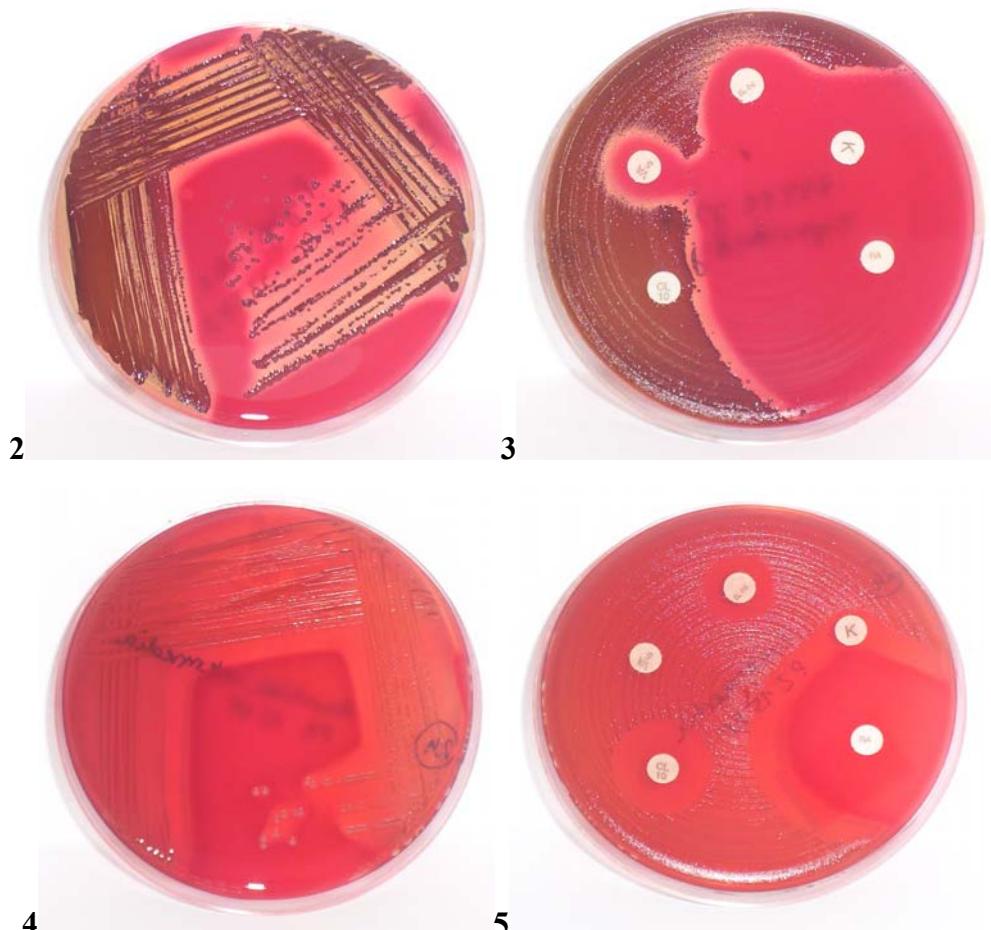
4.1 Rezultati pred mehanskim zdravljenjem

4.1.1 Rezultati klasične bakteriološke diagnostike

Pri klasični bakteriološki diagnostiki smo dokazovali tri parodontopatogene bakterije: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in *P. intermedia*. Od nacepitve vzorca na gojišča do identifikacije bakterijskih izolatov *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in *P. intermedia* je v povprečju trajalo 7 dni. Pri počasi rastočih bakterijah, kot je na primer *P. gingivalis*, se je celoten postopek zavlekel tudi preko enega tedna.

Pred mehanskim zdravljenjem smo vrsto *P. gingivalis* (sliki 2 in 3) osamili v 5 (13,9 %), *P. intermedia* (sliki 4 in 5) v 24 (66,7 %) in *A. actinomycetemcomitans* (slika 6) v 10 (27,8 %) od skupaj 36 vzorcev iz parodontalnih žepov.

Nekaterih temno pigmentiranih izolatov nismo uspeli identificirati s hitrim identifikacijskim sistemom BBL Crystal Anaerobe. V takih primerih smo uporabili sistem Rapid ID 32A, ki je omenjene izolate identificiral kot *P. intermedia*. Za kar 16 (66,7 %) izolatov od skupno 24, katere smo s pomočjo hitrih identifikacijskih sistemov identificirali kot *P. intermedia*, je bil molekularni test negativen. Te izolate smo na podlagi pozitivne tvorbe indola, pozitivne tvorbe lipaze in profila odpornosti na določene antibiotike uvrstili v skupino *P. intermedia/nigrescens*. Obeh vrst na podlagi fenotipskih lastnosti nismo mogli ločiti. Tri od omenjenih izolatov smo obdelali po postopku za molekularni test, na podlagi katerega nobenega od izolatov nismo potrdili kot bakterijsko vrsto *P. intermedia*.

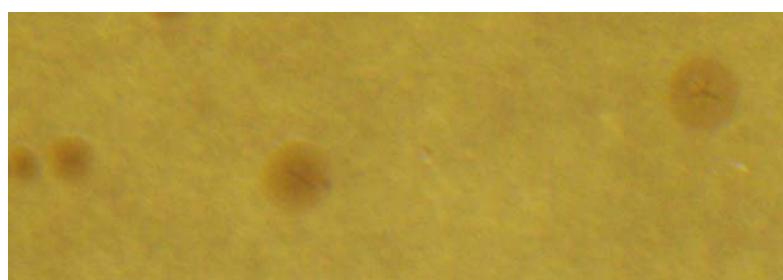


Slika 2: Izolat *P. gingivalis* osamljen iz vzorca iz parodontalnega žepa 45 ML pri bolniku P6 (agar po Schaedler-ju, 7 dni)

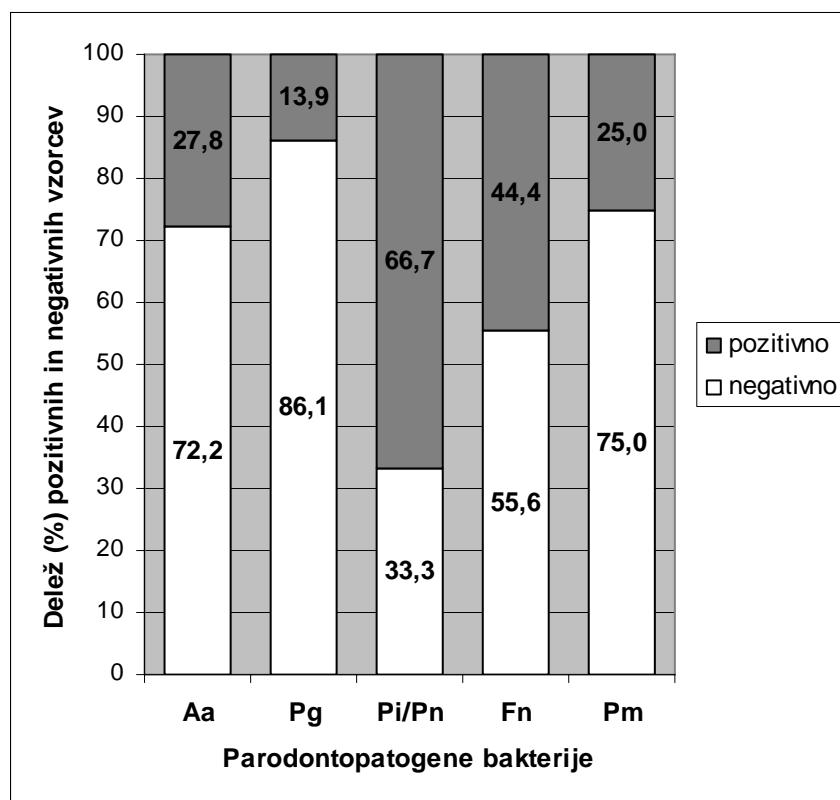
Slika 3: Profil odpornosti izolata *P. gingivalis* na antibiotike vankomicin, penicilin, kanamicin, rifampin in kolistin (odporen na kolistin in občutljiv za ostale antibiotike; agar po Schaedler-ju, 7 dni)

Slika 4: Izolat *P. intermedia* osamljen iz vzorca iz parodontalnega žepa 15 DP pri bolniku P8 (agar po Schaedler-ju, 48 ur)

Slika 5: Profil odpornosti izolata *P. intermedia* na antibiotike vankomicin, penicilin, kanamicin, rifampin in kolistin (odporen na vankomicin in kanamicin ter občutljiv za ostale antibiotike; agar po Schaedler-ju, 48 ur)



Slika 6: Značilna morfologija bakterijskega izolata *A. actinomycetemcomitans* osamljenega iz vzorca iz parodontalnega žepa 25 DB pri bolniku P16 (gojišče Dentaid-1, 5 dni; povečano 10-krat)

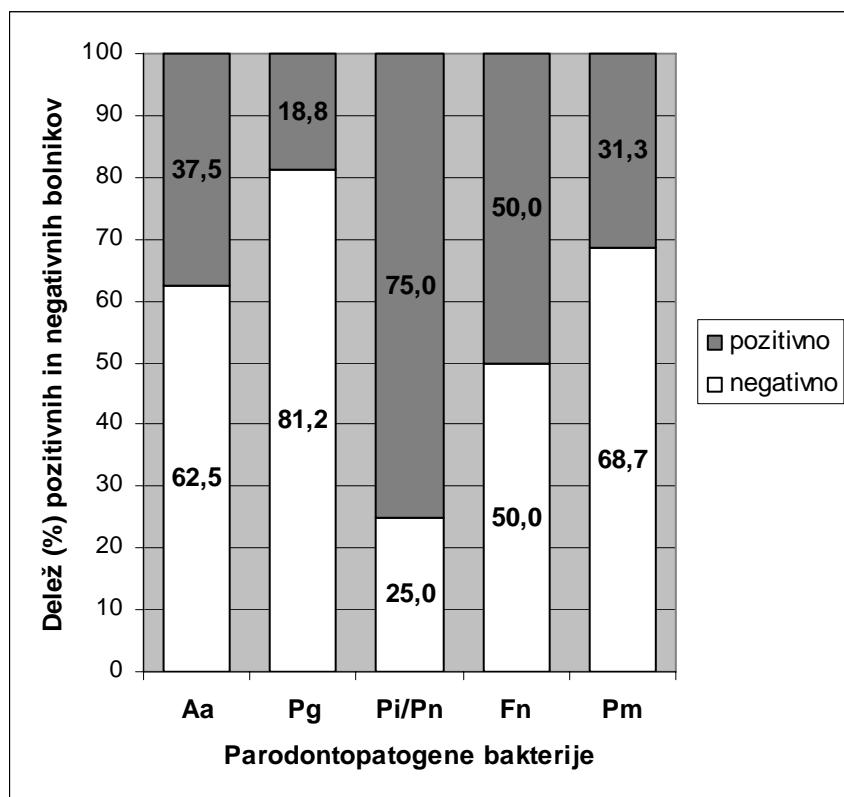


Slika 7: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih s klasično bakteriološko diagnostiko v 36 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih 16 bolnikom s parodontitisom pred mehanskim zdravljenjem (Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Fn- *F. nucleatum* in Pm- *P. micros*)

V številnih vzorcih iz parodontalnih žepov smo s pomočjo klasične bakteriološke diagnostike dokazali tudi druge parodontopatogene bakterije. Omembne vredni sta bakteriji *F. nucleatum* in *P. micros*. Pred zdravljenjem smo *F. nucleatum* osamili v 16 (44,4 %) vzorcih in *P. micros* v 9 (25 %) od skupaj 36 vzorcev iz parodontalnih vzorcev. Našteti podatki so grafično predstavljeni na sliki 7 (zgoraj).

Iz šestih (16,7 %) od skupaj 36 vzorcev s klasično diagnostiko nismo osamili nobene od parodontopatogenih bakterij. Iz devetih (25 %) vzorcev smo osamili le eno parodontopatogeno vrsto; v šestih (16,7 %) primerih *P. intermedia/nigrescens*, v dveh (12,5 %) primerih *A. actinomycetemcomitans* in v enem (2,8 %) *F. nucleatum*. Najpogostejša kombinacija je bila *P. intermedia/nigrescens/F. nucleatum*, osamili smo jo iz sedmih (19,4 %) od skupaj 36 vzorcev.

S klasično bakteriološko diagnostiko smo pred zdravljenjem dokazali prisotnost bakterije *P. gingivalis* pri treh (18,8 %), *A. actinomycetemcomitans* pri 6 (37,5 %), skupino *P. intermedia/nigrescens* pri 12 (75 %), *F. nucleatum* pri 8 (50 %) in *P. micros* pri 5 (31,3 %) od skupaj 16 bolnikov s parodontitisom (slika 8).



Slika 8: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih s klasično bakteriološko diagnostiko pri 16 bolnikih s parodontitisom pred mehanskim zdravljenjem
(Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Fn- *F. nucleatum* in Pm- *P. micros*)

Iz štirih (21,1 %) vzorcev od skupaj 19 vzorcev sline smo osamili skupino *P. intermedia/nigrescens*. Za tri omenjene izolate je bil molekularni test negativen. *P. gingivalis* in *A. actinomycetemcomitans* ter ostalih parodontopatogenih bakterij v vzorcih sline s klasično bakteriološko diagnostiko nismo dokazali. Skupino *P. intermedia/nigrescens* smo dokazali v slini štirih (25 %) od skupaj 16 bolnikov s parodontitisom.

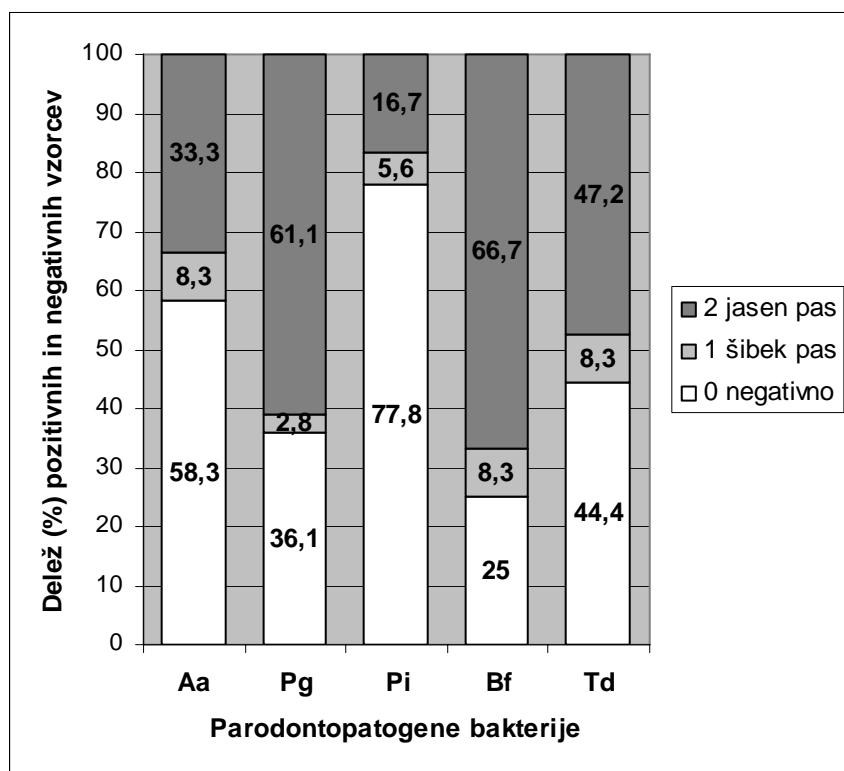
4.1.2 Rezultati molekularne metode

Postopek dokazovanja parodontopatogenih bakterij v vzorcih iz parodontalnih žepov z molekularnim testom micro-IDent je trajal približno 5-6 ur. Najpogosteje dokazana bakterija v vzorcih iz parodontalnih žepov z molekularno metodo micro-IDent je bila *B. forsythus*, dokazali smo jo v 27 (75 %) od skupaj 36 vzorcev iz parodontalnih žepov. Z visokim številom oziroma deležem pozitivnih vzorcev ji sledita *P. gingivalis*, ki smo ga dokazali v 23 (63,9 %) vzorcih, in *T. denticola*, ki smo jo dokazali v 20 (55,6 %) vzorcih iz parodontalnih žepov. *A. actinomycetemcomitans* smo dokazali v 15 (41,7 %) vzorcih. V najnižjem številu vzorcev, 8 (22,2 %), smo dokazali prisotnost *P. intermedia*. Podatki so prikazani v preglednici 10 in na sliki 9. Pozitivne vzorce smo razdelili na tiste, pri katerih je prišlo do razvoja jasnih pasov in na tiste, pri katerih je prišlo do razvoja šibkih pasov.

Preglednica 10: Dokazovanje petih parodontopatogenih bakterij z molekularnim testom micro-IDent v 36 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih 16 bolnikom s parodontitisom pred mehanskim zdravljenjem

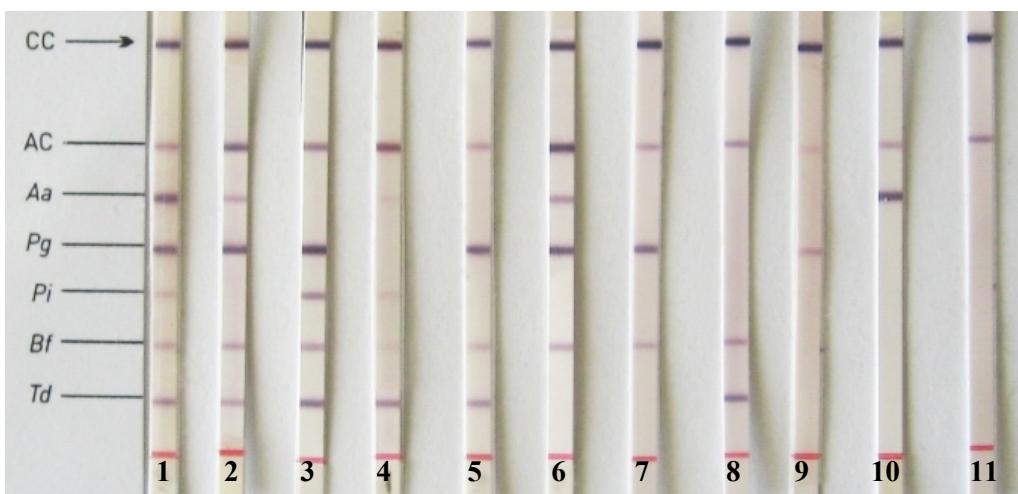
Število (delež- %) pozitivnih vzorcev za ustrezne parodontopatogene bakterije (n=36)					
	<i>Aa</i>	<i>Pg</i>	<i>Pi</i>	<i>Bf</i>	<i>Td</i>
pozitivni vzorci	15 (41,7)	23 (63,9)	8 (22,2)	27 (75,0)	20 (55,6)
2 (jasen pas)	12 (33,3)	22 (61,1)	6 (16,7)	24 (66,7)	17 (47,2)
1 (šibek pas)	3 (8,3)	1 (2,8)	2 (5,6)	3 (8,3)	3 (8,3)

(Aa- *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus* in Td- *T. denticola*; n- število vzorcev iz parodontalnih žepov)



Slika 9: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih z molekularnim testom micro-IDent v 36 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih 16 bolnikom s parodontitom pred mehanskim zdravljenjem (Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus*, Td- *T. denticola*)

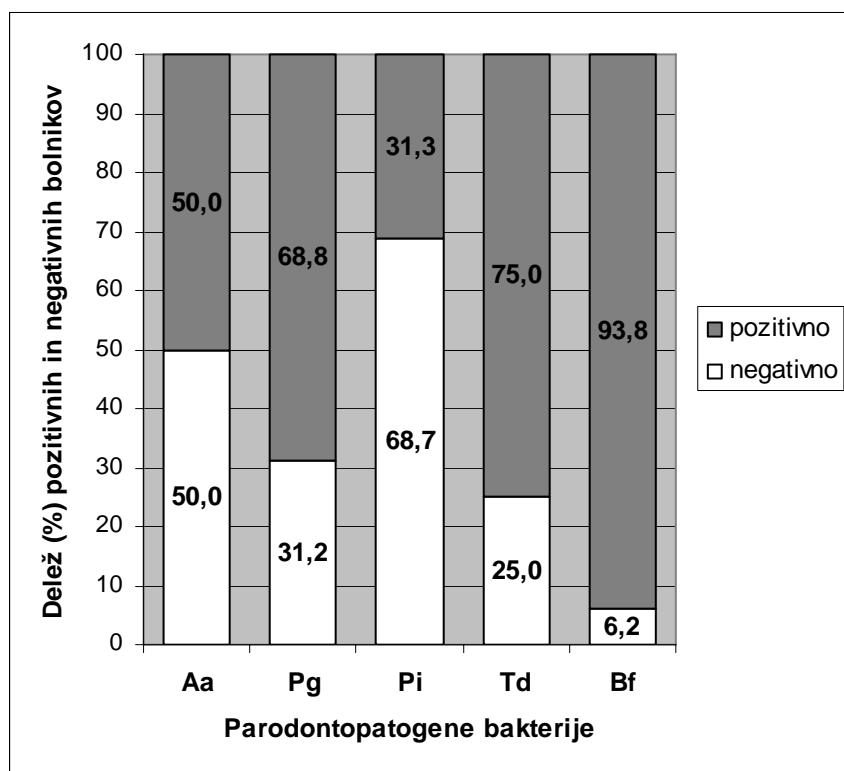
Od 36 vzorcev iz parodontalnih žepov jih je bilo pet (13,9 %) negativnih za pet parodontopatogenih bakterij. V dveh (5,6 %) vzorcih smo dokazali le eno parodontopatogeno bakterijo, v obih primerih je bila to bakterija *P. gingivalis* (slika 10). V vseh ostalih vzorcih (80,6 %) nam je uspelo dokazati prisotnost dveh ali več parodontopatogenih bakterij. V treh (8,3 %) vzorcih je bilo navzočih vseh pet vrst (slika 10). Kombinacije *B. forsythus/T. denticola*, *P. gingivalis/B. forsythus* in *A. actinomycetemcomitans/P. gingivalis/B. forsythus* (slika 10) so bile najpogostejše. Prisotne so bile v 4 (11,1 %) od skupaj 36 vzorcev iz parodontalnih žepov.



Slika 10: Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z lovki značilnimi za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano za različne vzorce iz parodontalnih žepov odvzetih 16 bolnikom s parodontitisom pred in po mehanskem zdravljenju
(CC- kontrola hibridizacije, AC- kontrola pomnoževanja, Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus*, Td- *T. denticola*; membrana 1- pozitivno za vseh pet parodontopatogenih bakterij; membrana 2- pozitivno za vrste *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* in *T. denticola*; membrana 3- pozitivno za vrste *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* in *T. denticola*; membrana 4- pozitivno za vrste *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *B. forsythus* in *T. denticola*; membrana 5- pozitivno za vrste *P. gingivalis*, *B. forsythus* in *T. denticola*; membrana 6- pozitivno za vrste *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in *B. forsythus*; membrana 7- pozitivno za vrsti *P. gingivalis* in *B. forsythus*; membrana 8- pozitivno za vrsti *B. forsythus* in *T. denticola*; membrana 9- pozitivno za vrsto *P. gingivalis*; membrana 10- pozitivno za vrsto *A. actinomycetemcomitans*; membrana 11- negativne vzorec)

Z molekularno metodo smo pred zdravljenjem vrsto *B. forsythus* dokazali pri 15 (93,8 %), *T. denticola* pri 12 (75 %), *P. gingivalis* pri 11 (68,8 %), *A. actinomycetemcomitans* pri 8 (50 %) in *P. intermedia* pri 5 (31,3 %) bolnikih s parodontitisom (slika 11). Pri enem bolniku (6,3 %) z molekularno metodo nismo dokazali nobene od petih parodontopatogenih bakterij. Pri treh (18,8 %) od skupaj 16 bolnikov s parodontitisom smo dokazali prisotnost vseh petih bakterijskih vrst. Najpogosteji kombinaciji sta bili *B. forsythus/T. denticola* in *A. actinomycetemcomitans/P. gingivalis/B. forsythus*, dokazali smo ju pri treh (18,8 %) od skupaj 16 bolnikov s parodontitisom.

S pomočjo molekularne metode smo parodontopatogene bakterije dokazali tudi v slini. Pred zdravljenjem smo vrsto *P. gingivalis* dokazali v štirih (21,1 %), *A. actinomycetemcomitans* in *T. denticola* v dveh (10,5 %) ter *P. intermedia* in *B. forsythus* v enim (5,3 %) od skupaj 19 vzorcev sline. Bakterija *P. gingivalis* je bila prisotna v slini treh (18,8 %), vrsti *A. actinomycetemcomitans* in *T. denticola* v slini dveh (12,5 %) ter *P. intermedia* in *B. forsythus* v slini enega (6,3 %) od skupaj 16 bolnikov s parodontitisom.



Slika 11: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih z molekularnim testom micro-IDent pri 16 bolnikih s parodontitisom pred mehanskim zdravljenjem
(Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus*, Td- *T. denticola*)

Bakterijske vrste rdečega kompleksa so bile prisotne v 30 (83,3 %) od skupaj 36 vzorcev iz parodontalnih žepov oziroma pri 15 (93,8 %) od skupaj 16 bolnikov s parodontitisom. Vse tri vrste so bile prisotne v 12 (33,3 % vseh vzorcev oziroma 40 % vseh vzorcev z rdečim kompleksom) vzorcih oziroma pri 7 (43,8 % vseh bolnikov oziroma 46,7 % vseh bolnikov z rdečim kompleksom) bolnikih. Če združimo rezultate klasične bakteriološke diagnostike in molekularne metode, smo navzočnost predstavnikov oranžnega kompleksa dokazali v 29 (80,5 %) od skupaj 36 vzorcev iz parodontalnih žepov oziroma pri 14 (87,5 %) od skupaj 16 bolnikov s parodontitisom. *F. nucleatum*, *P. intermedia/nigrescens* in *P. micros* skupaj smo dokazali v 5 (13,8 % vseh vzorcev oziroma 17,2 % vseh vzorcev z oranžnim kompleksom) vzorcih oziroma pri štirih (25 % vseh bolnikov oziroma 28,6 % vseh bolnikov z oranžnim kompleksom) bolnikih s parodontitisom. Prevlačevala je *P. intermedia/nigrescens* kot edina bakterijska vrsta, ki je bila prisotna v 11 (30,6 % vseh vzorcev oziroma 37,9 % vseh vzorcev z oranžnim kompleksom) vzorcih oziroma pri 5 (31,3 % vseh bolnikov oziroma 35,7 % vseh bolnikov z oranžnim kompleksom) bolnikih. V

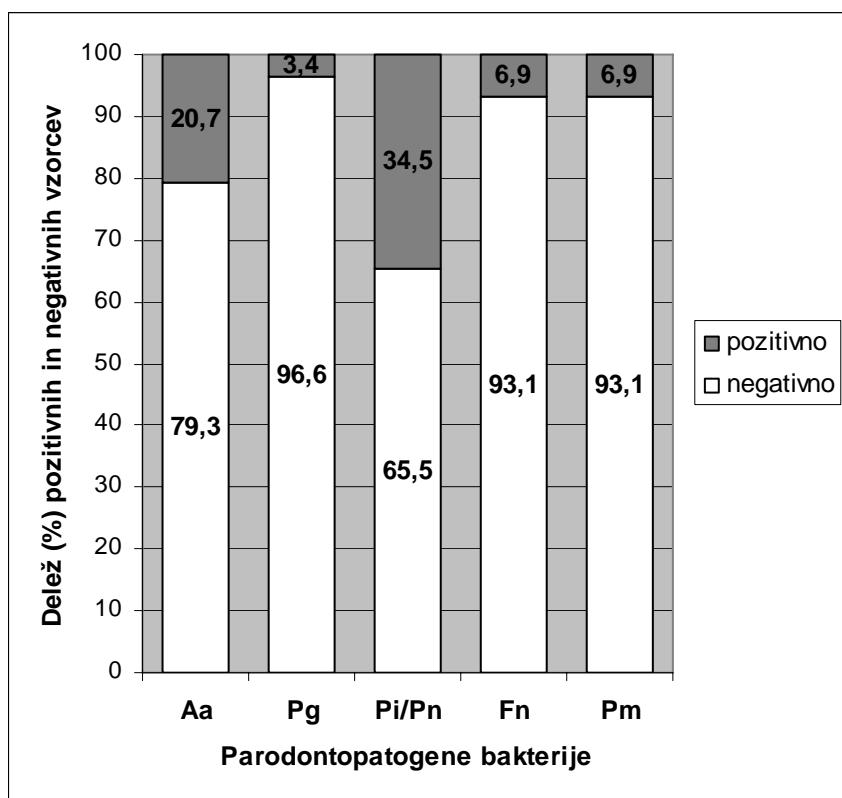
25 (69,4 %) vzorcih oziroma pri 13 (81,3 %) bolnikih smo poleg rdečega kompleksa dokazali tudi prisotnost oranžnega kompleksa. Prisotnost vseh sedmih parodontopatogenih bakterij smo z uporabo obeh metod dokazali v enem (2,8 %) vzorcu, v 30 (83,3 %) vzorcih so bile prisotne več kot tri bakterijske vrste.

4.2 Rezultati po mehanskem zdravljenju

4.2.1 Rezultati klasične bakteriološke diagnostike

Po zdravljenju smo bakterijo *P. gingivalis* dokazali le v enem (3,4 %) od 29 vzorcev iz parodontalnih žepov. Vrsto *A. actinomycetemcomitans* smo osamili iz šestih (20,7 %) vzorcev, skupino *P. intermedia/nigrescens* pa iz 10 (34,5 %). Podatki so grafično predstavljeni na sliki 12. Tudi po zdravljenju smo se v primeru izolatov, ki smo jih identificirali kot *P. intermedia*, soočili s podobnim problemom kot pri izolatih osamljenih iz vzorcev odvzetih pred zdravljenjem. Od skupno 10 izolatov jih je bilo kar 7 (70 % vseh izolatov) negativnih z molekularnim testom. Tudi te izolate smo na podlagi pozitivne tvorbe indola, pozitivne tvorbe lipaze in profila občutljivosti na določene antibiotike uvrstili v skupino *P. intermedia/nigrescens*. Enega od omenjenih izolatov smo s hitrim identifikacijskim sistemom identificirali kot vrsto *Porphyromonas asaccharolytica*. Izolat smo glede na stopnjo pigmentacije, profila občutljivosti za antibiotike ter pozitivne tvorbe indola in pozitivne tvorbe lipaze uvrstili v skupino *P. intermedia/nigrescens*, kar je potrdil tudi identifikacijski sistem Rapid ID 32A.

Bakteriji *F. nucleatum* in *P. micros* smo po mehanskem zdravljenju osamili v dveh (6,9 %) od skupaj 29 vzorcev iz parodontalnih žepov (slika 12).

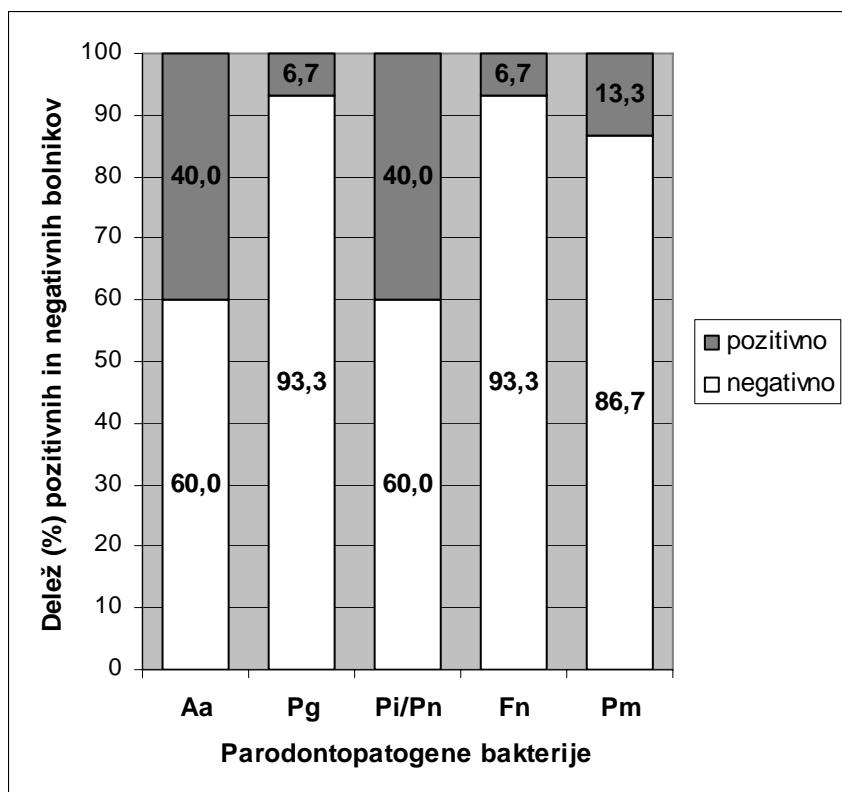


Slika 12: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih s klasično bakteriološko diagnostiko v 29 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih 15 bolnikom s parodontitisom po mehanskem zdravljenju (Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi/Pn- *P. intermedia/nigrescens*, Fn- *F. nucleatum* in Pm- *P. micros*)

Po zdravljenju v 13 (44,8 %) vzorcih iz parodontalnih žepov s klasično bakteriološko diagnostiko nismo dokazali nobene od parodontopatogenih bakterij. V 11 (37,9 %) vzorcih smo dokazali prisotnost le ene od parodontopatogenih bakterij; v petih primerih (17,2 %) in hrati največkrat osamljena je bila bakterijska skupina *P. intermedia/nigrescens*, v dveh primerih (8,7 %) smo kot edino parodontopatogeno bakterijo osamili *P. micros*, *F. nucleatum* ali *A. actinomycetemcomitans*. Najpogostejsa kombinacija je bila *A. actinomycetemcomitans/P. intermedia/nigrescens* in je bila prisotna v 4 (13,8 %) vzorcih iz parodontalnih žepov.

Pri petih (33,3 %) bolnikih od skupaj 15 bolnikov s parodontitisom s klasično bakteriološko diagnostiko po zdravljenju nismo osamili nobene parodontopatogene bakterije. Pri 6 (40 %) smo osamili *A. actinomycetemcomitans* in skupino *P. intermedia/nigrescens*, pri dveh (13,3 %) *P. micros* in pri enem (6,7 %) *F. nucleatum* in *P. gingivalis* (slika 13). Kombinacija *A.*

actinomycetemcomitans/P. intermedia/nigrescens je bila prevladujoča, dokazali smo jo pri treh (20 %) od skupaj 15 bolnikov s parodontitisom. Pri dveh (13,3 %) je bila bakterija *A. actinomycetemcomitans* edina osamljena parodontopatogena bakterija. S po enim bolnikom (6,7 %) ji sledijo vrste *P. intermedia/nigrescens*, *F. nucleatum* in *P. micros*.



Slika 13: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih s klasično bakteriološko diagnostiko pri 15 bolniki s parodontitisom po mehanskem zdravljenju
 (Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi/Pn- *P. intermedia/nigrescens*, Fn- *F. nucleatum* in Pm- *P. micros*)

Iz treh (20 %) od skupaj 15 vzorcev sline (ozioroma pri treh bolnikih s parodontitisom od skupaj 15) smo po mehanskem zdravljenju osamili skupino *P. intermedia/nigrescens*. Za vse izolate je bil molekularni test negativen. Ostalih parodontopatogenih bakterij iz vzorcev sline nismo osamili.

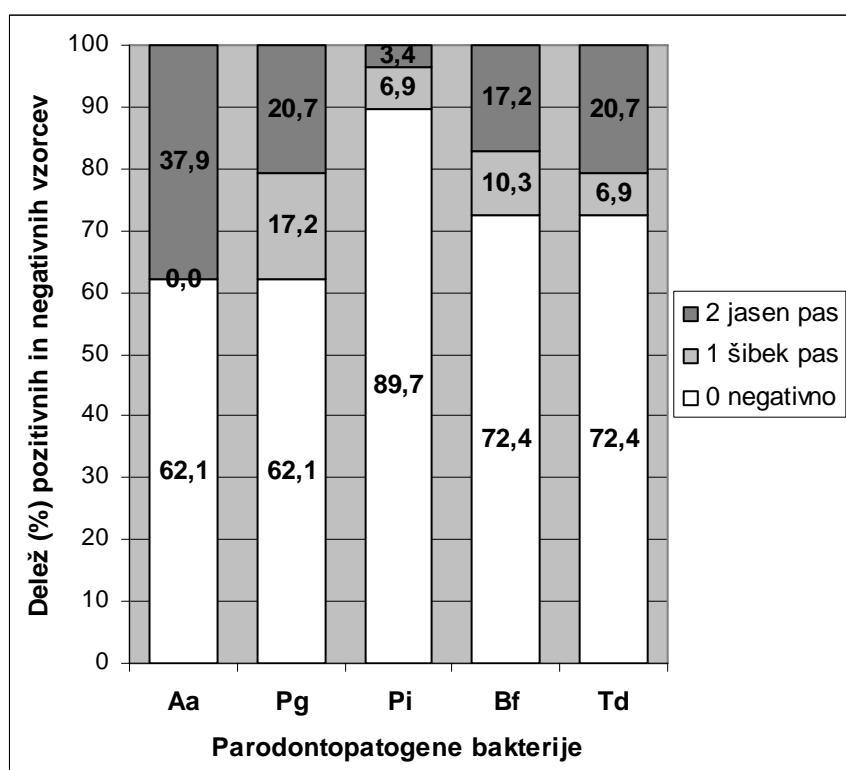
4.2.2 Rezultati molekularne metode

Po mehanskem zdravljenju smo bakteriji *A. actinomycetemcomitans* in *P. gingivalis* dokazali v 11 (37,9 %) od skupaj 29 vzorcev iz parodontalnih žepov. Sledijo jima bakterije *B. forsythus* in *T. denticola*, ki smo ju z molekularno metodo micro-IDent dokazali v 8 (27,6 %) vzorcih in *P. intermedia*, ki smo jo dokazali v treh (10,3 %) vzorcih iz parodontalnih žepov. Obsežnejši podatki so predstavljeni v preglednici 11 in na sliki 14.

Preglednica 11: Dokazovanje petih parodontopatogenih bakterij z molekularnim testom micro-IDent v 29 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih 15 bolnikom s parodontitisom po mehanskem zdravljenju

Število (delež - %) pozitivnih vzorcev za ustrezne parodontopatogene bakterije (n= 29)					
	<i>Aa</i>	<i>Pg</i>	<i>Pi</i>	<i>Bf</i>	<i>Td</i>
pozitivni vzorci	11 (37,9)	11 (37,9)	3 (10,3)	8 (27,6)	8 (27,6)
2 (jasen pas)	11 (37,9)	6 (20,7)	1 (3,4)	5 (17,2)	6 (20,7)
1 (šibek pas)	0 (0,0)	5 (17,2)	2 (6,9)	3 (10,3)	2 (6,9)

(Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus* in Td- *T. denticola*; n- število vzorcev iz parodontalnih žepov)

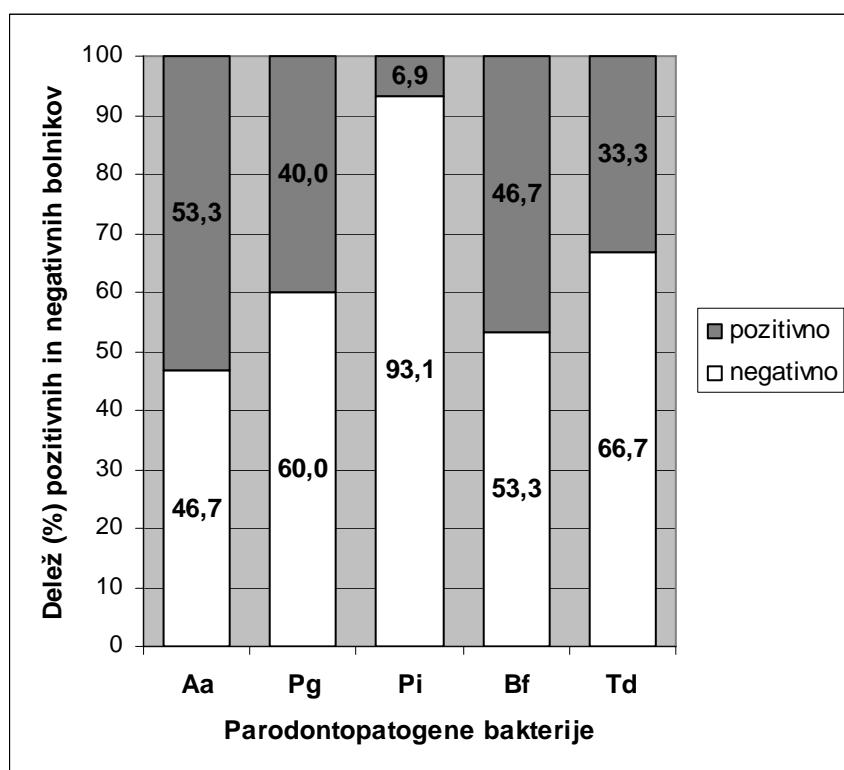


Slika 14: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih z molekularnim testom micro-IDent v 29 vzorcih iz parodontalnih žepov odvzetih 15 bolnikom po mehanskem zdravljenju

(Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus*, Td- *T. denticola*)

Od 29 vzorcev, ki so bili odvzeti po mehanskem zdravljenju, jih je bilo 9 (31,0 %) negativnih za vseh pet parodontopatogenih bakterij. V 9 (31,0 %) smo z molekularnim testom dokazali le eno vrsto; največkrat, petkrat (17,2 %), je bila to bakterija *A. actinomycetemcomitans* (slika 10), v treh (10,3 %) vzorcih *P. gingivalis* in v enem (3,4 %) *T. denticola*. V štirih (13,7 %) vzorcih smo dokazali prisotnost štirih bakterijskih vrst; v dveh primerih vrste *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* in *T. denticola* ter prav tako v dveh primerih vrste *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* in *T. denticola*.

Pri osmih (53,3 %) bolnikih smo z molekularno metodo po mehanskem zdravljenju dokazali vrsto *A. actinomycetemcomitans*, pri sedmih (46,7 %) *B. forsythus*, pri šestih (40 %) bolnikih smo dokazali prisotnost bakterije *P. gingivalis*. Bakterijo *T. denticola* smo dokazali pri petih (33,3 %) in *P. intermedia* le še pri dveh (6,9 %) bolnikih (slika 15).



Slika 15: Delež posamezne vrste parodontopatogenih bakterij dokazanih z molekularnim testom micro-IDent pri 15 bolnikih po mehanskem zdravljenju
 (Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus*, Td- *T. denticola*)

Pri štirih bolnikih (26,7 %) nismo dokazali nobene od petih parodontopatogenih bakterij. Pri dveh (13,3 %) bolnikih smo z molekularno metodo dokazali *A. actinomycetemcomitans* kot edino parodontopatogeno bakterijo. Prevladujoči kombinaciji *A. actinomycetemcomitans/P. gingivalis/B. forsythus/T. denticola* in *A. actinomycetemcomitans/P. gingivalis* smo dokazali pri dveh (13,3 %) od skupaj 15 bolnikov s parodontitisom.

Ob upoštevanju rezultatov obeh metod, smo bakterijske vrste rdečega kompleksa dokazali v 15 (51,7 %) vzorcih oziroma pri 9 (60 %) bolnikih s parodontitisom. Vse tri vrste rdečega kompleksa so bile prisotne v štirih (13,8 % vseh vzorcev oziroma 26,7 % vzorcev z rdečim kompleksom) vzorcih oziroma pri treh (10,3 % vseh vzorcev oziroma 33,3 % vseh bolnikov z rdečim kompleksom) bolnikih. Predstavnike oranžnega kompleksa smo dokazali v podobnih številih oziroma deležih; v 14 (48,3 %) vzorcih oziroma pri 8 (53,3 %) bolnikih. Prevladovala je skupina *P. intermedia/nigrescens* kot edina bakterijska vrsta, ki smo jo z uporabo obeh metod dokazali v 10 (34,5 % vseh vzorcev oziroma 71,4 % vseh vzorcev z oranžnim kompleksom) vzorcih iz parodontalnih žepov oziroma pri 5 (33,3 % oziroma 62,5 % vseh bolnikov z oranžnim kompleksom) bolnikih. Vseh treh predstavnikov oranžnega kompleksa skupaj nismo dokazali v nobenem od vzorcev. Oba bakterijska kompleksa sta bila prisotna v 12 (41,1 %) od skupno 29 vzorcev iz parodontalnih žepov in pri 7 (46,7 %) od skupaj 15 bolnikov s parodontitisom.

V vzorcih sline smo po mehanskem zdravljenju dokazali le *P. gingivalis*, ki je bil prisoten v dveh vzorcih oziroma pri dveh (13,3 %) bolnikih.

4.3 Uspešnost mehanskega zdravljenja

Pri vrednotenju uspešnosti mehanskega zdravljenja smo se omejili predvsem na rezultate molekularne metode, ki so skupaj z rezultati klasične bakteriološke diagnostike predstavljeni v preglednici 12 za bolnike. V preglednici 13 so rezultati predstavljeni za vzorce iz parodontalnih žepov.

Preglednica 12: Primerjava dokazovanja parodontopatogenih bakterij s klasično bakteriološko diagnostiko in molekularno metodo micro-IDent pred in po mehanskem zdravljenju pri bolnikih s parodontitism

Bakterijska vrsta	Število (delež - %) pozitivnih bolnikov			
	Pred zdravljenjem n=16		Po zdravljenju n=15	
	kultivacija	micro-ID	kultivacija	micro-ID
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	6 (37,5)	8 (50,0)	6 (40,0)	8 (53,3)
<i>P. gingivalis</i>	3 (18,8)	11 (68,8)	1 (6,7)	6 (40,0)
<i>P. intermedia</i>	12 (75,0) ^a	5 (31,3)	6 (40,0) ^a	2 (13,3)
<i>B. forsythus</i>	nt	15 (93,6)	nt	7 (46,7)
<i>T. denticola</i>	nt	12 (75,0)	nt	5 (33,3)
<i>F. nucleatum</i>	8 (50,0)	nt	1 (6,7)	nt
<i>P. micros</i>	5 (31,3)	nt	2 (13,3)	nt

(n- število vzorcev; ^a podatek vključuje *P. intermedia* in *P. nigrescens*; nt- ni testirano; n- število bolnikov)

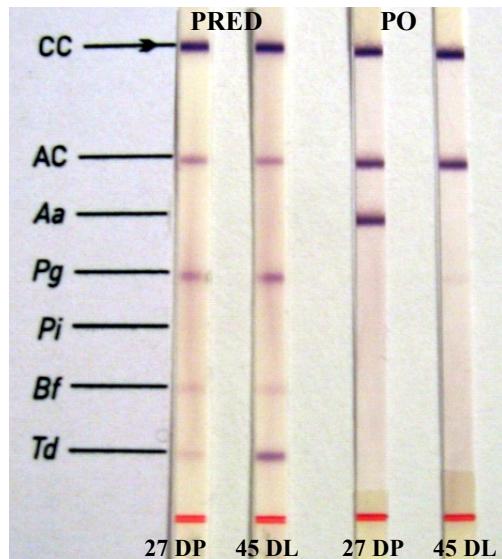
Preglednica 13: Primerjava dokazovanja parodontopatogenih bakterij s klasično bakteriološko diagnostiko in molekularno metodo micro-IDent pred in po mehanskem zdravljenju za vzorce iz parodontalnih žepov odvzetih bolnikom s parodontitism

Bakterijska vrsta	Število (delež - %) pozitivnih vzorcev			
	Pred zdravljenjem n=36		Po zdravljenju n=29	
	kultivacija	micro-ID	kultivacija	micro-ID
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	10 (27,8)	15 (41,7)	6 (20,7)	11 (37,9)
<i>P. gingivalis</i>	5 (13,9)	23 (63,9)	1 (3,4)	11 (37,9)
<i>P. intermedia</i>	23 (63,9) ^a	8 (22,2)	10 (34,5) ^a	3 (10,3)
<i>B. forsythus</i>	nt	27 (75,0)	nt	8 (27,6)
<i>T. denticola</i>	nt	20 (55,6)	nt	8 (27,6)
<i>F. nucleatum</i>	16 (44,4)	nt	2 (6,9)	nt
<i>P. micros</i>	9 (25,0)	nt	2 (6,9)	nt

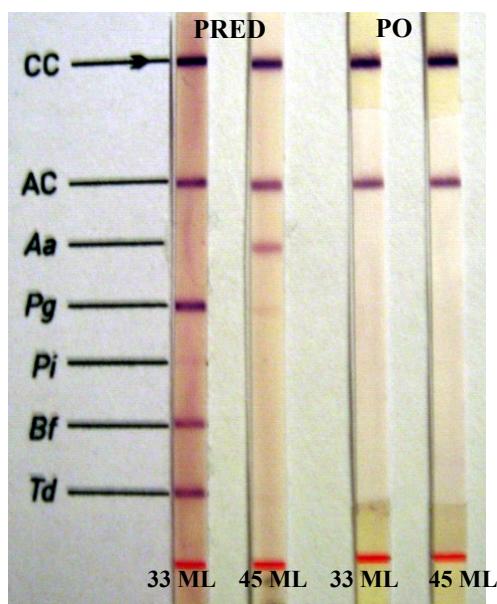
(n- število vzorcev; ^a podatek vključuje *P. intermedia* in *P. nigrescens*; nt- ni testirano; n- število vzorcev iz parodontalnih žepov)

Po mehanskem zdravljenju opazimo znižanje deleža pozitivnih vzorcev za večino bakterij, vendar je znižanje statistično značilno za naslednje bakterije oziroma bakterijske komplekse: *B. forsythus* ($p=0,006$), *T. denticola* ($0,032$), *F. nucleatum* ($p=0,015$) in rdeči kompleks, ki vključuje vrste *P. gingivalis*, *B. forsythus* in *T. denticola* ($0,037$). Bakterija *A. actinomycetemcomitans* je po mehanskem zdravljenju vztrajala v podobnem deležu pozitivnih vzorcev kot pred njim. Dva bolnika sta po mehanskem zdravljenju bakterijo *A.*

actinomycetemcomitans celo pridobila. Glede na jakost razvitih pasov lahko opazimo, da se je njena relativna zastopanost pri večini ostalih bolnikov celo povečala. Na slikah 16-19 so predstavljeni različni odzivi bolnikov na mehansko zdravljenje.

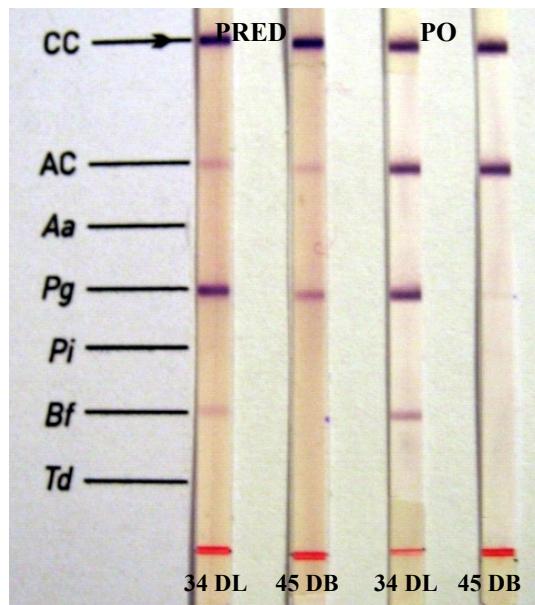


Slika 16: Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z lovki značilnimi za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano za vzorce iz parodontalnih žepov 27 DP in 45 DL odvzetih bolniku s parodontitisom P2 pred (levo) in po (desno) mehanskem zdravljenju
 (CC- kontrola hibridizacije, AC- kontrola pomnoževanja, Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus*, Td- *T. denticola*)

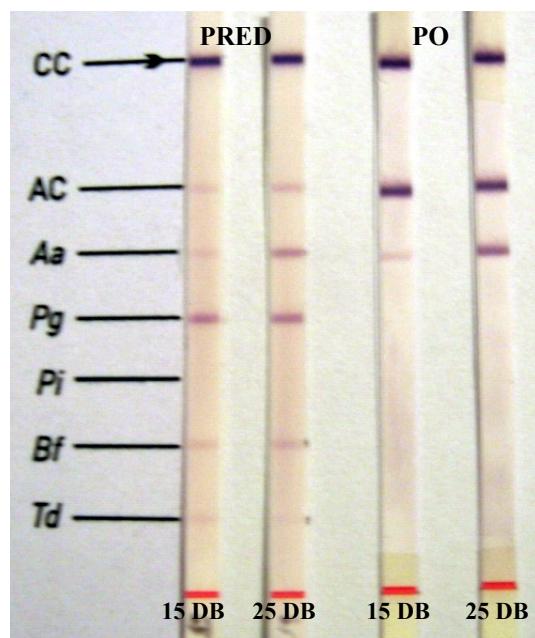


Slika 17: Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z lovki značilnimi za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano za vzorce iz parodontalnih žepov 33 ML in 45 ML odvzetih bolniku s parodontitisom P 6 pred (levo) in po (desno) mehanskem zdravljenju

(CC- kontrola hibridizacije, AC- kontrola pomnoževanja, Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus*, Td- *T. denticola*)



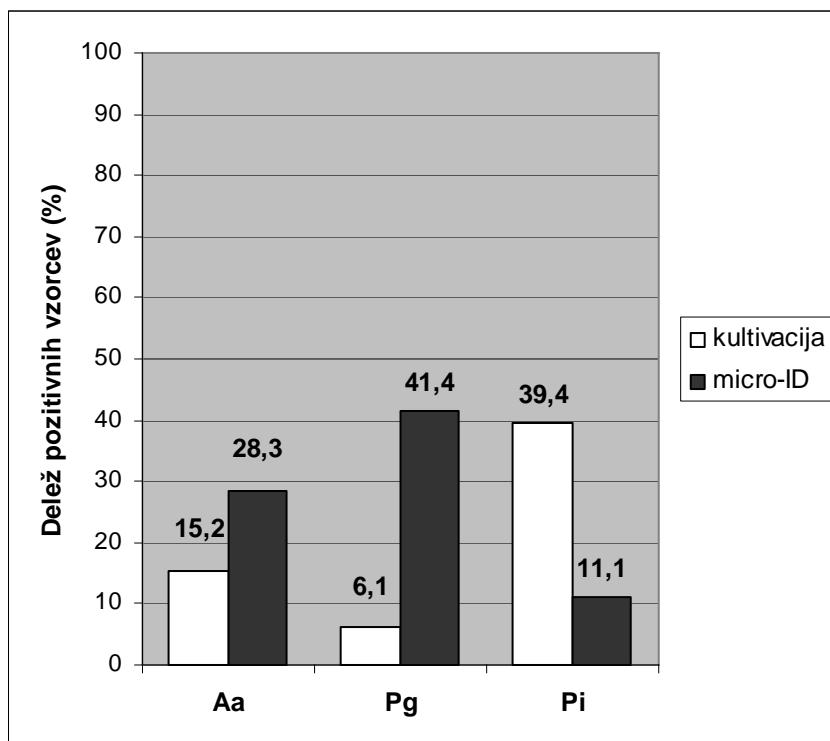
Slika 18: Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z lovki značilnimi za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano za vzorce iz parodontalnih žepov 34 DL in 45 DB odvzetih bolniku s parodontitisom P 13 pred (levo) in po (desno) mehanskem zdravljenju
 (CC- kontrola hibridizacije, AC- kontrola pomnoževanja, Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus*, Td- *T. denticola*)



Slika 19: Dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z lovki značilnimi za pet parodontopatogenih bakterij vezanimi na nitrocelulozno membrano za vzorce iz parodontalnih žepov 15 DB in 25 DB odvzetih bolniku s parodontitisom P 16 pred (levo) in po (desno) mehanskem zdravljenju
 (CC- kontrola hibridizacije, AC- kontrola pomnoževanja, Aa- *A. actinomycetemcomitans*, Pg- *P. gingivalis*, Pi- *P. intermedia*, Bf- *B. forsythus*, Td- *T. denticola*)

4.4 Primerjava klasične bakteriološke diagnostike in molekularne metode

Z molekularnim testom micro-IDent smo vrsti *A. actinomycetemcomitans* in *P. gingivalis* dokazali v večjem številu vzorcev (skupaj vzorci iz parodontalnih žepov in vzorci sline odvzeti pred in po mehanskem zdravljenju). Razlika je zlasti velika za vrsto *P. gingivalis*, ki smo jo s klasično diagnostiko dokazali samo v 6,1 % vseh vzorcev, medtem ko smo jo z molekularno metodo dokazali v 41,4 % vzorcev. Nasprotno velja za vrsto *P. intermedia*, ki smo jo v bistveno višjem deležu vzorcev dokazali s klasično bakteriološko diagnostiko (slika 20).



Slika 20: Delež posameznih vrst parodontopatogenih bakterij *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in *P. intermedia* dokazanih v vzorcih iz parodontalnih žepov in vzorcih sline s klasično bakteriološko diagnostiko in molekularnim testom micro-IDent

Rezultati molekularnega testa in klasične bakteriološke diagnostike so se ujemali v 87,9 % vseh vzorcev za *A. actinomycetemcomitans*, v 64,6 % vzorcev za *P. gingivalis* in v 67,7 % za *P. intermedia*. Glavno razliko med klasično bakteriološko diagnostiko so predstavljali vzorci, ki so bili s klasično bakteriološko diagnostiko negativni, z molekularnim testom pa pozitivni in so predstavljali 12,1 % vseh vzorcev za *A. actinomycetemcomitans*, kar 35,4 % za *P. gingivalis* in 2,0 % za *P. intermedia*. Vzorci, ki so bili s klasično bakteriološko

diagnostiko pozitivni in z molekularnim testom negativni so predstavljali 30,3 % vseh vzorcev za *P. intermedia*. Takih vzorcev za bakterijski vrsti *A. actinomycetemcomitans* in *P. gingivalis* nismo zasledili (preglednica 14).

Preglednica 14: Primerjava dokazovanja bakterijskih vrst *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in *P. intermedia* v vzorcih iz parodontalnih žepov in vzorcih sline s klasično bakteriološko diagnostiko in molekularnim testom micro-IDent

	število (delež - %) vzorcev			
	Micro-ID +		Micro-ID-	
	kultura +	kultura -	kultura +	kultura -
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	16 (16,2)	12 (12,1)	0 (0,0)	71 (71,7)
<i>P. gingivalis</i>	6 (6,1)	35 (35,4)	0 (0,0)	58 (58,6)
<i>P. intermedia</i>	9 (9,1)	2 (2,0)	30 (30,3)	58 (58,6)

V preglednici 15 so predstavljeni podatki za specifičnost, občutljivost in napovedne vrednosti za klasično bakteriološko diagnostiko in molekularno metodo micro-IDent. Za primerjavo smo združili rezultate obeh načinov dokazovanja treh parodontopatogenih bakterij. Za pozitivne vzorce smo predpostavili tiste vzorce, ki so bili pozitivni z eno in/ali drugo metodo dokazovanja. Če posamezne vrste nismo dokazali z nobeno od obeh metod, smo tak vzorec določili kot negativen vzorec. V zgornjem delu preglednice so predstavljeni podatki za klasično bakteriološko diagnostiko. Občutljivost za dokazovanje bakterije *P. intermedia* je visoka, 81,1 %, medtem ko je za dokazovanje bakterij *A. actinomycetemcomitans* in *P. gingivalis* nizka; za *A. actinomycetemcomitans* 57,1 % in le 14,6 % za *P. gingivalis*. Specifičnost klasične bakteriološke diagnostike za dokazovanje bakterij *A. actinomycetemcomitans* in *P. gingivalis* je 100 %, medtem ko je za vrsto *P. intermedia* le 65,9 %. Pozitivna napovedna vrednost je najvišja za vrsti *A. actinomycetemcomitans* in *P. gingivalis* in znaša 100 %, nasprotno je za vrsto *P. intermedia* nizka in znaša le 23,1 %. Negativna napovedna vrednost je najnižja za vrsto *P. gingivalis* (62,4 %), medtem ko je za *A. actinomycetemcomitans* 85,5 % in za *P. intermedia* 96,7 %. Podatki za molekularni test micro-IDent so predstavljeni v spodnjem delu preglednice. Vse naštete vrednosti so za vse tri parodontopatogene bakterije 100 %.

Preglednica 15: Občutljivost, specifičnost in napovedne vrednosti za klasično bakteriološko diagnostiko in molekularni test micro-IDent

	Delež (%) vzorcev z ustrezno napovedno vrednostjo			
	občutljivost (%)	specifičnost (%)	pozitivna	negativna
Klasična bakteriološka diagnostika				
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	57,1	100	100	85,5
<i>P. intermedia</i>	81,8	65,9	23,1	96,7
<i>P. gingivalis</i>	14,6	100	100	62,4
Molekularni test micro-IDent				
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	100	100	100	100
<i>P. intermedia</i>	100	100	100	100
<i>P. gingivalis</i>	100	100	100	100

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Zaradi vse večjega števila bolnikov s parodontitism je vsekakor potrebno dokazovanje parodontopatogenih bakterij, ki je zlasti pomembno za bolnike z agresivnimi oblikami parodontitisa in za bolnike s slabšim odzivom na tradicionalno neantibiotično zdravljenje (Listgarten in Loomer, 2003). Identifikacija parodontopatogenih bakterij s klasično bakteriološko diagnostiko ali z molekularnimi metodami je težavna zaradi visoke genetske in filogenetske podobnosti z drugimi bakterijskimi vrstami, ki so prisotne v parodontalnih žepih. Taka primera sta bakterija *A. actinomycetemcomitans*, ki je filogenetsko sorodna bakteriji *H. aphrophilus* (von Graevenitz in sod., 1995) in bakterija *P. intermedia*, ki jo z biokemični testi težko ločimo od sorodne vrste *P. nigrescens* (Jousimies-Somer in sod., 1995). Slednji dve vrsti se razlikujeta le v 6 % gena za 16S rRNK. Kljub njuni visoki stopnji sorodnosti, pa so že odkrite unikatne regije genoma, na podlagi katerih ju lahko ločimo (Boutaga in sod., 2005).

Klasična bakteriološka diagnostika je večinoma osnovna primerjava (standard) za vrednotenje molekularnih metod in je kljub njenim številnim pomanjkljivostim še vedno pogost način dokazovanja parodontopatogenih bakterij v vzorcih iz parodontalnih žepov. Določenih parodontopatogenih še vedno ni mogoče gojiti na umetnih gojiščih ali pa je njihova osamitev težavna (npr.: spirohete in *B. forsythus*). Pri osamitvi parodontopatogenih bakterij je potrebno upoštevati njihove zahteve po določenih hranil, kar vpliva na izbiro različnih selektivnih gojišč (Loesche in sod., 1992b).

Problemi klasične bakteriološke diagnostike se lahko pojavijo že pri samem vzorčenju. Vprašljiva je ponovljivost vzorčenja, hkrati pa je potrebno paziti na morebitno kontaminacijo z normalno ustno floro (Dahlen in sod., 1990; Loesche in sod., 1992; Socransky in sod., 1987). Neprimerna obdelava vzorca in nadaljnje delo lahko hitro vplivata na relativno zastopanost ostalih striktnih anaerobov in posledično na njihovo osamitev. Optimalno je, da zagotovimo anaerobne pogoje od vnosa vzorca v transportno

gojišče do njegovega prenosa v laboratorij in seveda kasneje pri obdelavi vzorca v laboratoriju. Nekateri striktni anaerobi, kot sta *P. gingivalis* in *F. nucleatum*, odmrejo že po relativno kratki izpostavitvi kisiku. Seveda pa ne smemo pozabiti na dolgotrajnost postopkov klasične diagnostike za dokazovanje anaerobnih bakterij v vzorcih iz parodontalnih žepov. (Jousimies-Somer in sod., 1995; Summanen in sod., 1993). Kljub vsem naštetim pomanjkljivostim, pa je v nekaterih laboratorijsih klasična diagnostika dobro ustaljena praksa. Eden izmed takih laboratorijskih je LABORAL (Houten, Nizozemska), ki na leto z gojitvenimi tehnikami analizira preko 12000 vzorcev iz parodontalnih žepov (Conrads, 2001). Na drugi strani pa ima klasična diagnostika dve pomembni prednosti pred molekularnimi metodami: 1.) za izolate parodontopatogenih bakterij lahko določimo občutljivost za antibiotike in 2.) osamimo lahko parodontopatogene bakterije, ki so običajno redko vključene v dokazovanje z molekularnimi testi (npr.: *Eubacterium* spp., *P. micros*) (Conrads, 2001).

Določenim problemom klasične bakteriološke diagnostike se lahko izognemo z uporabo hitro se razvijajočih molekularnih metod, za katere niso potrebne žive celice, hkrati pa ponujajo hitrejšo in preprostejšo možnost dokazovanja parodontopatogenih bakterij. Na drugi strani je njihova širša klinična uporaba trenutno še vedno omejena zaradi nekaterih razlogov. Zaradi kompleksnosti mikrobne združbe obstaja možnost navzkrižne reaktivnosti, kar lahko prispeva k večjemu številu lažno pozitivnih rezultatov. Lotufo in sod. (1994) so sicer pokazali, da sonda za *B. forsythus* ni navzkrižno reagirala s 75 sevi, ki so predstavljali 24 drugih ustnih bakterij. Nasprotno pa so Loesche in sod. (1992b) pokazali, da je sonda za *A. actinomycetemcomitans*, sicer le v 1 %, navzkrižno reagirala z *H. aphrophilus*, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus* in *H. influenzae*, ne pa tudi z ostalimi 41 testiranimi vrstami. Sonda, pripravljena za dokazovanje *P. ginigvalis* v vzorcih iz parodontalnih žepov, je navzkrižno reagirala z nekaterimi drugimi parodontopatogenimi bakterijami kot so vrste *B. forsythus*, *T. denticola*, *P. endodontalis* in *Prevotella oris*.

Naslednji problem, ki prav tako omejuje širšo uporabo molekularnih metod, je genetska (ne)stabilnost tarčnih zaporedij. Guthmiller in sod. (1993) so s petimi lovками odkrili pomembno raznolikost sevov *A. actinomycetemcomitans*, kar so kasneje potrdili tudi Preus in sod. (1993) ter DiRienzo in McKay (1994). Podobno velja tudi za druge

parodontopatogene bakterije. Guillot in Mouton (1996) sta s kombinacijo AP-PCR in hibridizacije identificirala 24 genotipov *B. forsythus* od 27 testiranih sevov.

V diplomski nalogi smo primerjali klasično bakteriološko diagnostiko in komercialno dostopen molekularni test micro-IDent proizvajalca Hain Lifescience (Nehren, Nemčija) za dokazovanje parodontopatogenih bakterij *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* in *P. gingivalis*, ki združuje pomnoževanje značilnih odsekov petih parodontopatogenih bakterij z verižno reakcijo s polimerazo in nato dokaz pridelkov PCR s hibridizacijo z značilnimi lovkami vezanimi na nitrocelulozno membrano. V raziskavo smo vključili 65 vzorcev iz parodontalnih žepov in 34 vzorcev sline, ki so bili odvzeti bolnikom s parodontitisom pred in po mehanskem zdravljenju (skupno torej 99 vzorcev). Za dokazovanje *B. forsythus* in *T. denticola* smo uporabili izključno molekularni test micro-IDent, za kar smo se odločili zaradi že omenjene težavnejše osamitve obeh bakterijskih vrst iz vzorcev iz parodontalnih žepov (Loesche in sod., 1992b). Osamitev obeh vrst zahteva posebna selektivna gojišča (Norris in Larsen, 1995; Takemoto in sod., 1997), kar bi povečalo nabor uporabljenih selektivnih gojišč in stroške raziskave. Dodaten problem predstavlja dolgotrajnost osamitve treponem (10-14 dni) iz vzorcev iz parodontalnih žepov (Norris in Larsen, 1995; Edwards in sod., 2003).

Najboljše ujemanje med rezultati klasične bakteriološke diagnostike in molekularne metode smo zasledili za vrsto *A. actinomycetemcomitans*. Občutljivost in specifičnost molekularnega testa micro-IDent za dokazovanje *A. actinomycetemcomitans* sta 100 %. Občutljivost klasične diagnostike je le 57,1 %, specifičnost je 100 %. V 12 vzorcih smo *A. actinomycetemcomitans* dokazali z molekularnim testom ne pa tudi s klasično bakteriološko diagnostiko. Vzroke lahko iščemo v nižji občutljivosti gojitvenih metod, katerih meja dokazovanja tarčnih bakterij je 10^4 CFU/ml (angl. colony forming units) (Boutaga in sod. 2005). Lahko pa smo z molekularnim testom zaznali DNK mrtvih bakterijskih celic, ki so bile prisotne v vzorcu, ali pa je prišlo do navzkrižne reaktivnosti z DNK sorodnih bakterijskih vrst (npr.: *H. aphrophilus*). Zaradi nestabilnosti genetskih zaporedij (Guthmiller in sod., 1993; Preus in sod., 1993; DiRienzo in McKay, 1994) bi lahko pričakovali vzorce, ki bi bili s klasično diagnostiko pozitivni za *A. actinomycetemcomitans* in negativni z molekularnim testom, vendar takih primerov nismo zasledili. Eick in Pfister

(2002) sta v svoji raziskavi primerjala klasično bakteriološko diagnostiko in starejšo verzijo molekularnega testa micro-IDent in ugotovila, da je starejša verzija testa micro-IDent pravilno dokazala vrsto *A. actinomycetemcomitans* le v 50 % vzorcih, ki so bili pozitivni s klasično bakteriološko diagnostiko. Ker je že bila na voljo nova verzija molekularnega testa z izboljšanimi oligonukleotidnimi začetniki/lovkami za bakterijo *A. actinomycetemcomitans*, sta vzorce ponovno testirala. Delež vzorcev, ki so bili s klasično diagnostiko pozitivni in z molekularnim testom negativni se je zmanjšal, in posledično se je občutljivost testa dvignila na 76 %.

Pred zdravljenjem smo bakterijo *A. actinomycetemcomitans* s klasično diagnostiko osamili iz 27,8 % vseh vzorcev oziroma pri 37,5 % vseh bolnikov, z molekularno metodo pa smo jo dokazali v nekoliko višjem deležu (41,7 %) vzorcev oziroma kar pri polovici bolnikov. V literaturi najdemo zelo različne podatke. Njena zastopanost v vzorcih iz parodontalnih žepov se giblje od 20 do 50 % (Loesche in Grossman, 2001), kar se tiče njene zastopanosti pri bolnikih s parodontitisom, pa v literaturi najdemo še večji razpon. Lau in sod. (2004) so s PCR v realnem času dokazali bakterijo le pri 18,8 % bolnikov s parodontitisom, pri podobnem odstotku bolnikov (11,6 %), vendar z uporabo hibridizacijske metode, tudi Lopez (2000). Boutaga in sod. (2005) so *A. actinomycetemcomitans* s PCR v realnem času dokazali pri 27,4 % bolnikih s parodontitisom. Nasprotno pa so Flemming in sod. (1995) s pomočjo PCR dokazali *A. actinomycetemcomitans* v 54 % vzorcev, z hibridizacijsko metodo pa kar v 71 % vzorcev iz parodontalnih žepov. V slednjo raziskavo so bili vključeni bolniki z agresivnimi oblikami parodontitisa in bolniki s kroničnim parodontitisom. Tako različne odstotke med raziskavami si lahko razložimo z razlikami v metodologiji kot so na primer uporaba različnih oligonukleotidnih začetnikov, drugačni pogoji PCR, uporaba različnih lovki itd. Pomembni pa so še drugi dejavniki kot so razlike v izbrani populaciji, število vzorcev, mesto vzorčenja in velikost vzorca. V neki raziskavi so Sanz in sod. (2000) primerjali razlike v zastopanosti parodontopatogenih bakterij med dvema populacijama bolnikov s parodontitisom z različnim geografskim poreklom. Vrsto *A. actinomycetemcomitans* so dokazali pri 23,3 % nizozemskih bolnikih in le pri 3,2 % španskih bolnikih. Ali in sod. (1997) so s pomočjo hibridizacije dokazali *A. actinomycetemcomitans* kar pri 52,3 % bolnikov iz Kameruna. Očitno na zastopanost

parodontopatogenih bakterij pri bolnikih s parodontitom vplivajo tudi geografski dejavniki.

Rezultati klasične bakteriološke diagnostike in rezultati molekularnega testa micro-IDent za bakterijo *P. intermedia* so se ujemali v 67,7 % vseh vzorcev. Dva vzorca sta bila z molekularnim testom pozitivna za *P. intermedia*, medtem ko sta bila s klasično diagnostiko negativna. Morebitni vzroki so lahko nižja občutljivost gojitvenih metod ($< 10^4$ CFU/ml), dokaz DNK mrtvih celic v vzorcu ali pa navzkrižna reaktivnost s sorodnimi vrstami (npr.: *P. nigrescens* in druge sorodne vrste iz rodov *Prevotella* ali *Porphyromonas*). Večji problem pa so predstavljali vzorci (32 vzorcev od skupno 41), ki so bili s klasično diagnostiko identificirani kot *P. intermedia* ne pa tudi z molekularnim testom, kar se odraža v nizki specifičnosti (65,9 %) klasične bakteriološke diagnostike za dokazovanje *P. intermedia*. Tri take izolate smo testirali z molekularnim testom micro-IDent za dokaz parodontopatogenih bakterij. Pri vseh treh izolatih sta bili obarvani le kontrolni coni, iz česar lahko sklepamo, da omenjeni izolati verjetno niso *P. intermedia*. Ker je klasična bakteriološka diagnostika v razlikovanju skupine *P. intermedia/nigrescens* nezanesljiva, je verjetno dobršen del teh izolatov *P. nigrescens*. Še vedno pa je zaradi nestabilnosti tarčnih zaporedij možno, da nekateri od omenjenih izolatov so *P. intermedia*. DNK takih izolatov bi bilo potrebno pomnožiti v reakciji PCR in produkte PCR sekvenirati. Za razlikovanje obeh vrst bi lahko uporabili tudi elektroforetsko mobilnost nekaterih encimov ali molekularne metode kot sta AP-PCR in hibridizacija z vrstno specifičnimi lovками (Jousimies-Somer in sod., 1995; Matto in sod., 1997). S podobni problemi so se soočili tudi Boutaga in sod. (2005) ter Eick in Pfister (2002). Boutaga in sod. (2005) so v primeru takih vzorcev najprej uporabili lovko značilno za bakterijo *P. nigrescens*. Večji delež vzorcev se je izkazal za pozitivne za bakterijo *P. nigrescens*. Ostale negativne vzorce so pomnožili v procesu PCR, kjer so uporabili oligonukleotidne začetnike značilne za rod *Prevotella* in oligonukleotidne začetnike značilne za evbakterijsko 16S rDNK. Produkte PCR so nato sekvenirali. Rezultati sekveniranja so kazali na prisotnost drugih, vendar sorodnih bakterijskih vrst iz rodov *Prevotella* in *Porphyromonas*.

Bakterijo *P. intermedia* smo pred zdravljenjem z molekularno metodo v primerjavi z ostalimi petimi parodontopatogenimi bakterijami dokazali v najnižjem deležu vzorcev (22,2

%) iz parodontalnih žepov. Njeno prisotnost smo z molekularno metodo dokazali pri tretjini bolnikov (31,3 %). Nasprotno so Kuru in sod. (1999) *P. intermedia* dokazali kar v 80 % vseh testiranih vzorcev, vendar so bili v to raziskavo vključeni izključno bolniki z agresivnimi oblikami parodontitisa. Lopez (2000) je *P. intermedia* dokazal pri podobnem deležu bolnikov (33 %), vendar v višjem deležu vzorcev (49,1 %), ki so bili odvzeti z mest aktivnega parodontitisa. Ashimoto in sod. (1996) so *P. intermedia* dokazali pri 58 % bolnikov s parodontitisom, Boutaga in sod. (2005) pa kar pri 83 % bolnikov. Razloge za tako različne rezultate raziskav lahko iščemo v razlikah v uporabljeni metodologiji, v izbrani populaciji, geografskih dejavnikih, števila vzorcev, mestu vzorčenja itd.

Ujemanje rezultatov klasične diagnostike in molekularne metode (64,6 %) je bilo slabo tudi za bakterijo *P. gingivalis*, vendar v tem primeru na račun velikega števila vzorcev (35,4 %), ki so bili s klasično diagnostiko negativni, z molekularno metodo pa pozitivni za omenjeno bakterijo. Občutljivost in specifičnost molekularnega testa micro-IDent za dokazovanje bakterije *P. gingivalis* sta glede na izbrano primerjavo oziroma standard 100 %. Občutljivost klasične bakteriološke diagnostike je izredno nizka, 14,6 %. Vzroki za tako nizek delež pozitivnih vzorcev s klasično diagnostiko so lahko podobni kot že zgoraj našteti za vrsti *A. actinomycetemcomitans* in *P. intermedia*: nizka občutljivost gojitvenih metod, dokazovanje DNK mrtvih bakterijskih celic, navzkrižna reaktivnost s sorodnimi bakterijskimi vrstami itd. Pomembno je tudi to, da *P. gingivalis* lahko ubije že krajša izpostavitev kisiku, če seveda ne zagotovimo anaerobnih pogojev v času prenosa vzorcev in pri obdelavi vzorcev v laboratoriju. Vrsta *P. gingivalis* je tudi bistveno zahtevnejša, počasneje rastoča bakterija in jo lahko hitro prerastejo druge bakterijske vrste, ki so prisotne v vzorcu. Vse to vpliva na njeno osamitev iz vzorcev.

Pred mehanskim zdravljenjem smo bakterijo *P. gingivalis* z molekularni testom dokazali v 63,9 % vseh vzorcev iz parodontalnih žepov oziroma pri 68,8 % vseh bolnikov. Ostali avtorji navajajo nekoliko višje številke, ki se gibljejo od 70-100% pozitivnih vzorcev (Griffen in sod., 1998; Kamma in sod., 1994; Kuru in sod., 1999; Loesche in Grossman, 2001, Lopez, 2000). Vzroke zopet lahko iščemo v različni metodologiji, različnem vzorčenju, večjem številu vključenih vzorcev in različno izbrani populaciji za raziskavo. Podobno, kot za ostali dve bakteriji, tudi za bakterijo *P. gingivalis* v literaturi najdemo

razlike v zastopanosti med različnimi populacijami. Lopez (2000) je vrsto *P. gingivalis* dokazal kar pri 96 % vseh bolnikov. Sanz in sod (2000) navajajo nižje deleže; v španski populaciji so bakterijo dokazali pri 64,5 % bolnikov, pri nizozemski pa le pri 36,7 % bolnikov. Ashimoto in sod (1996) so prisotnost *P. gingivalis* dokazali pri 70 % vseh bolnikov.

Bakterijski vrsti *T. denticola* in *B. forsythus* smo z molekularnim testom dokazali v visokem deležu vzorcev (55,6 % za *T. denticola* in 75 % za *B. forsythus*). Dobljeni rezultati se ujemajo z rezultati drugih raziskav. *B. forsythus* je bil prisoten v 70 do 100 % testiranih vzorcev (Ashimoto in sod., 1996; Loesche in Grossman, 2001; Lotufo in sod., 1994; Tran in Rudney, 1999). Moter in sod. (1998) so dokazali *T. denticola* v nekoliko višjem deležu (62 %) vzorcev, prav tako (68 % vzorcev) tudi Asai in sod. (2002). Obe bakteriji sta bili prisotni tudi pri visokem deležu bolnikov; *T. denticola* je bila prisotna pri 75 % vseh bolnikov, *B. forsythus* pa pri 93,8 %. Podobne številke navajajo tudi drugi avtorji (Ashimoto in sod., 1996; Boutaga in sod., 2005; Lau in sod., 2004; Lopez in sod., 2004; Tran in Rudney, 1999). Zanimivo bi bilo primerjati dobljene rezultate z rezultati klasične bakteriološke diagnostike in rezultati mikroskopije v temnem polju.

S klasično bakteriološko diagnostiko smo v vzorcih iz parodontalnih žepov dokazali tudi druge parodontopatogene bakterije, med katerimi je potrebno izpostaviti vrsti *F. nucleatum* in *P. micros*. Bakterija *F. nucleatum* je bila prisotna v 44,4 % vzorcev in pri polovici bolnikov, *P. micros* pa smo osamili iz 25 % vzorcev in pri 31,3 % bolnikov. Z uporabo molekularne metode bi verjetno obe bakterijski vrsti dokazali pogosteje. Lopez in sod. (2004) so obe bakteriji z uporabo molekularne metode dokazali v več kot 90 % vseh testiranih vzorcev. Visoke deleže navajajo tudi drugi avtorji (Boutaga in sod., 2005; Kamma in sod., 1994; Loesche in Grossman, 2001; Sanz in sod., 2000).

Z upoštevanjem rezultatov klasične bakteriološke diagnostike in molekularne metode lahko opazimo, da se oba kompleksa, ki imata velik pomen v razvoju parodontitisa, pojavljata v visokem deležu vzorcev in bolnikov; oba kompleksa ločeno sta bila prisotna v več kot 80 % vseh vzorcev iz parodontalnih žepov oziroma pri približno 90 % bolnikov s parodontitisom. Oba kompleksa skupaj sta bila prisotna v 69,4 % vseh vzorcev oziroma pri 81,3 % vseh

bolnikih. Če bi za vse predstavnike oranžnega kompleksa uporabili tudi molekularno metodo, bi verjetno bil delež pozitivnih vzorcev oziroma bolnikov še višji, kar nakazujejo tudi druge raziskave (Socransky, 1998).

V šestih vzorcih sline smo s klasično diagnostiko osamili črno pigmentirane kolonije, ki jih je hitri identifikacijski sistem BBL Crystal Anaerobe identificiral kot bakterijsko vrsto *P. intermedia*. Molekularni test za pet vzorcev je bil negativen za *P. intermedia*, iz česar lahko sklepamo, da so črno pigmentirani izolati *P. nigrescens* ali druga bakterijska vrsta iz rodov *Prevotella* ali *Porphyromonas*. V ostalih vzorcih sline s klasično diagnostiko nismo uspeli osamiti parodontopatogenih bakterij, kar lahko pripisemo nizki koncentraciji parodontopatogenih bakterij v slini, ki je pod mejo zaznavanja gojitvenih metod, in seveda njihovi občutljivosti na kisik. Z molekularnim testom smo parodontopatogene bakterije prav tako redko dokazali v vzorcih iz parodontalnih žepov, kar je v nasprotju z rezultati drugih raziskav, ki so parodontopatogene bakterije v vzorcih sline dokazale celo pogosteje kot v vzorcih iz parodontalnih žepov (Sakamoto in sod., 2001; Umeda in sod., 1998). Vzroke lahko iščemo v načinu vzorčenja sline, saj so za raziskavo odvzeli celotno slino, ki predstavlja neprimerno večji vzorec sline, kot ga lahko zajamemo s papirnatimi šilci.

Pri vrednotenju uspešnosti mehanskega zdravljenja lahko opazimo različen odziv bakterijskih vrst na zdravljenje. Za vrsti *B. forsythus* in *T. denticola* opazimo statistično značilno znižanje deleža pozitivnih vzorcev, kar se ujema z rezultati drugih raziskav (Cugini in sod., 2000; Haffajee in sod., 1997; Loesche in Grossman, 2001). Izjema iz rdečega kompleksa je *P. gingivalis*. Razloge za tak rezultat lahko iščemo v dejstvu, da sta bila dva bolnika vzorčena kar tri mesece po mehanskem zdravljenju. Ko smo oba bolnika izključili iz statistične obdelave podatkov, znižanje deleža pozitivnih vzorcev za *P. gingivalis* še vedno ni bilo statistično značilno. Iz tega lahko sklepamo, da so verjetno določeni bolniki imeli vsaj enega od dejavnikov (npr.: kajenje), ki poslabšajo odziv parodontitisa na zdravljenje. Haffajee in sod. (1997) so pokazali, da se delež pozitivnih vzorcev za *P. gingivalis* pri bolnikih kadilcih po mehanskem zdravljenju celo poveča.

Od predstavnikov oranžnega kompleksa opazimo statistično značilno znižanje deleža pozitivnih bolnikov le za *F. nucleatum*, vendar bi verjetno z uporabo molekularne

metodologije prišli do drugačnega zaključka (Cugini in sod., 2000; Haffajee in sod., 1997). Ker je verjetno, da so bakterijske vrste iz oranžnega kompleksa potrebne za pojav rdečega kompleksa v razvijajoči se zobni oblogi, je potrebno usmeriti zdravljenje parodontitisa na omenjene bakterije (Carvalho in sod., 2005; Loesche in Grossman, 2001).

Na drugi strani pa je bakterija *A. actinomycetemcomitans* po mehanskem zdravljenju vztrajala v podobnem deležu pozitivnih bolnikov kot pred njim. Pri večini raziskav, ki so vključevale različne oblike mehanskega zdravljenja (mehansko luščenje in glajenje zobne korenine ali operacijski poseg), so avtorji prišli do podobnega zaključka. Njen delež glede na floro, ki je prisotna v parodontalnih žepih, se po zdravljenju lahko celo poveča (Loesche in Grossman, 2001), kar se ujema tudi z našimi rezultati. Dva bolnika sta bakterijo *A. actinomycetemcomitans* po zdravljenju celo pridobila. Pri večini ostalih pa lahko opazimo povečanje jakosti pasov, ki nakazujejo prisotnost bakterije v vzorcu. Za dodatno znižanje deleža pozitivnih vzorcev se priporoča kombinirano zdravljenje, ki vključuje mehansko in antibiotično zdravljenje, in za katerega je dokazano, da je učinkovitejše, hkrati pa zmanjša potrebo po parodontalni operaciji (Carvalho in sod., 2005; Loesche in sod., 1992a; Loesche in Grossman, 2001).

5.2 SKLEPI

V diplomski nalogi smo s primerjavo klasične bakteriološke metode in molekularnega testa micro-IDent ugotovili, da je slednji bistveno hitrejši, bolj občutljiv in preprostejši za dokazovanje parodontopatogenih bakterij v vzorcih iz parodontalnih žepov.

Najboljše ujemanje rezultatov obeh metod smo zasledili za vrsto *A. actinomycetemcomitans*. Občutljivost in specifičnost molekularnega testa micro-IDent za dokazovanje bakterije *A. actinomycetemcomitans* sta 100 %. Občutljivost klasične bakteriološke diagnostike je le 57,1 %, specifičnost je 100 %.

Klasična bakteriološka diagnostika je najbolj problematična za vrsto *P. intermedia*, ker je fenotipsko nemogoče ločevanje med vrstama *P. intermedia* in *P. nigrescens*. Zato je specifičnost klasične bakteriološke diagnostike nizka (65,9 %), medtem ko je občutljivost 81,8 %. Nasprotno sta občutljivost in specifičnost molekularnega testa micro-IDent 100 %.

Bakterijsko vrsto *P. gingivalis* smo z molekularnim testom dokazali v bistveno višjem odstotku vzorcev kot s klasično bakteriološko diagnostiko, kar lahko pripišemo večji občutljivosti bakterije na kisik in njeni zahtevnejši in počasnejši rasti. Občutljivost klasične bakteriološke diagnostike za dokazovanje *P. gingivalis* je izredno nizka, 14,6 %, medtem ko je specifičnost 100 %. Občutljivost in specifičnost molekularnega testa micro-IDent sta 100 %.

Vrsti *T. denticola* in *B. forsythus* smo z molekularnim testom dokazali v visokem deležu vzorcev iz parodontalnih žepov kot tudi pri visokem deležu bolnikov. S klasičnimi bakteriološkimi metodami teh dveh parodontopatogenih vrst zaradi prevelike zapletenosti postopka nismo dokazovali.

Po mehanskem zdravljenju parodontitisa so se deleži pozitivnih vzorcev za večino parodontopatogenih bakterij znižali. Izjema je bakterija *A. actinomycetemcomitans*, ki je po zdravljenju vztrajala v podobnem deležu vzorcev kot pred njim.

6 POVZETEK

Parodontopatogene bakterije so poglaviti dejavnik v razvoju parodontitisa, medtem ko na njegov potek, resnost in odziv na zdravljenje vplivajo še številni drugi dejavniki kot so genetska predispozicija, ki se odraža v imunskejem odzivu, slaba ustna higiena, kajenje, sistemske bolezni in stres (Kornman, 2001; Loesche in Grossman, 2001).

Med najpomembnejše povzročitelje parodontitisa prištevamo bakterije *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *B. forsythus* in *T. denticola*, vendar pa je naše znanje o parodontopatogenih bakterijah omejeno na rezultate bakterioloških gojitvenih metod, ki bistveno podcenjujejo raznolikost mikrobne združbe v parodontalnih žepih (Kroes in sod., 1999; Loesche in Grossman, 2001; Pater in sod., 2001).

Prevalenca parodontitisa in drugih parodontalnih bolezni s starostjo narašča in zaradi staranja populacije se bo število posameznikov s parodontitisom v nekaj naslednjih desetletjih povečalo. Tako bo parodontitis postal eden izmed glavnih vzrokov izgube zob pri odraslih po 35. letu starosti (Loesche in Grossman, 2001). Zaradi dejstva, da so primarni vzrok parodontitisa parodontopatogene bakterije, je vsekakor potrebna specifična diagnostika, ki je relativno nov hkrati pa hitro se razvijajoč koncept v dentalni medicini (Listgarten in Loomer, 2003). Klasična bakteriološka diagnostika je pogost način dokazovanja parodontopatogenih bakterij v vzorcih iz parodontalnih žepov, kljub njenim številnim pomanjkljivostim, med katerimi naj omenimo nižjo občutljivost gojitvenih metod in nezanesljivost razlikovanja določenih bakterijskih vrst z biokemičnimi testi (Boutaga in sod., 2005; Jousimies-Somer in sod., 1995; Loesche in sod., 1992b). Določenim problemom klasične bakteriološke diagnostike se lahko izognemo z uporabo hitro se razvijajočih molekularnih metod, za katere niso potrebne žive bakterijske celice, hkrati pa ponujajo hitrejšo, preprostejšo in bolj občutljivo možnost dokazovanja parodontopatogenih bakterij (Jousimies-Somer in sod., 1995).

V diplomski nalogi smo primerjali klasično bakteriološko diagnostiko in molekularno metodo za dokazovanje parodontopatogenih bakterij v vzorcih iz parodontalnih žepov. Ker je osamitev vrst *T. denticola* in *B. forsythus* iz parodontalnih vzorcev težavnejša, zamudna in

zahteva dodatna selektivna gojišča, smo rezultate obeh metod primerjali le za bakterije *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* in *P. intermedia*. Molekularna metoda se je izkazala za bistveno hitrejšo, bolj občutljivo in preprostejšo možnost dokazovanja parodontopatogenih bakterij. Najboljše ujemanje rezultatov obeh metod smo zasledili za bakterijo *A. actinomycetemcomitans*. Klasična diagnostika se je izkazala za nezanesljivo v razlikovanju vrste *P. intermedia* od sorodne bakterije *P. nigrescens*, na kar nakazuje veliko število vzorcev, ki so bili s klasično bakteriološko diagnostiko identificirani kot vrsta *P. intermedia* ne pa tudi z molekularno metodo. Nasprotno, so pri bakteriji *P. gingivalis* glavni problem predstavljeni vzorci, ki so bili z molekularno metodo identificirani kot vrsta *P. gingivalis*, medtem ko nam bakterije s klasičnimi bakteriološkimi metodami ni uspelo osamiti. Razloge za to lahko najdemo v počasnejši rasti bakterije in njeni bistveno večji občutljivosti na kisik.

Pred mehanskim zdravljenjem smo z molekularno metodo dokazali bakterije *B. forsythus* pri 93,8 %, *T. denticola* pri 75 %, *P. gingivalis* pri 68,8 %, *A. actinomycetemcomitans* pri 50 % in *P. intermedia* pri 31,3 % vseh bolnikov.

Mehansko zdravljenje je uspešno znižalo delež pozitivnih vzorcev za večino parodontopatogenih bakterij. Izjema je bakterija *A. actinomycetemcomitans*, ki smo jo po mehanskem zdravljenju dokazali v podobnem deležu vzorcev in bolnikov kot pred njim.

7 VIRI

Ali R.W, Johannessen A.C., Dahlen G., Socransky S.S., Skaug N. 1997. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. *Journal of Clinical Periodontology*, 24, 11: 830-835

Alsina M., Olle E., Frias J. 2001. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2: 509-513

Arakawa S., Nakajima T., Ishikura H., Ichinose S., Ishikawa I., Tsuchida N. 2000. Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity*, 68, 8: 4611-4615

Asai Y., Jinno T., Igarashi H., Ohyama Y., Ogawa T. 2002. Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 9: 3334-3340

Ashimoto A., Chen C., Bakker I., Slots J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiology and Immunology*, 11, 4: 266-273

Assuma R., Oates T., Cochran D., Amar S., Graves D.T. 1998. IL-1 and TNF antagonist inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Immunology*, 160, 1: 403-409

Bergstrom J., Eliasson S., Dock J. 2000. A 10-year prospective study of tobacco smoking and periodontal health. *Journal of Periodontology*, 71, 8: 1338-1347

Boutaga K., van Winkelhoff A.J., Vadenbroucke-Grauls C.M.J.E., Savelkoul P.H.M. 2005. Periodontal pathogens: A quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 45, 2: 191-199

Brondz I., Olsen I. 1989. Chemical differences in lipopolysaccharides from *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*: Clues to differences in periodontopathogenic potential and taxonomic distinction. *Infection and Immunity*, 57, 10: 3106-3109

Carvalho L.H., D' Avila G.B., Leao A., Goncalves C., Haffajee A.D., Socransky S.S., Feres M. 2005. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in Brazilian population II microbiological results. *Journal of Clinical Periodontology*, 32, 4: 406-411

Cavallaro J.J., Eiggs L.S., Miller J.M. 1997. Evaluation of the BBL Crystal Anaerobe identification system. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 12: 3186-3191

Choi B.K., Paster B.J., Dewhirst F.E., Gobel U.B. 1994. Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis. *Infection and Immunity*, 62, 5: 1889-1895

Choi B.K., Wyss C., Gobel U.B. 1996. Phylogenetic analysis of pathogen-related oral spirochetes. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 8: 1922-1925

Colombo A.P., Haffajee A.D., Dewhirst F.E., Paster B.J., Smith C.M., Cugini M.A., Socransky S.S. 1998. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 25, 2: 169-180

Conrads G. 2001. Testing for marker bacteria in progressive periodontitis: The European experience. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 10, 9: 481-487

Cugini M.A., Haffajee A.D., Smith C., Kent L.R. Jr, Socransky S.S. 2000. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. *Journal of Clinical Periodontology*, 27, 1: 30-36

Dahlen G.G., Renvest S., Wikstrom M., Egelberg J. 1990. Reproducibility of microbiological samples from periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology*, 17, 2: 73-77

Dahlen G. 1993. Black-pigmented gram-negative anaerobes in periodontitis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 6, 2-3: 181-192

Dahlen G., Pippattanagonit P., Rosling B., Moller A.J. 1993. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology*, 8, 6: 375-382

Dahlen G.G., Johnson J.R., Gmur R. 1996. *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* serotypes, ribotypes and binding characteristics. *FEMS Microbiology Letters*, 138, 1: 89-95

Diaz P.I., Zilm P.S., Rogers A.H. 2002. *Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments. *Microbiology*, 148, 2: 467-472

DiRienzo J.M., McKay T.L. 1994. Identification and characterization of genetic cluster groups of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from the human oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1: 75-81

Doan N., Contreras A., Flynn J., Morrison J., Slots J. 1999. Proficiencies of three anaerobic culture systems for recovering periodontal pathogenic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 1: 171-174

Doungudomdacha S., Rawlinson A., Douglas C.W.I. 2000. Enumeration of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples by a quantitative-competitive PCR method. *Journal of Medical Microbiology*, 49, 10: 861-874

Downes J., Hardie J., Philips I. 1999. Evaluation of the Rapid ID 32A system for identification of anaerobic gram-negative bacilli, excluding the *Bacteroides fragilis* group. *Clinical Microbiological Infections*, 5, 6: 319-326

Duncan M.J. 2003. Genomics of oral bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 14, 3: 175-187

Dzink J.L., Smith C.M., Socransky S.S. 1987. Development of broth medium for *Bacteroides forsythus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 25, 5: 925

Edwards A.M., Dymock D., Jenkinson H.F. 2003. From tooth to hoof: treponemes in tissue-destructive diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 5: 767-780

Eick S., Pfister W. 2002. Comparison of microbial cultivation and a commercial PR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*, 29, 7: 638-644

Flemming T.F., Rudiger S., Hofmann U., Schmidt H., Plaschke B., Stratz A., Klaiber B., Karch H. 1995. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 12: 3102-3105

Frandsen E.V.G., Poulsen K., Kilian M. 1995. Confirmation of the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 3: 429-435

Gemmell E., Yamazaki K., Seymour G.J. 2002. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 13, 1: 17-34

Gersdorf H., Meissner A., Krekeler G., Gobel U.B. 1993. Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque from patient with advanced periodontitis. Journal of Clinical Microbiology, 31, 4: 941-946

Gmur R., Tnurnheer T. 2002. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. Microbiology, 148, 5: 1379-1387

Griffen A.L., Becher M.K., Lyons S.K., Moeschberger M.L., Leys E.J. 1998. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. Journal of Clinical Microbiology, 36, 11: 3239-3242

Grošelj D., Gubina M. 2002. Zobna gniloba in bakterijske okužbe obzobnih tkiv. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 363-371

Guillot E., Mouton C. 1996. A PCR-DNA probe assay specific for *Bacteroides forsythus*. Molecular and Cellular Probes, 10, 6: 413-421

Guthmiller J.M., Kolodrubetz D., Kraïd E. 1993. A panel of probes detects DNA polymorphisms in human and non-human primate isolates of a periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Microbial Pathogenesis 14, 2; 103-115

Haffajee A.D., Cugini M.A., Dibart S., Smith C., Kent R.L. Jr, Socransky S.S. 1997. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. Journal of Clinical Periodontology, 24, 5: 324-334

Hasebe A., Yoshimura A., Into T., Kataoka H., Tanaka S., Arakawa S., Ishikura H., Golenbock D.T., Sugaya T., Tsuchida N., Kawanami M., Hara Y., Shibata K. 2004. Biological activities of *Bacteroides forsythus* lipoproteins and their possible pathological roles in periodontal disease. *Infection and Immunity*, 72, 3: 1318-1325

Hillier S. L., Moncla B.J. 1995. *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, and other nonsporeforming anaerobic gram-positive bacteria. V: Manual of clinical microbiology. 6th ed. Murray P.R., Baron E.J., Pfaffer M.A., Tenover F.C., Yolken R.H. (eds.). Washington, ASM Press: 609-662

Hillman J.D., Maiden M.F., Pfaffer S.P., Martin L., Duncan M.J., Socransky S.S. 1993. Characterization of hemolytic bacteria in subgingival plaque. *Journal of Periodontal Research*, 28, 3: 173-179

Hirschfeld L., Wasserman B. 1978. A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *Journal of Periodontology*, 49, 5: 225-237

Jin Y., Yip H.K. 2002. Supragingival calculus: formation and control. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13, 5: 426-441

Jousimies-Somer H.R., Summanen P.H., Wexler H., Finegold S.M., Gharbia S.E., Shah H.N. 1995. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, and other anaerobic gram-negative bacteria. V: Manual of clinical microbiology. 6th ed. Murray P.R., Baron E.J., Pfaffer M.A., Tenover F.C., Yolken R.H. (eds.). Washington, ASM Press: 880-901

Kamma J.J., Nakou M., Manti F.A. 1994. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *Journal of Periodontology*, 65, 11: 1073-1078

Kaplan J.B., Meyenhofer M.F., Fine D.H. 2003. Biofilm growth and detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Bacteriology*, 185, 4: 1399-1404

Kiechl S., Egger G., Mayr M., Wiedermann C.J., Bonora E., Oberholzer F., Muggeo M., Xu Q., Wick G., Poewe W., Willeit J. 2001. Chronic infections and the risk of carotid atherosclerosis. Prospective results from a large population study. *Circulation*, 103, 8: 1064-1070

Kolenbrander P.E., Parrish K.D., Andersen R.N., Greenberg E.P. 1995. Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infection and Immunity*, 63, 12: 4584-4588

Kolenbrander P.E., Andersen R.N., Blehert D.S., Egland P.G., Foster J.S., Palmer Jr. R.J. 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 3: 486-505

Kornman K.S. 2001. Patients are not equally susceptible to periodontitis: does this change dental practice and the dental curriculum. *Journal of Dental Education*, 65, 8: 777-784

Kroes I., Lepp P.W., Relman D.A. 1999. Bacterial diversity within the human subgingival cervice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 25: 14547-14552

Kuru B., Yilmaz S., Noyan U., Acar O., Kadir T. 1999. Microbiological features and cervical fluid aspartate aminotransferase enzyme activity in early onset periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 26, 1: 19-25

Lau L., Sanz M., Herrera D., Morillo J.M., Martin C., Silva A. 2004. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of a *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*, 31, 12: 1061-1069

Listgarten M.A., Loomer P.M. 2003 Microbial identification in the management of periodontal disease. A systematic review. *Annals of Periodontology*, 8, 1: 182-192

Loesche W.J., Gusgert F., Mettraux G., Higgins T., Syed S. 1983. Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infection and Immunity*, 42, 2: 659-667

Loesche W.J., Giordano J.R., Hujoel P., Schwarcz J., Smith B.A. 1992a. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *Journal of Clinical Periodontology*, 19, 2: 103-112

Loesche W.J., Lopatin D.E., Stoll J., van Poperin N., Hujoel P.P. 1992b. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2: 418-426

Loesche W.J., Grossman N.S. 2001. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 4: 727-752

Lopez N.J. 2000. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, 71, 6: 948-954

Lopez N.J., Socransky S.S., Da Silva I., Japlit M.R., Haffajee A.D. 2004. Subgingival microbiota of chilean patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontology*, 75, 5: 717-25

Lotufo R.F., Flynn J., Chen C., Slots J. 1994. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 9, 3: 154-160

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2000. Host-parasite relationships. V: Brock biology of microorganisms. 9th ed. Corey P.F. (ed.). Upper Saddle River, Prentice-Hall: 773-800

Mandell R.L., Socransky S.S. 1981. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. Journal of Periodontology, 52, 10: 593-598

Marsh P.D. 2004. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Research, 38, 3: 204-211

Matto J., Asikainen S., Vaisanen M.L., Rautio M., Saarela M., Summanen P., Finegold S., Jousimies-Somer H. 1997. Role of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* in extraoral and some odontogenic infections. Clinical Infectious Diseases, 25, S2: 194-198

Matto J., Saarela M., Alaluusua S., Oja V., Jousimies-Somer H., Asikainen S. 1998. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. Journal of Clinical Microbiology, 36, 1: 157-160

McGuire M.K., Nunn M.E. 1999. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. Journal of Periodontology, 70, 1: 49-56

Moncla B.J., Braham P., Dix K., Watanabe S., Schwartz D. 1990. Use of synthetic oligonucleotide DNA probes for the identification of *Bacteroides gingivalis*. Journal of Clinical Microbiology, 28, 2: 324-327

Moore W.E.C., Holdeman L.V., Smibert R.M., Good I.J., Burmeister J.A., Palcanis K.G., Ranney R.R. 1982. Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. Infection and Immunity, 38, 2: 651-667

Moore L.V.H., Moore W.E.C., Cato E.P., Smibert R.M., Burmeister J.A., Bert A.M., Ranney R.R. 1987. Bacteriology of human gingivitis. Journal of Dental Research, 66, 5: 989-995

Moter A., Hoenig C., Choi B.K., Riep B., Gobel V.B. 1998. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 5: 1399-1403

Nadkarni M.A., Caldon C.E., Chhour K.L., Fischer I.P., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N. 2004. Carious dentine provides a habitat for a complex array of novel *Prevotella*-like bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 11: 5238-5244

Niederman R., Buyle-Bodin Y., Lu B.Y. Naleway C., Robinson P., Kent R. 1996. The relationship of gingival cervical fluid short chain carboxylic acid concentration to gingival inflammation. *Journal of Clinical Periodontology*, 23, 8: 743-749

Niederman R., Zhang J., Kashket S. 1997. Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 8, 3: 269-290

Noack B., Genco R.J., Trevisan M., Grossi S., Zambon J.J., De Nardin E. 2001. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *Journal of Periodontology*, 72, 9: 1221-1227

Nonnenmacher C., Dalpke A., Mutter R., Heeg K. 2004. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 59, 1: 117-125

Norris S.J., Larsen S.A. 1995. *Treponema* and other host-associated spirohetes. V: Manual of clinical microbiology. 6th ed. Murray P.R., Baron E.J., Pfaffer M.A., Tenover F.C., Yolken R.H. (eds.). Washington, ASM Press: 636-651

Offenbacher S., Salvi G.E. 1999. Introduction of prostaglandin release from macrophages by bacterial endotoxin. *Clinical Infectious Diseases*, 28, 3: 505-513

Paster B.J., Boches S.K., Galvin J.L., Ericson R.E., Lau C.N., Levanos V.A., Sahasrabudhe A., Dewhirst F.E. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology*, 183, 12: 3770-3783

Persson L., Bergstrom J., Ito H., Gustafsson A. 2001. Tobacco smoking and neutophil activity in patients with periodontal disease. *Journal of Periodontology*, 72, 1: 90-95

Preus H.R., Haraszthy V.I., Zambon J.J., Genco R.J. 1993. Differentiation of strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 10: 2773-2776

Ratcliff P.A., Johnson P.W. 1999. The relationship between oral malodor, gingivitis, and periodontitis. A review. *Journal of Periodontology*, 70, 5: 485-489

Sabet M., Lee S.W., Nauman R.K., Sims T., Um H.S. 2003. The sufrace (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. *Microbiology*, 149, 12: 3617-3627

Saito T., Ishihara K., Kato T., Okuda K. 1997. Cloning, expression and sequencing of a protease gene from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037 in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 65, 11: 4888-4891

Sakamoto M., Umeda M., Ishikawa I., Benno Y. 2000. Comparison of the oral bacterial flora in saliva from a healthy subject and two periodontitis patients by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *Microbiology and Immunology*, 44, 8: 643-52

Sakamoto M., Takeuchi Y., Umeda M., Ishikawa I., Benno Y. 2001. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiology & Immunology*, 45, 1: 39-44

Sakamoto M., Suzuki M., Umeda M., Ishikawa I., Benno Y. 2002. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrug., gen. nov.,

comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 3: 841-849

Sakamoto M., Takeuchi Y., Umeda M., Ishikawa I., Benno Y. 2003. Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. Journal of Medical Microbiology, 52, 1: 79-89

Sanz M., van Winkelhoff A.J., Herrera D., Dellemijn-Kippuw N., Simon R., Winhel E. 2000. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. European Journal of Oral Sciences, 108, 5: 383-392

Schreiner H.C., Sinatra K., Kaplan J.B., Furgagn D., Kachlany S.C., Planet P.J., Perez B.A., Figurski D.H., Fine D.H. 2003. Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 12: 7295-7300

Seme K. 2002. Normalna mikrobna flora. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 59-64

Sharma A., Sojar H.T., Glurich I., Honma K., Kuramitsu H.K., Genco R.J. 1998. Cloning, expression and sequencing of a cell surface antigen containing a leucine-rich repeat motif from *Bacteroides forsythus* ATCC 43037. Infection and Immunity, 66, 12: 5703-5710

Simonson L. G., Robinson P.J., Pranger R.J., Cohen M.E., Morton H.E. 1992. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. Journal of Periodontology, 63, 4: 270-273

Slade G.D., Offenbacher S., Beck J.D., Heiss G., Pankow J.S. 2000. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population. Journal of Dental Research, 79, 1: 49-57

Slots J. 1982. Selective medium for isolatin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Journal of Clinical Microbiology, 15, 4: 606-609

Smalley S.W., Silver J., Birrs A., Withnall R., Titler P.J. 2003. The haem pigment of the oral anaerobes *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* is composed of iron (III) protoporphyrin IX in the monomeric form. Microbiology, 149, 7:1711-1718

Socransky S.S., Haffajee A.D., Smith G.L., Dzink J.L. 1987. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. Journal of Clinical Periodontology, 14, 10: 588-593

Socransky S.S., Haffajee A.D. 1992. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. Journal of Periodontology, 63, 4: 322-331

Socransky S.S. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of Clinical Periodontology, 25, 2: 134-144

Sorsa T., Ingman T., Suomalainen K., Haapasalo M., Konttinen Y.T., Lindy O., Saari H., Uitto V.J. 1992. Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. Infection and Immunity, 60, 11: 4491-4495

Summanen P., Baron E.J., Citron D.M., Strong C., Wexler H.M., Finegold S.M. 1993. Wadsworth anaerobic bacteriology manual. 5th ed. Belmont, Star Publishing Company: 230 str.

Syed S.A., Loesche W.J. 1978. Bacteriology of human experimental gingivitis: Effect of plaque age. Infection and Immunity, 21, 3: 821-829

Tabeta K., Yamazaki K., Hotokezaka H., Yoshie H., Hara K. 2000. Elevated humoral immune response to heat shock protein 60 (hsp60) family in periodontitis patients. Clinical & Experimental Immunology, 120, 2: 285-293

Takemoto T., Kurihara H., Dahlen G. 1997. Characterization of *Bacteroides forsythus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 6: 1378-1381

Tempro P.J., Slots J. 1986. Selective medium for the isolation of *Haemophilus aphrophilus* from the human periodontium and other oral sites and the low proportion of the organism in the oral flora. *Journal of Clinical Microbiology*, 23, 4: 777-782

Teng Y.T.A. 2003. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 14, 4: 237-252

Tran S.D., Rudney J.D. 1999. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* and *Pophyromonas gingivalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 11: 3504-3508

Umeda M., Contreras A., Chen C., Bakker I., Slots J. 1998. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontology*, 69, 7: 828-833

von Graevenitz A., Zbinden R., Mutters R. 1995. *Actinobacillus*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Kingella*, *Pasteurella*, and other fastidious or rarely encountered gram-negative rods. V: Manual of clinical microbiology. 6th ed. Murray P.R., Baron E.J., Pfaffer M.A., Tenover F.C., Yolken R.H. (eds.). Washington, ASM Press: 609-62

Wyss C. 1989. Dependence of proliferation of *Bacteroides forsythus* on exogenous N-acetylmuramic acid. *Infection and Immunity*, 57, 6: 1757-1759

Xu Q., Kiechl S., Mayr M., Metzler B., Egger G., Oberholzer F., Willeit J., Wick G. 1999. Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis: clinical significance determined in a follow-up study. *Circulation*, 100, 11: 1169-1174

ZAHVALA

