

# Značaj analize uzorka brisa usne šupljine u liječenju paradontitisa

---

**Krajančić, Daniela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:153997>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**

*Repository / Repozitorij:*



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Daniela Krajančić**

**ZNAČAJ ANALIZE UZORKA BRISA USNE ŠUPLJINE U  
LIJEČENJU PARODONTITISA**

**Završni rad**

Split, 2024.

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
Podružnica  
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ  
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Daniela Krajančić**

**ZNAČAJ ANALIZE UZORKA BRISA USNE ŠUPLJINE U  
LIJEČENJU PARODONTITISA**

**THE SIGNIFICANCE OF THE ANALYSIS OF THE ORAL  
CAVITY SWIPE SAMPLE IN THE TREATMENT OF  
PERIODONTITIS**

**Završni rad / Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Doc. dr. sc. Sendi Kuret**

Split, 2024.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
Sveučilišni prijediplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

**Znanstveno područje:** Biomedicina i zdravstvo  
**Znanstveno polje:** Kliničke medicinske znanosti

**Mentor:** doc. dr. sc. Sendi Kuret

### ZNAČAJ ANALIZE UZORKA BRISA USNE ŠUPLJINE U LIJEČENJU PARODONTITISA

Daniela Krajančić, 0346012797

#### SAŽETAK

**Cilj:** Cilj ovog rada je prikazati značaj otkrivanja parodontopatogenih bakterija pomoću različitih metoda iz uzorka brisa usne šupljine kod pacijenata s parodontitisom radi primjene terapije u njihovu liječenju.

**Materijal i metode:** Materijal koji se koristi za analizu je subgingivalni plak. Otkrivanje bakterija radi se pomoću različitih metoda: kultivacija bakterijske kulture, komercijalno dostupnim kitovima i Real-time PCR-om.

**Rezultati:** Rezultati bakterijske kulture iskazuju se u obliku CFU/ml, a rezultati komercijalnog kita iskazuju kvalitativan rezultat od 0 do +++. Real-time PCR-om se osim kvalitativnog može dobiti i semikvantitativan rezultat.

**Zaključak:** Otkrivanje parodontopatogenih bakterija kod pacijenata s parodontitisom je važno radi određivanja točne terapije. Prisutnost bakterija utvrđujemo kultivacijom bakterijske kulture iz subgingivalnog uzorka, ali to je spora metoda, stoga danas se sve više koriste komercijalni kitovi ili Real-time PCR metoda kojima puno brže i preciznije dolazimo do rezultata, a time i pacijent prije do terapije.

**Ključne riječi:** parodontitis; parodontopatogene bakterije; bakterijska kultura; DNA

**Rad sadrži:** 29 stranica; 15 slika; 2 tablice

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav povjerenstva za obranu:

1. Prof.dr.sc. Davorka Sutlović
2. Doc.dr.sc. Esmā Čečuk Jeličić
3. Doc.dr.sc. Sendi Kuret

**Datum obrane:** 17. srpnja 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**University Department for Health Studies**  
**University undergraduate study of Medical laboratory diagnostics**

**Scientific area:** Biomedicine and health care

**Scientific field:** Clinical medical sciences

**Supervisor:** doc.dr.sc. Sendi Kuret

### THE SIGNIFICANCE OF THE ANALYSIS OF THE ORAL CAVITY SWIPE SAMPLE IN THE TREATMENT OF PERIODONTITIS

Daniela Krajančič, 0346012797

#### SUMMARY

**Objectives:** The objective of this paper is to show the importance of the detection of periodontopathogenic bacteria using different methods from the oral swab samples in patients with periodontitis for the purpose of applying therapy in their treatment.

**Material and methods:** The material used for analysis is subgingival plaque. The detection of bacteria is done using different methods: bacterial culture cultivation, commercially available kits and Real-time PCR.

**Results:** The results of the bacterial culture are reported in the form of CFU/ml and the results of the commercial kit show a qualitative result from 0 to +++ . With real-time PCR, in addition to a qualitative result, a semi-quantitative result can also be obtained.

**Conclusion:** Detection of periodontopathogenic bacteria in patients with periodontitis is important to determine the correct therapy. We determine the presence of bacteria by culturing a bacterial culture from a subgingival sample, but this is a slow method, so today commercial kits or Real-time PCR methods are used more and more, with which we get results much faster and more precisely, and thus the patient gets the therapy sooner.

**Keywords:** periodontitis; periodontopathogenic bacteria; bacterial culture; DNA

**Thesis contains:** 29 pages; 15 figures; 2 tables

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

1. Prof.dr.sc. Davorka Sutlović
2. Doc.dr.sc. Esmā Čečuk Jeličić
3. Doc.dr.sc. Sendi Kuret

**Defense date:** July 17<sup>th</sup> 2024

# SADRŽAJ

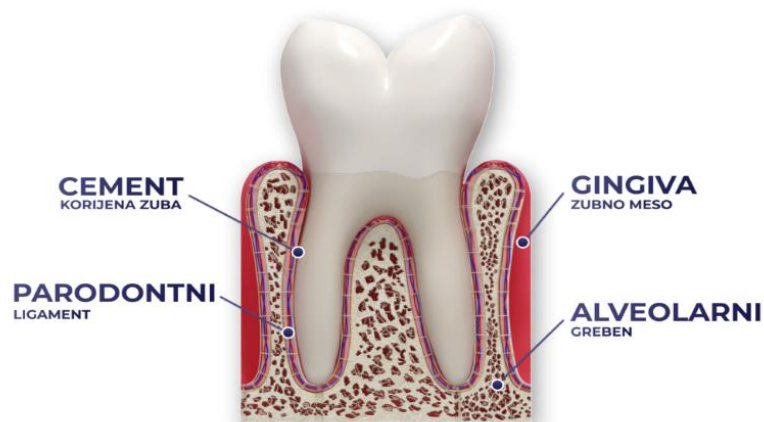
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. PARODONTITIS .....	1
1.1.1. Dijagnoza parodontitisa .....	4
1.1.2. Vrste parodontitisa .....	4
1.2. RIZIČNI FAKTORI .....	5
1.2.1. Dob i spol .....	5
1.2.2. Genetika .....	6
1.2.3. Socioekonomski status .....	6
1.2.4. Pušenje .....	6
1.2.5. Dijabetes.....	7
1.3. PARODONTALNI PATOGENI .....	8
1.3.1. Bakterije crvene kategorije .....	9
1.3.2. Bakterije narančaste kategorije.....	10
1.3.3. Bakterije žute kategorije .....	10
1.3.4. Bakterije zelene kategorije.....	11
1.3.5. Bakterije ljubičaste kategorije.....	11
1.4. NASTANAK ZUBNOG PLAKA (BIOFILMA) .....	12
1.5.INDIKACIJE ZA ODREĐIVANJE PARODONTOPATOGENIH BAKTERIJA.....	12
<b>2. CILJ RADA .....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>15</b>
3.1. MATERIJAL.....	15

3.2. METODE	16
3.2.1. Bakterijska kultura	16
3.2.2. Metode temeljene na analizi nukleinske kiseline	17
3.2.2.1. Micro-IDent® Test	18
3.2.2.2. Real-time PCR	20
<b>3. REZULTATI</b>	<b>21</b>
4.1. BAKTERIJSKA KULTURA	21
4.2. MICRO-IDENT® TEST	22
4.3. REAL-TIME PCR	24
<b>4. RASPRAVA</b>	<b>27</b>
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	<b>29</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>30</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS</b>	<b>33</b>

# 1. UVOD

## 1.1. PARODONTITIS

Bolesti desni, poput parodontitisa, gingivitisa i karijesa su jedne od najčešćih bolesti današnjice (1). Sam parodont se sastoji od gingive, cementa korijena, parodontalnog ligamenta i alveolarne kosti (grebena) (Slika 1).



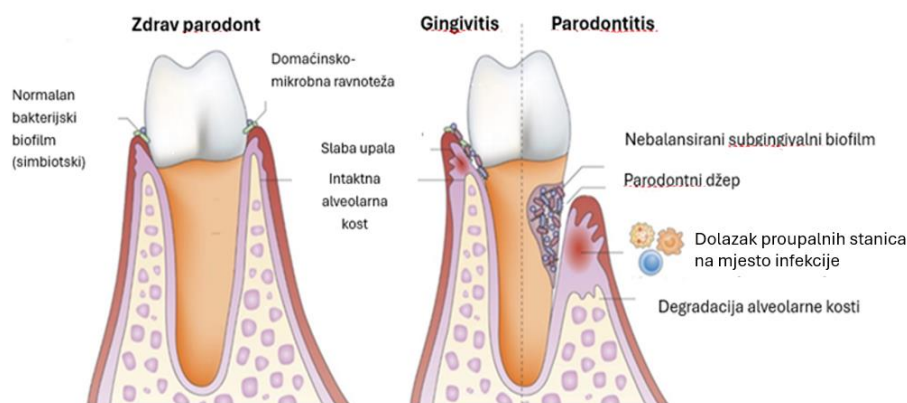
Slika 1. Struktura parodonta

Izvor: <https://lp.imed.hr/parodontologija-poliklinika-imed/>

Glavno obilježje zdravog parodonta jest posebna veza između mekog i tvrdog tkiva zuba čija je glavna uloga zaštita parodonta od bilo kakvog mehaničkog ili mikrobiološkog oštećenja (2). Poznato je da se u ustima nalazi druga po veličini bakterijska populacija u organizmu, odmah nakon populacije crijevne mikroflore. Više od 700 bakterijskih vrsta



kolonizira usnu šupljinu, od kojih je većina njih dio normalne fiziološke flore, a neke sudjeluju u patogenezu parodontitisa. Osim samih bakterija, oralna se mikroflora sastoji još i od raznovrsnih gljivica i virusa (3,4). Normalna oralna mikroflora se nalazi u stanju stalnog balansiranja između patogenih bakterija i fizioloških simbiotskih bakterija. Za održavanje balansa je prijeko potrebno redovno održavanje oralne higijene jer se neadekvatnom oralnom higijenom brzo otvara put prema nastajanju i nakupljanju biofilma na površini zuba. U početku zubni biofilm potiče upalni odgovor i nastaje upala gingive (gingivitis), što naposljetku može dovesti do nastanka parodontitisa (Slika 2) (5).



Slika 2. Obilježja parodontitisa

Izvor: <https://observatoireprevention.org/en/2022/03/27/the-influence-of-oral-health-on-the-risk-of-cardiovascular-disease/>

Gingivitis je okarakteriziran upalom marginalnih gingivalnih mekih tkiva. Od kliničkih simptoma najčešći su: krvarenje prilikom četkanja zubi, crvenilo, otok gingive i loš zadah. Upala gingive se lako rješava mehaničkim uklanjanjem zubnog biofilma i održavanjem visokog stupnja oralne higijene. Glavna razlika između gingivitisa i parodontitisa jest ta da u gingivitisu nisu zahvaćene dublje strukture poput alveolarne kosti i ligamenata. Ali,

dugotrajnim nakupljanjem biofilma, dolazi do stvaranja parodontnih džepova u kojima se nastanjuju patogene bakterije što promovira daljnji razvoj upale i propadanje tkiva (2,6).

Parodontitis je multifaktorska upalna infektivna bolest koja djeluje na zubna potporna tkiva tako da uništava vezivno tkivo i alveolarnu kost, što na posljeticu dovodi do ispadanja zuba (7). Nastanku parodontitisa prethode složene interakcije između specifičnih oralnih bakterijskih patogena, destruktivnog imunološkog sustava domaćina te različitih okolišnih i genetičkih čimbenika. Tijekom perzistirajuće bakterijske infekcije i samim time neuravnotežene homeostaze, dolazi do neprekidnog lučenja protuupalnih citokina i raznih enzima što pogoduje daljnjem propadanju dubokih parodontalnih struktura. Za vrijeme napredovanja upale, mikrobiom usta se mijenja te iz dominacije gram pozitivnih bakterija prelazi u dominaciju anaerobnih gram negativnih bakterija.

U početku bolesti se može dogoditi da pacijent nema simptoma ili su oni slabo izraženi. Daljnjom progresijom bolesti dolazi do krvarenja, crvenila, otoka, boli te slabljenja pričvršćenja uz marginalnu kost (7,8). Nakon što parodontitis uništi značajnu količinu vezivnog tkiva, bilo u broju zahvaćenih zuba ili samoj ozbiljnosti oštećenja, bolest se potom može dodatno zakomplicirati nizom različitih simptoma koji utječu na kvalitetu života pojedinca. Dolazi do patološke migracije i pomicanja zuba, hipermobilnosti i gubitka zuba te naposljetku do disfunkcije žvakanja. Žvačna disfunkcija se pojavljuje u terminalnoj fazi parodontitisa te ugrožava unošenje hrane i opće zdravlje bolesnog pojedinca. Učinci parodontitisa nadilaze samu usnu šupljinu te dolazi do hematogenog rasipanja bakterija i njihovih produkata te medijatora upalnog procesa. Poznato je da su parodontalne bakterije pronađene u kardiovaskularnom tkivu kao što su srčano tkivo i perikardijalna tekućina. Preko ovih mehanizama parodontitis pridonosi sistemskoj upali i dolazi u interakciju s različitim bolestima poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, ateroskleroze i plućnih infekcija (1,6,9).

### 1.1.1. Dijagnoza parodontitisa

Dijagnoza započinje uzimanjem detaljne anamneze pacijenta. Pregledava se pacijentova medicinska povijest u kojoj se traže određeni čimbenici rizika poput pušenja ili dijabetesa. Potom se radi klinička evaluacija parodontnih parametara kao što su: mjerenje indeksa biofilma, crvenilo, otok i krvarenje pri sondiranju, dubina parodontnih džepova i ocjenjivanje mobilnosti zuba. Rendgenskim snimanjem se procjenjuje opseg gubitka alveolarne kosti. Nakon inicijalne dijagnoze utvrđuje se stadij i ozbiljnost. Stadij se određuje prema razini gubitka zubnog pričvrstka te se parodontitis svrstava u jedan od četiri moguća stadija.

- stadij I (gubitak pričvrstka od 1-2 mm; bez gubitka zubi)
- stadij II (gubitak pričvrstka od 3-4 mm; bez gubitka zubi)
- stadij III (gubitak pričvrstka  $\geq 5$  mm; gubitak zuba  $\leq 4$ )
- stadij V (gubitak pričvrstka  $\geq 5$  mm; gubitak zuba  $\geq 5$ ) (7).

### 1.1.2. Vrste parodontitisa

Prema posljednjoj klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije parodontitis se dijeli na:

- kronični parodontitis (tip II)
- agresivni parodontitis (tip III)
- parodontitis u sklopu sistemskih bolesti
- nekrotizirajući parodontitis
- parodontni apscesi .

Kronični parodontitis zauzima oko 90% svih slučajeva parodontitisa. Većinom nastaje iz neliječenog gingivitisa koji tijekom vremena prelazi u kronični parodontitis. Glavne značajke ove vrste parodontitisa jesu da ima spori tijek, svi zubi nisu jednako zahvaćeni i češće se javlja nakon 40. godine života. U većini slučajeva se liječenje uspješno provodi mehaničkom terapijom (10). Ako pacijent ne odgovara adekvatno na mehaničko liječenje, ima teži oblik kroničnog parodontitisa ili je pozitivan na prisutnost *Porphyromonas*

*gingivalis* ili *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* u zubnom biofilmu i tada se pribjegava liječenju antibioticima (8).

Agresivni parodontitis je rijetki oblik parodontitisa koji se češće javlja u mlađoj životnoj dobi. Karakterizira ga brza i neočekivana progresija bolesti te pojavljivanje unutar obitelji. Veličina biofilma ne korelira sa stupnjem bolesti, a ključnu ulogu u njegovom nastanku ima bakterija *A. actinomycetemcomitans*. Većinom se uspješno liječi mehaničkom terapijom, ali u određenim slučajevima je potrebna upotreba antibiotika. (2,11)

S obzirom na postotak zahvaćenog područja, parodontitis dijelimo na lokalizirani oblik ( $\leq 30\%$  područja zahvaćeno) i generalizirani oblik ( $>30\%$  područja zahvaćeno) (2).

## **1.2. RIZIČNI FAKTORI**

Danas je već poznato da je parodontitis bolest koja nastaje zbog dinamičkog utjecaja različitih čimbenika. Sama srž pojave parodontitisa se nalazi u nastanku bakterijskog biofilma koji započinje upalnu reakciju (5). Imunološki odgovor na ovaj konstantni upalni podražaj može varirati od osobe do osobe. Faktori poput dobi, spola, genetske predispozicije, socioekonomskog statusa, pušenja, alkoholizma i raznih sistemskih bolesti mogu pridonijeti varijabilnoj kliničkoj slici parodontitisa u pojedinaca (12).

### **1.2.1. Dob i spol**

Parodontitis se pojavljuje u svim dobnim skupinama, ali najveću prevalenciju dostiže nakon 40. godine. Smatra se da su učestalost pojave i intenzitet bolesti povezani s akumuliranjem štetnih čimbenika tijekom godina te smanjenjem imunoloških sposobnosti u starijoj životnoj dobi (13). Parodontitis je podjednako raširen između muške i ženske populacije, ali je uočeno da su muškarci podložniji težim oblicima parodontitisa, bilo da je to zbog neadekvatne oralne higijene ili ostalih rizičnih čimbenika (14,15). Uočeno je da se prevalencija parodontitisa i gingivitisa povećava među ženama u menopauzi što je povezano s manjkom estrogena koji ima pozitivan učinak na zdravlje zuba (16).

### **1.2.2. Genetika**

Parodontitis je kompleksna bolest koja dijeli slične karakteristike s ostalim kroničnim upalnim bolestima. Glavne značajke kroničnih bolesti su uloga i interakcija različitih uzročnih faktora te tijek bolesti koji se sastoji od ponavljajućih ciklusa mirovanja i pogoršanja bolesti. Dolazi do neravnoteže u imunološkom odgovoru domaćina koja je uzrokovana hipo- ili hiperaktivnošću imunološkog sustava. Na sposobnost i reaktivnost imunološkog sustava utječe mnoštvo faktora od kojih su neki prirođeni, a neke stječemo tijekom života. U mlađih pacijenata s agresivnim oblikom ove bolesti je dokazano da u oko 50% slučajeva genetički faktori imaju presudnu ulogu u razvitku bolesti, dok u starijih osoba s kroničnim parodontitisom taj broj pada na oko 25%. Pronađeno je da su neke genske varijacije u lokusima CDKN2B-AS1 (*CDKN2B antisense RNA 1*), CAMTA1 (*calmodulin binding transcription activator 1*), VAMP3 (*vesicle associated membrane protein 3*) i PLG (plazminogen) povezane s povećanim rizikom za nastanak parodontitisa i koronarnih bolesti. Hipermetilacija i hipometilacija promotora određenih nekodirajućih regija također imaju negativan utjecaj, a hipometilacija gena CCL25 (*C-C motif chemokine ligand 25*) i IL17C (interleukin 17C) ima proupalni učinak što utječe na daljnji razvoj parodontitisa (17).

### **1.2.3. Socioekonomski status**

Socioekonomske varijable kao što su zarada i obrazovanje imaju znatan utjecaj na razvoj parodontitisa. Istraživanja su pokazala da ljudi sa manjim stupnjem obrazovanja u praksi imaju dublje parodontne džepove i veći gubitak alveolarne kosti nego ljudi s višim stupnjem obrazovanja. Slični rezultati su dobiveni i za povezanost stupnja obrazovanja i nastanka parodontitisa. Utjecaj socioekonomskog statusa na razvoj parodontitisa dodatno kompliciraju povezani faktori poput: spola, rase, kulture i zanimanja (12,18).

### **1.2.4. Pušenje**

Pušenje je najvažniji okolišni čimbenik koji stimulira nastanak parodontitisa na više različitih načina. Pušenje djeluje na imunološku sposobnost domaćina tako da smanjuje broj imunoloških stanica, ponajprije neutrofilnih granulocita te tako umanjuje imunološki

odgovor. Pušači imaju smanjenu sposobnost cijeljenja rana zbog manjka protoka krvi među desnama te imaju izraženo povećanu prevalenciju patogenijih bakterija u oralnoj flori. Utvrđeno je da bez obzira na dnevnu količinu konzumiranih cigareta svi pušači imaju podjednak rizik od gubitka alveolarne kosti i pričvrstka zuba. Također je utvrđeno da pušenje može umanjiti utjecaj terapije, a prvi korak u liječenju parodontitisa trebao bi biti dugotrajan prestanak pušenja (7,12).

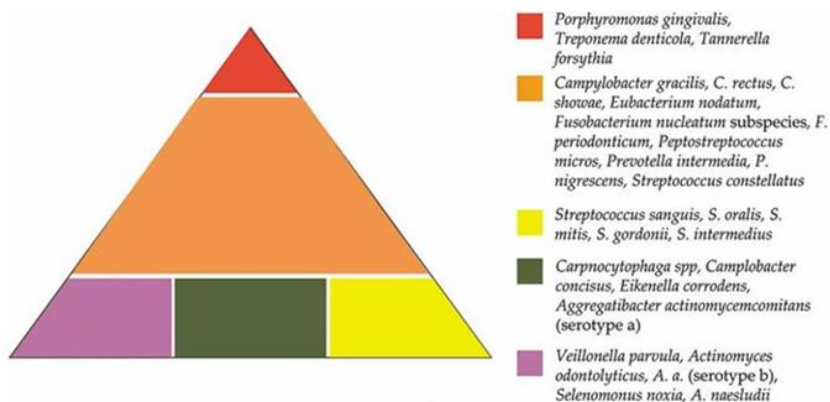
### **1.2.5. Dijabetes**

Pacijenti s nekontroliranim dijabetesom imaju povećan rizik od nastanka parodontitisa nego zdravi pojedinci ili pacijenti s kontroliranim dijabetesom. Glavni uzrok tome leži u činjenici da osobe s nekontroliranim dijabetesom imaju smanjenu funkciju neutrofila i povećanu funkciju makrofaga koji posljedično luče veće količine protuupalnih citokina poput IL-17 (interleukin 17), IL-23 (interleukin 23), IL-6 (interleukin 6) i TNF- $\alpha$  (*tumour necrosis factor alpha*). Citokini IL-17 i TNF- $\alpha$  potiču resorpciju kostiju i osteoklastnu aktivnost što pogoduju propadanju alveolarne kosti. Nekontrolirani dijabetes utječe na metabolizam vezivnog tkiva i na nastajanje vaskularnih promjena što pogoršava kliničku sliku parodontitisa. Konstantno povišene razine glukoze u krvi mogu nepovoljno utjecati na liječenje parodontitisa stoga je potrebno da ovakvi pacijenti redovno prate razinu glukoze i HBA1c (hemoglobin A1c) u krvi. Ali, veza između dijabetesa i parodontitisa je također i dvostrana. Dugotrajna upala, koja je ključna karakteristika kroničnog parodontitisa, smanjuje osjetljivost organizma na inzulin te tako doprinosi pogoršanju dijabetesa. Istodobno, kronična infekcija povećava količinu serumskih protuupalnih citokina što otežava reguliranje glukoze u krvi i povećava potrebu tijela za inzulinom (7,9,19).

### 1.3. PARODONTALNI PATOGENI

Tijekom 70-ih godina prošlog stoljeća počela se proučavati razlika između mikrobioma zdravih zuba i mikrobioma zuba zahvaćenih parodontitisom u različitim stupnjevima. Utvrđeno je da se mikrobiom zdravih zuba pretežito sastoji od fakultativnih gram pozitivnih bakterija, dok se u mikrobiomu zuba zahvaćenih parodontitisom nalaze većinom kompleksne anaerobne gram negativne bakterije. Populacija patogenih anaeroba se razlikovala i u različitim stupnjevima parodontnog oštećenja. Što je oštećenje bilo dublje i što je trajalo duže, to se populacija bakterija sastojala od patogenijih vrsta (20). Proučavajući uzročnike bolesti desni Sigmund Socransky postavio je pet glavnih kriterija (patogenost bakterije, mehanizmi patogenosti, povezanost s bolešću, odgovor domaćina, uklanjanje organizma) po kojima se bakterije svrstavaju u određene kategorije patogenosti koje su označene različitim bojama. Uzimajući u obzir sve navedene faktore, smatra se da se i patogenije bakterije normalno nalaze u usnoj šupljini, ali prilikom narušavanja mikrobiomske ravnoteže može doći do pretjeranog razmnožavanja patogenijih vrsta i stvaranja štetnih plakova (21).

Glavni čimbenici po kojima su se bakterije razvrstavale su bile njihova patogenost u nastanku parodontitisa i s obzirom na to razvrstane su u pet različitih kategorija: crvena, narančasta, zelena, žuta i ljubičasta (Slika 3.).



Slika 3. Podjela parodontnih patogena po Socranskyu

Izvor: [https://www.researchgate.net/publication/369748620\\_Current\\_concepts\\_in\\_the\\_pathogenesis\\_of\\_periodontitis\\_from\\_symbiosis\\_to\\_dysbiosis/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/369748620_Current_concepts_in_the_pathogenesis_of_periodontitis_from_symbiosis_to_dysbiosis/figures?lo=1)

U crvenoj kategoriji se nalaze bakterije koje su najpatogenije te ih pronalazimo u uznapređovalim fazama parodontne bolesti, a to su: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia*. U narančastoj se kategoriji nalaze: *Campylobacter gracilis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter showae*, *Prevotella intermedia*, *Streptococcus constellatus*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella nigrescens*. U žutoj kategoriji se nalaze razne bakterije roda *Streptococcus*. U zelenoj se kategoriji nalaze *Capnocytophaga spp*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* i *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (serotip a). U ljubičastoj kategoriji se nalaze bakterije *Veillonella parvula*, *Actinomyces odontolyticus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (serotip b), *Selenomonas noxia* i *Actinomyces naeslundii* (22).

### **1.3.1. Bakterije crvene kategorije**

*Porphyromonas gingivalis* je anaerobna štapičasta gram negativna bakterija. Povezuje se s oko 85% svih slučajeva kroničnog parodontitisa. Izravno je povezana s težinom parodontitisa te se smatra jednim od glavnih uzročnika parodontne bolesti. Proizvodi širok spektar virulentnih faktora koji uzrokuju destrukciju tkiva bilo direktno ili preko medijatora upale. Glavni faktori virulencije *P. gingivalis* su: lipid A koji je sastavni dio lipopolisaharidne membrane, kapsula, fimbrije i proteaza gingipain. Lipid A potiče stvaranje upale i lučenje proupalnih citokina te tako sudjeluje u održavanju i progresiji parodontitisa. Lipid A ima heterogenu strukturu koja se može razlikovati među različitim sojevima *P. gingivalis* što je jedan od uzroka različitog imunološkog odgovora na parodontitis u pojedinaca. Fimbrije sudjeluju u adheziji bakterije na domaćinska tkiva, stanice i molekule poput fibrinogena, fibronektina i laktoferina. Također omogućuje adheziju i agregaciju *P. gingivalis* s ostalim bakterijama biofilma i potiču proizvodnju citokina. Gingipaini pripadaju obitelji cisteinskih proteaza te su odgovorni za 85% ekstracelularne proteazne aktivnosti *P. gingivalis*. Inaktiviraju imunološke inhibitore, omogućuju koagregaciju s ostalim bakterijama biofilma, degradiraju fibrinogen, onemogućuju koagulaciju krvi i potiču daljnje krvarenje. Kapsula omogućava bakteriji da izbjegne fagocitozu te potiče imunološki odgovor domaćina.



Novijim je istraživanjima otkriveno da *P. gingivalis* ne može uzrokovati parodontitis bez prisustva ostalih simbiotskih bakterija, nego se oslanja na određene bakterije poput *Streptococcus gordonii* i *Fusobacterium nucleatum* koje u koagregaciji s *P. gingivalis* promoviraju njenu kolonizaciju i adheziju te stoga pridonose njenoj patogenosti (23,24).

*Tannerella forsythia* je anaerobna gram negativna bakterija i jedan je od glavnih patogena koji sudjeluju u nastanku parodontitisa. Može je se pronaći u velikim količinama u parodontnim džepovima osoba s kroničnim parodontitisom i osoba s prekomjernom težinom. Neki od faktora virulencije su PrtH proteaza koja inducira proizvodnju IL-8, proteaza karilizin koja potiče otpuštanje TNF- $\alpha$  i protein serpin koji inhibira neutrofilne serinske proteaze. Jedno od glavnih obilježja *T. forsythia* jest da se većinom pronalazi u sinergističkom odnosu s *Fusobacterium nucleatum* (25).

*Treponema denticola* je anaerobna gram negativna spiroheta koja se u najvećem broju može pronaći u najdubljim dijelovima parodontalnog džepa. Njena dva najvažnija faktora virulencije su Msp protein i serinska proteaza dentilizin. Njihova je glavna uloga poticanje upalnog odgovora i stvaranje otpornosti na opsonizaciju i fagocitozu. Često se pronalazi u sinergiji s *P. gingivalis* (26).

### **1.3.2. Bakterije narančaste kategorije**

*Prevotella intermedia* je anaerobna gram negativna bakterija. Njeni najvažniji faktori virulencije su lipopolisaharid (LPS) koji stimulira lučenje IL-8, fimbrije, serinske i cisteinske proteinaze koje sudjeluju u destrukciji parodontnog tkiva te sposobnost hemaglutinacije i hemolize. Pronađeno je da povišenje razina steroidnih hormona poput estrogena pozitivno utječe na povećanje broja kolonija *P. intermediae* (27).

### **1.3.3. Bakterije žute kategorije**

*Streptococcus gordonii* i *Streptococcus oralis* su gram pozitivne bakterije koje se najčešće pronalaze u zubnom biofilmu. Iako se smatraju simbiotskim bakterijama, mogu imati aktivnu ulogu u razvoju parodontitisa. Dok *S. gordonii* predominantno kolonizira

zubnu površinu, *S. oralis* se češće pronalazi na mekom tkivu usne šupljine. Streptokoki su jedni od najvažnijih ranih kolonizatora zubnog biofilma. Na svojim staničnim membranama ispoljavaju mnoštvo proteina koji im omogućuju adheziju na zubnu površinu i koagregaciju s drugim bakterijama. Stvarajući koagregate s ostalim parodontopatogenim bakterijama poput *P. gingivalis*, oralni streptokoki promoviraju nastanak upale i resorpciju alveolarne kosti (28).

#### **1.3.4. Bakterije zelene kategorije**

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* je gram negativna bakterija koja, iako spada u zelenu kategoriju, je jedan od najpoznatijih uzročnika agresivnog parodontitisa u mladih ljudi. Glavni faktori virulencije su fimbrije, adhezini te proizvodnja endo- i egzotoksina. Endotoksine proizvode sve gram negativne bakterije i njihova je glavna uloga izazivanje lokalne i sistemske upale. Egzotoksin Cdt i leukotoksin A su specifični za *A. actinomycetemcomitans*. Egzotoksin Cdt blokira proliferaciju domaćinskih stanica i pojačava ekspresiju receptora koji sudjeluju u osteoklastogenezi. Leukotoksin A selektivno djeluje na hematopoetske stanice tako da prekida integritet stanične membrane i izaziva masivni proupalni odgovor monocita i makrofaga (29).

#### **1.3.5. Bakterije ljubičaste kategorije**

*Veillonella parvula* je anaerobna gram negativna bakterija koja je dio normalne flore usne šupljine, probavnog i mokraćno-spolnog sustava. Povezuje ju se s raznim infekcijama, a jedna od njih je i rani parodontitis. *V. parvula* je jedan od ranih kolonizatora zubnog biofilma te najčešće koagregira sa *S. gordonii* i *F. nucleatum*. Točni molekularni mehanizmi kojima ova bakterija potiče upalni odgovor nisu u potpunosti poznati, ali je utvrđeno da *V. parvula* proizvodi hranjive tvari potrebne za preživljavanje i rast ostalih parodontopatogenih bakterija (30).

## **1.4. NASTANAK ZUBNOG PLAKA (BIOFILMA)**

Nastanak zubnog biofilma prate dinamične promjene u oralnoj bakterijskoj populaciji te postupni dodatak specifičnih bakterijskih grupa na glikoproteinski kompleks površine zuba. U početku se zubni plak sastoji većinom od gram pozitivnih fakultativnih anaeroba kojima je šećer glavni izvor energije poput *Actinomyces spp* i *Streptococcus spp* koji čine i do 80% ukupnog biofilma. Od ostalih ranih kolonizatora bitno je spomenuti i gram negativnu *Veillonella spp* koja u interakciji sa streptokokima značajno povećava masu biofilma. Kako razvoj biofilma napreduje, tako dolazi do tranzicije iz aerobnog sustava u anerobni gdje dominiraju gram negativni anaerobi. Sekundarni kolonizatori kao što su *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* i *Capnocytophaga spp* adheriraju na primarne kolonizatore u procesu koji se naziva koagregacija. Potom se na njih agregiraju kasni kolonizatori poput *Porphyromonas gingivalis* (31).

## **1.5. INDIKACIJE ZA ODREĐIVANJE PARODONTOPATOGENIH BAKTERIJA**

Iako se parodontitis u većini slučajeva uspješno liječi mehaničkim metodama i poboljšavanjem oralne higijene, u težim je slučajevima potrebna dodatna dijagnostika koja će pomoći u klasifikaciji samog parodontitisa i poboljšati ishod liječenja. Jedna od metoda dodatne dijagnostike su i mikrobiološki testovi kojima se поближе određuje vrsta bakterija prisutnih u usnoj šupljini. Glavne indikacije za provedbu mikrobioloških testova su agresivni parodontitis, refraktorni parodontitis (terapija ne uspijeva iako je pravilno provedena) i teški parodontitis povezan sa sistemskim bolestima. Primarni cilj mikrobioloških testova je potvrda prisutnost tzv. bakterija crvenog kompleksa (*P. gingivalis*, *T. denticola* i *P. intermedia*) i bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* koja se često pronalazi u slučajevima agresivnog parodontitisa. Identifikacija bakterija doprinosi učinkovitijem

liječenju tako što omogućuje odabir podobne antibiotske terapije. Glavni mikrobiološki testovi koji se provode u identifikaciji oralnih bakterija su kultivacija bakterija koja je ujedno i referentna metoda te molekularne metode poput Real-time PCR-a (engl. *Real-time polymerase chain reaction* ) i DNA STRIP tehnologije (2).

## **2. CILJ RADA**

Cilj ovog rada je prikazati značaj detekcije parodontopatogenih bakterija pomoću različitih metoda iz uzorka usne šupljine kod pacijenata s parodontitisom radi primjene terapije u njihovu liječenju.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJAL

Za određivanje parodontopatogenih bakterija u usnoj šupljini kao uzorak se koristi subgingivalni plak koji se uzorkuje pomoću sterilnog štapića (Slika 4).



Slika 4. Sterilni štapići za uzorkovanje

Izvor: <https://www.waldent.com/products/waldent-pp>

Prije samog uzorkovanja površinu zuba potrebno je oprati 70%-tnim etanolom i posušiti sterilnom vatom. Sterilni štapić se uvodi u najdublji dio parodontnog džepa i drži u njemu oko 10-15 sekundi, a zatim se stavi u sterilnu tubicu (Slika 5) (32).



Slika 5. Uzorkovanje subgingivalnog plaka sa sterilnim štapićem

Izvor: <https://www.google.hr/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Fplaque-collection-with-paper-point-for-microbiological-sampling>

## 3.2. METODE

Postoji nekoliko laboratorijskih metoda koje se mogu koristiti za identifikaciju parodontopatogenih bakterija iz kliničkih uzoraka (bakterijska kultura, metode temeljene na analizi nukleinske kiseline).

### 3.2.1. Bakterijska kultura

Tehnika bakterijske kultivacije je dugo godina bila zlatni standard mikrobiološke dijagnostike patogenih parodontnih bakterija. Glavne značajke postupka kultivacije bakterija su visoka osjetljivost i mogućnost direktnog izvođenja antibiograma što je vrlo korisno u slučajevima kada postoji indikacija za antibiotsku terapiju. Nakon uzorkovanja, subgingivalni plak se do laboratorija transportira u posebnim transportnim podlogama. Uspjeh bakterijske izolacije zavisi od izbora hranilišta na koji će se uzorak inokulirati. Vrsta hranilišta ili podloge se odabire prema dijagnozi bolesti, vrsti uzorka i mjesta uzimanja uzorka. Parodontopatogene bakterije su većinom anaerobne, stoga se moraju uzgajati u atmosferi s anaerobnim uvjetima. Subgingivalni plak se nasaduje na selektivne i neselektivne podloge. Jedna od neselektivnih podloga koja se koristi za kvantifikaciju uzgojene anaerobne i fakultativno anaerobne bakterijske flore jest Columbia agar obogaćen s 5% -tnom goveđom krvi, heminom i vitaminom K<sub>1</sub>, a za selektivan uzgoj bakterijskih vrsta s crnim pigmentom poput *Porphyromonas* i *Prevotella* koristi se Kanamicin Vankomicin agar (Slika 6).

Za izolaciju anaerobnih organizama, kulture se inkubiraju u atmosferi od 90% N<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub> u anaerobnom kabinetu 6 dana na 37 °C. Identifikacija mikroorganizama slijedi na temelju njihove tipične kolonije i bakterijske morfologije (33).



Slika 6. Columbia agar i Kanamicin Vankomicin agar

### 3.2.2. Metode temeljene na analizi nukleinske kiseline

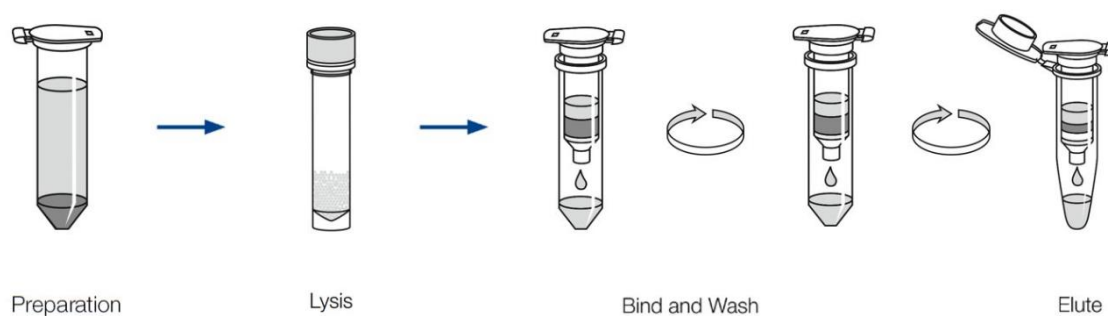
#### a) Izolacija DNA

Za molekularne analize subgingivalnog plaka potrebno je izolirati bakterijsku DNA iz uzorka. Izolacija DNA se sastoji od nekoliko koraka koji uključuju razaranje membrane, uklanjanje proteina i ostalih nečistoća, a nakon toga pročišćavanje i otapanje dobivene DNA.

Dostupni su razni komercijalni kitovi za izolaciju DNA. Jedan od takvih kitova je i *NucleoSpin®-Microbial kit* (Macherey-Nagel, Duren, Germany).

*NucleoSpin®-Microbial kit* dizajniran je za brzu izolaciju i pročišćavanje DNA iz mikroorganizama (gram-negativne i gram-pozitivne bakterije, kvasci i gljivice). Kit sadrži MN Bead Tubes tipa B (staklene kuglice) u kombinaciji s tekućom proteinazom K. Postupak je brz, jednostavan i pouzdan te se dobiju velike količine DNA iz širokog spektra mikrobnih uzoraka.

Odgovarajući uvjeti vezanja DNA za NucleoSpin Microbial DNA kolone postižu se dodavanjem velikih količina kaotropnih soli (Binding Buffer MG) u lizat. Nečistoće se uklanjaju pomoću dva učinkovita koraka pranja. Nakon toga, DNA se otapa s blago alkalnim puferom (Slika 7) (34).



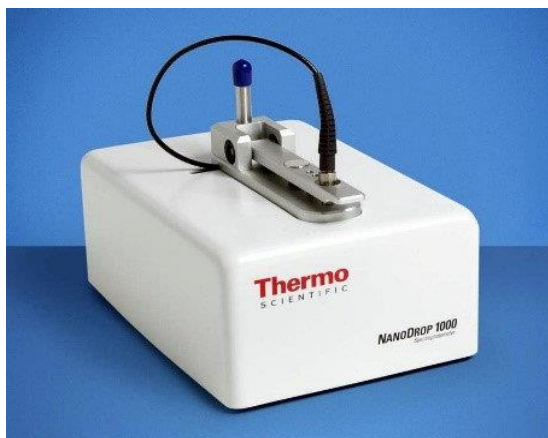
Slika 7. Shema postupka izolacije DNA

Izvor: <https://www.mn-net.com/nucleospin-microbial-dna-mini-kit-for-dna-from-microorganisms-740235.50>



## b) Određivanje koncentracije DNA

Količina izolirane DNA određuje se spektrofotometrijski na 260 nm pomoću spektrofotometra NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, SAD), a njezina čistoća omjerom apsorbancije izmjerene na 260 i 280 nm (Slika 8) (34).



Slika 8. Spektrofotometar NanoDrop ND-1000

Izvor: <https://www.yalistlabs.com/product-page/nanodrop-1000-nd-1000>

### 3.2.2.1. *Micro-IDent*® Test

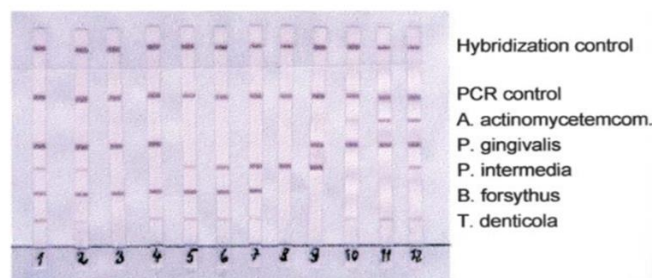
*Micro-IDent*® Test (Hain Lifescience, Nehren, Germany) je komercijalni molekularni test koji se bazira na DNA STRIP tehnologiji. Omogućava detekciju pet patogenih parodontnih bakterija: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* i *Treponema denticola*. Test se provodi kroz dva povezana postupka: umnožavanje i hibridizacija (34).

### a) Umnožavanje

Svi reagensi koji su potrebni za umnožavanje (početnice, pufer, magnezij, Taq polimeraza) nalaze se već u pripremljenim amplifikacijskim smjesama A i B. Uzorci se umnožavaju u reakcijskoj smjesi volumena 50  $\mu\text{L}$  u kojoj se nalazi 5  $\mu\text{L}$  izolirane DNA, 10  $\mu\text{L}$  amplifikacijske smjese A i 35  $\mu\text{L}$  amplifikacijske smjese B. Kao negativna kontrola koristi se sterilna voda. Umnažanje se odvija u 4 faze. Prva faza se sastoji od jednog ciklusa trajanja 5 minuta na 95°C. Potom slijedi druga faza koja se sastoji od 10 ciklusa na 95°C po 30 sekunda i 10 ciklusa na 58°C po 2 minuta. Treća faza se sastoji od 20 ciklusa na 95°C po 25 sekunda, 20 ciklusa na 53°C po 40 sekunda i 20 ciklusa na 70°C po 40 sekunda. Posljednja faza se sastoji od jednog ciklusa trajanja 8 minuta na 70°C (34).

### b) Hibridizacija

Dobiveni umnoženi produkti denaturiraju se i inkubiraju na 45°C u hibridizacijskom puferu skupa s trakicama na kojima se nalaze amplifikacijska i hibridizacijska kontrolna linija te pet linija (proba) za određenu bakterijsku vrstu. Umnoženi produkti se vežu na komplementarne probe, a nakon toga slijedi ispiranje sve nevezane nespecifične DNA. Potom se dodaje alkalna fosfataza konjugirana sa streptavidinom, uzorci se čiste i produkti hibridizacije se vizualiziraju dodavanjem supstrata alkalnoj fosfatazi. Trakice se zalijepljene na obrasce za analizu, a rezultati se iščitaju pomoću evaluacijskog lista (Slika 9) (34).



Slika 9. Trakice sa specifično vezanom DNA

Izvor: <https://www.semanticscholar.org/paper/Comparison-of-microbial-cultivation-and-a-PCR-based-Eick-Pfister/e6e3adb92d25bf6920dbf730735269409f80aa1c>

### 3.2.2.2. Real-time PCR

Real-time PCR (lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu) reakcija odvija se u volumenu od 50  $\mu\text{L}$  za svaku bakteriju pojedinačno. Reakcijska smjesa sastoji se od 5  $\mu\text{L}$  izolirane bakterijske DNA, 18  $\mu\text{L}$  sterilne vode, 25  $\mu\text{L}$  Power Syber Green PCR Master Mixa i 2  $\mu\text{L}$  primera specifičnog za traženu bakterijsku vrstu. Primer sekvence pripadaju genu 16S ribosomske RNA. U svaku analizu uključene su pozitivna i negativna kontrola. PCR je proveden u ABI Prism 7500 Real-Time PCR sustavu (Applied Biosystems, Waltham, MA, SAD) (Slika 10) (34).



Slika 10. ABI Prism 7500 Real-Time PCR sustav

Izvor: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4351105>

Umnožavanje i detekcija odvija se u MicroAmp optičkim reakcijskim pločicama u 96 jažica. Uvjeti pri kojima se odvija PCR (Tablica 1):

Tablica 1. Uvjeti nastajanja PCR reakcije

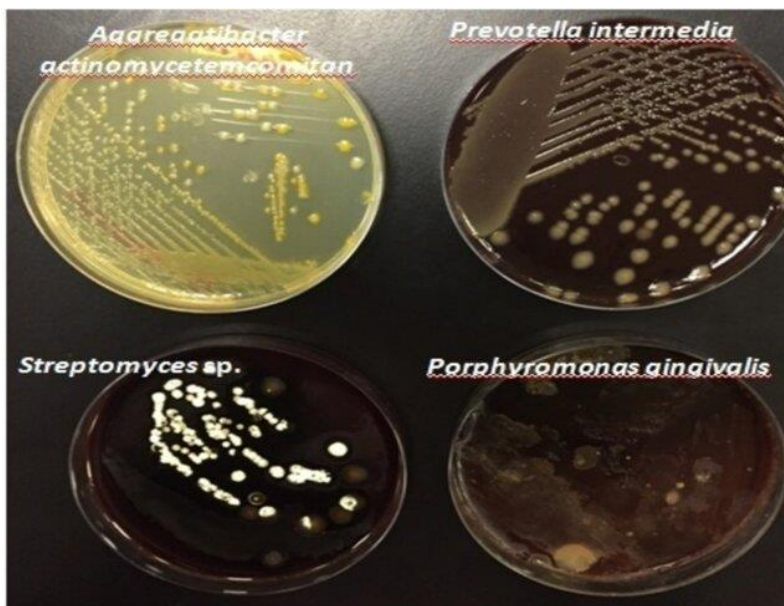
Program	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Inkubacija	95°C	10 min	1
Amplifikacija	95°C	5 sec	40
	60°C	34 sec	

Nastajanje PCR produkata može se pratiti u svakom ciklusu praćenjem povećanja fluorescencije (34).

## 4. REZULTATI

### 4.1. BAKTERIJSKA KULTURA

Nakon uzgoja bakterija na hranjivoj podlozi broji se ukupan broj živih bakterijskih stanica u izraslim kolonijama (Colony Forming Units, CFU). Broj potvrđenih kolonija na izvornoj ploči množi se s faktorom razrjeđenja i podijeli s volumenom ploče koja sadrži kulturu (CFU/ml) (Slika 11).



Slika 11. Bakterijski rast (čiste kolonije) glavnih parodontnih patogena izoliranih iz uzoraka subgingivalnog plaka

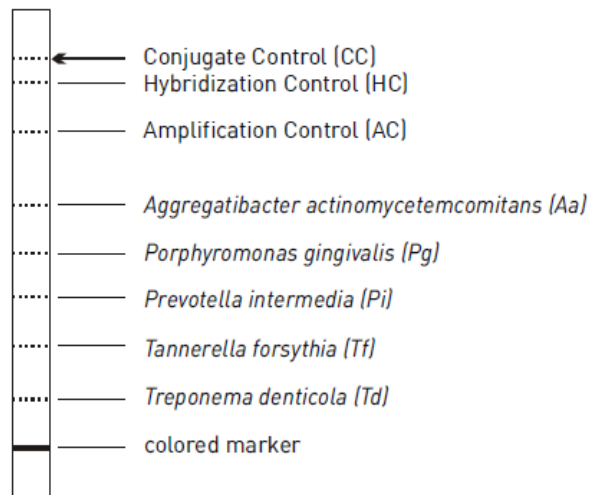
Izvor: [https://www.researchgate.net/publication/345391731\\_Evaluation\\_of\\_Antibacterial\\_Activity\\_of\\_Pine\\_Tar\\_on\\_Periodontal\\_Pathogenic\\_Bacteria\\_An\\_In\\_Vitro\\_Study/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/345391731_Evaluation_of_Antibacterial_Activity_of_Pine_Tar_on_Periodontal_Pathogenic_Bacteria_An_In_Vitro_Study/figures?lo=1)

## 4.2. MICRO-IDENT® TEST

Svaka hibridizacijska test traka u Micro-IDent® Testu sadrži 3 tri vrste kontrole koje služe da se potvrdi uspješnost izvedbe testa:

- kontrola konjugacije (CC),
- kontrola hibridizacije (HC)
- kontrola amplifikacije (AC).

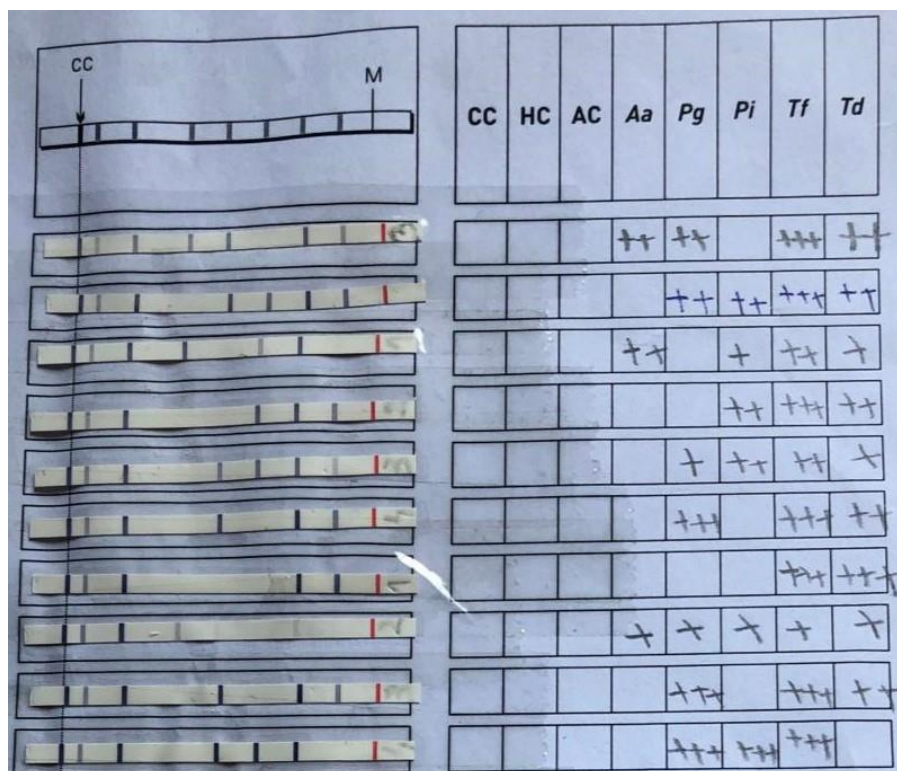
Kontrola konjugacije koristi se za provjeru vezanja konjugata i reakcije sa supstratom. Kontrola hibridizacije potvrđuje uspješnost hibridizacijske reakcije, a kontrola amplifikacije uspješnost amplifikacije. Prije očitavanja rezultata potrebno je provjeriti jesu li vrpce kontrola vidljive (pozitivne). Na hibridizacijskim trakicama nalazi se pet vrpce specifičnih za određenu bakterijsku vrstu. Pozitivan ili negativan rezultat bilo koje bakterijske vrste važeći je jedino uz prisutnost vidljivih kontrolnih vrpce (Slika 12).



Slika 12. Trakica Micro-IDent® Testa

Rezultati Micro-IDent® Testa očitavaju se prema intenzitetu obojenja vrpce za određenu bakterijsku vrstu (Slika 13):

- 0: nema vidljive trake - negativno
- +: slabo vidljiva traka – slabo pozitivno
- ++: jasno vidljiva traka – pozitivno
- +++: jasno vidljiva traka – jako pozitivno.

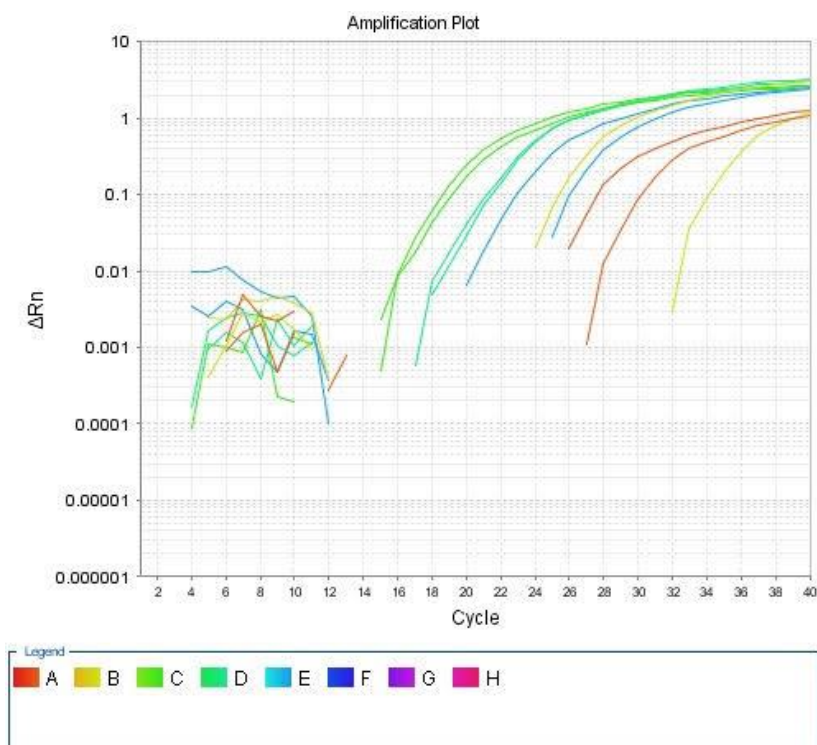


Slika 13. Primjer rezultata dobivenih Micro-IDent® Testom (CC- vrpca kontrole konjugacije, (HC) vrpca kontrole hibridizacije, (AC) vrpca kontrole amplifikacije, (Aa, Pg, Pi, Tf, Td) vrpce za otkrivanje pojedine bakterije.

### 4.3. REAL-TIME PCR

Kvalitativno otkrivanje parodontopatogenih bakterija u uzorku može se napraviti pomoću Real-time PCR-a. Rezultati se dobivaju na osnovu vrijednosti Ct (vrijednost "praga ciklusa") koja se definiira kao prvi ciklus reakcije u kojem se može detektirati razina fluorescencije iznad granične vrijednosti. Prilikom kvalitativne analize pojava Ct vrijednosti je dokaz prisutnosti parodontopatogenih bakterija u uzorku, a odsutnost Ct vrijednosti negira njihovo prisustvo. U kvalitativnoj analizi je potrebno imati i kontrolni gen koji će potvrditi vjerodostojnost rezultata.

Pomoću softverskog programa obradom fluorescencije dobije se elektroferogram koji prikazuje na apscisi broj ciklusa reakcije, a na ordinati intenzitet fluorescencije. Krivulje različitih boja prikazuju postojanje određene bakterije u analiziranim uzorcima (Slika 14).



Slika 14. Prikaz krivulja analiziranih uzoraka Real-Time PCR-om

Rezultat za svaku bakteriju dobije se iz Ct raspona PCR analize u stvarnom vremenu: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*: 0 (negativni) > 22.1; (+) 18.1–22; (++) 14.1–18; (+++) < 14; *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia*: 0 (negativna) > 26.1; (+) 22.1–26; (++) 18.1–22; (+++) < 18 (Tablica 2).

Tablica 2. Očitavanje rezultata prema vrijednosti Ct

Vrijednost (Ct)	Aa	Pg	Pi	Tf	Td
12	+++	+++	+++	+++	+++
16	++	++	++	+++	+++
20	+	+	+	++	++
24	-	-	-	+	+
28	-	-	-	-	-
<i>Odabрати vrijednost koja je najbliža očitanoj Ct vrijednosti u programu</i>					

Dobiveni rezultati ispišu se u obliku nalaza (Slika 15).



Prezime i ime:  
 Spol:  
 Rođen/a:  
 OIB / Broj putovnice:  
 Adresa:  
 Kontakt telefon:

### Nalaz mikrobiološke pretrage

Broj protokola  
**598**

Zaprimljeno: 08.02.2024. 15:41  
 Završeno: 14.02.2024. 15:16

Uzorak: Subgingivalni sadržaj na endodontskom končiću  
 Pretraga: PCR na paradontopatogene bakterije  
 (A.actinomycetemcomitans,P.gingivalis,P.intermedia,T.forsythia,T.denticola)-semikvantitativno

Pretraga	Rezultat	Metoda	Kit
PCR na Aggregatibacter actinomycetemcomitans	<b>NEGATIVAN</b>	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/Metoda RT-PCR uz Sybr-Green/analiza krivulja taljenja (validirano prema micro-IDent®, Hain Lifescience GmbH, CE-IVD i PeriodontScreen Real-TM CE, Sacace Biotechnologies)
PCR na Porphyromonas gingivalis	<b>NEGATIVAN</b>	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/Metoda RT-PCR uz Sybr-Green/analiza krivulja taljenja (validirano prema micro-IDent®, Hain Lifescience GmbH, CE-IVD i PeriodontScreen Real-TM CE, Sacace Biotechnologies)
PCR na Prevotella intermedia	<b>POZITIVAN (++)</b>	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/Metoda RT-PCR uz Sybr-Green/analiza krivulja taljenja (validirano prema micro-IDent®, Hain Lifescience GmbH, CE-IVD i PeriodontScreen Real-TM CE, Sacace Biotechnologies)
PCR na Tannerella forsythia	<b>POZITIVAN (++)</b>	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/Metoda RT-PCR uz Sybr-Green/analiza krivulja taljenja (validirano prema micro-IDent®, Hain Lifescience GmbH, CE-IVD i PeriodontScreen Real-TM CE, Sacace Biotechnologies)
PCR na Treponema denticola	<b>POZITIVAN (++)</b>	RT-PCR	7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems/Metoda RT-PCR uz Sybr-Green/analiza krivulja taljenja (validirano prema micro-IDent®, Hain Lifescience GmbH, CE-IVD i PeriodontScreen Real-TM CE, Sacace Biotechnologies)

Interpretacija nalaza:	
Semikvantitativan rezultat	Vjerojatna koncentracija patogena/mi suspendiranog uzorka
+++	>10 <sup>8</sup>
++	10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>
+	10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup>
-	<10 <sup>3</sup>

Incikacija za antibiotsku terapiju:	
Paradontopatogene bakterije	Prag značajnosti koncentracije
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	10 <sup>4</sup> /ml
Porphyromonas gingivalis	10 <sup>5</sup> /ml
Prevotella intermedia	10 <sup>5</sup> /ml
Tannerella forsythia	10 <sup>5</sup> /ml
Treponema denticola	10 <sup>5</sup> /ml

Izradio:

Validirao:

Slika 15. Prikaz nalaza analize

## 5. RASPRAVA

Parodontitis je kronična upalna bolest koja zahvaća parodontalno tkivo, uključujući desni, alveolarne kosti i parodontalne ligamente. Ako se ne liječi na vrijeme, može dovesti do ozbiljnih komplikacija kao što su gubitak zuba, sistemske infekcije i povećan rizik za kardiovaskularne bolesti. Ključ u liječenju parodontitisa je rano otkrivanje i precizna dijagnoza, koja se postiže analizom uzorka brisa usne šupljine (8).

Parodontopatogene bakterije, uključujući *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* i *Treponema denticola* su jedan od glavnih uzročnika u nastanku parodontitisa. Propadanje parodonta je vjerojatno posljedica djelovanja različitih toksina koje oslobađaju specifične bakterije, kao i odgovor domaćina na bakterije i njihove produkte. Daljnjim propadanjem parodonta bakterije mogu dospjeti u sustavni krvotok što može utjecati na cjelokupno zdravlje pojedinca. Identifikacija ovih mikroorganizama je važna za određivanje stadija infekcije i odabir odgovarajuće terapije (35).

Bakterijska kultura na hranjivoj podlozi je zlatni standard identifikacije parodontopatogenih bakterija. Bakterije se identificiraju pomoću njihove boje i morfologije na podlozi. Jedne od glavnih prednosti ove tehnike su mogućnost procjene količine bakterija u uzorku i mogućnost testiranja otpornosti izolirane bakterije na antibiotike. Glavni nedostaci bakterijske kulture su izrazito dugo vrijeme potrebno za dobivanje rezultata i neprikladnost metode u analizi velikog broja uzoraka. Isto tako nedostatak ove metode je u činjenici da se određene bakterije poput *T. denticole* i *T. forsythie* ne mogu kultivirati zbog specifičnih uvjeta rasta, stoga rezultati mogu biti lažno negativni (2).

Uzimajući u obzir sve navedene činjenice, molekularne metode poput Real-time PCR-a i DNA STRIP tehnologije u posljednje vrijeme zauzimaju vodeće mjesto u identifikaciji parodontopatogenih bakterija. Glavne prednosti navedenih molekularnih metoda su njihova

visoka osjetljivost, jednostavnost korištenja i kratko vrijeme analize uzorka. Kombinacijom upotrebe bakterijske kultivacije i molekularnih metoda dobiva se detaljan uvid u mikrobiološki sastav parodontnih džepova čime se omogućuje odabir najefikasnije terapije (34).

## 6. ZAKLJUČAK

Parodontitis je jedna od najčešćih kroničnih bolesti današnjice u čijem nastanku i tijeku sudjeluju razni čimbenici, od kojih su najvažniji parodontopatogene bakterije.

Glavne metode analize su bakterijska kultura i molekularne metode poput DNA STRIP tehnologije i RT PCR-a. Identifikacija parodontopatogenih bakterija omogućava odabir najprikladnije terapije za svakog pojedinačnog pacijenta čime se značajno poboljšava ishod liječenja i sprječava se pojava daljnjih komplikacija.

## 7. LITERATURA

1. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *Journal of Clinical Periodontology*. 2017;44(5):456–62.
2. Wolf HF, Rateitschak KH, Rateitschak-Plüss EM. Parodontologija – Stomatološki atlas. 3. prerađeno i prošireno izdanje. Zagreb: Naklada Slap; 2009.
3. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jul;8(7):471–80.
4. Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the oral microbiome: beyond bacteria. *Trends Microbiol*. 2017 May;25(5):362–74.
5. Scapoli L, Girardi A, Palmieri A, Testori T, Zuffetti F, Monguzzi R, et al. Microflora and periodontal disease. *Dental research journal*. 2012 Dec 1;9:S202-6.
6. Lalla E, Papapanou PN. Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases. *Nat Rev Endocrinol*. 2011 Dec;7(12):738–48.
7. Kwon T, Lamster IB, Levin L. Current Concepts in the Management of Periodontitis. *Int Dent J*. 2021 Feb 19;71(6):462–76.
8. Walters J, Lai PC. Should antibiotics be prescribed to treat chronic periodontitis? *Dent Clin North Am*. 2015 Oct;59(4):919–33.
9. Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, Ferrara N, Cittadini A, Rengo C, et al. Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 20;20(6):1414.
10. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Klinička parodontologija i dentalna implantologija. prema 5. engleskom izdanju. Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2010.
11. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):39–53.
12. Darby I. Risk factors for periodontitis & peri-implantitis. *Periodontol 2000*. 2022 Oct;90(1):9–12.

13. Billings M, Holtfreter B, Papapanou PN, Mitnik GL, Kocher T, Dye BA. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Clin Periodontol*. 2018 Jun;45 Suppl 20:S130–48.
14. Christensen LB, Petersen PE, Krustrup U, Kjølner M. Self-reported oral hygiene practices among adults in Denmark. *Community Dent Health*. 2003 Dec;20(4):229–35.
15. Kissa J, Chemlali S, El Houari B, Amine K, Khilil N, Mikou S, et al. Aggressive and chronic periodontitis in a population of Moroccan school students. *J Clin Periodontol*. 2016 Nov;43(11):934–9.
16. Wang CW (Jeff), McCauley LK. Osteoporosis and Periodontitis. *Curr Osteoporos Rep*. 2016 Dec;14(6):284–91.
17. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2020 Jun;83(1):26–39.
18. Borrell LN, Crawford ND. Socioeconomic position indicators and periodontitis: Examining the evidence. *Periodontol 2000*. 2012 Feb;58(1):69–83.
19. Ye L, Cao L, Song W, Yang C, Tang Q, Yuan Z. Interaction between apical periodontitis and systemic disease (Review). *Int J Mol Med*. 2023 May 30;52(1):60.
20. Socransky SS. Microbial Agents and Production of Oral Diseases. *J Dent Res*. 1968 Nov 1;47(6):921–4.
21. Socransky SS. Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. *J Periodontol*. 1977 Sep;48(9):497–504.
22. Socransky S s., Haffajee A d., Cugini M a., Smith C, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. 1998;25(2):134–44.
23. Xu W, Zhou W, Wang H, Liang S. Roles of *Porphyromonas gingivalis* and its Virulence factors in periodontitis. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2020;120:45–84.
24. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jan;15(1):30–44.
25. Malinowski B, Węsierska A, Zalewska K, Sokołowska MM, Bursiewicz W, Socha M, et al. The role of *Tannerella forsythia* and *Porphyromonas gingivalis* in pathogenesis of esophageal cancer. *Infect Agent Cancer*. 2019 Jan 30;14:3.

26. Miyai-Murai Y, Okamoto-Shibayama K, Sato T, Kikuchi Y, Kokubu E, Potempa J, et al. Localization and pathogenic role of the cysteine protease dentipain in *Treponema denticola*. *Mol Oral Microbiol*. 2023 Jun;38(3):212–23.
27. Könönen E, Fteita D, Gursoy UK, Gursoy M. *Prevotella* species as oral residents and infectious agents with potential impact on systemic conditions. *J Oral Microbiol*. 14(1):2079814.
28. Choo SW, Mohammed WK, Mutha NVR, Rostami N, Ahmed H, Krasnogor N, et al. Transcriptomic Responses to Coaggregation between *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus oralis*. *Appl Environ Microbiol*. 87(22):e01558-21.
29. Åberg CH, Kelk P, Johansson A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis. *Virulence*. 2014 Dec 12;6(3):188–95.
30. Matera G, Muto V, Vinci M, Zicca E, Abdollahi-Roodsaz S, van de Veerdonk FL, et al. Receptor Recognition of and Immune Intracellular Pathways for *Veillonella parvula* Lipopolysaccharide. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Dec;16(12):1804–9.
31. Aruni AW, Dou Y, Mishra A, Fletcher HM. The Biofilm Community-Rebels with a Cause. *Curr Oral Health Rep*. 2015 Mar 1;2(1):48–56.
32. Urbán E, Terhes G, Radnai M, Gorzó I, Nagy E. Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method. *Anaerobe*. 2010 Jun;16(3):283–8.
33. Uzunović-Kamberović S. *Medicinska mikrobiologija*. Sarajevo: Nacionalna i univerzitetska biblioteka Bosne i Hercegovine; 2009.
34. Kuret S, Kalajzic N, Ruzdjak M, Grahovac B, Jezina Buselic MA, Sardelić S, et al. Real-Time PCR Method as Diagnostic Tool for Detection of Periodontal Pathogens in Patients with Periodontitis. *Int J Mol Sci*. 2024 May 7;25(10):5097.
35. Nonnenmacher C, Mutters R, Jacoby LF de. Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. *Clinical Microbiology and Infection*. 2001 Apr 1;7(4):213–7.

## 8. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODATCI:

Ime i prezime: Daniela Krajančić

Datum i mjesto rođenja: 13.12.2001., Sydney, Australija

E-mail adresa: daniela.krajancic@gmail.com

### OBRAZOVANJE:

2008. – 2016. Osnovna škola Smokvica, Smokvica

2016. – 2020. Opća gimnazija, Srednja škola Blato, Blato

2021. – 2024. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

### STRANI JEZICI:

Engleski jezik