stomatologie 1 31.1.2006 14:26 Str. 17
proLékaře.cz | 30.10.2026

Využití restrikční analýzy genu pro 16S rRNA pro ověření druhové identity významných orálních mikroorganismů
II. Parodontální mikroorganismy

Novotná G.[1], Janata J.[1], Dušková J.[2], Janatová T.[2]

[1]Mikrobiologický ústav AV ČR, Praha,
ředitelka prof. RNDr. B. Říhová, DrSc.
[2]Výzkumný ústav stomatologický 1. LF UK a VFN, Praha,
přednostka prof. MUDr. J. Dušková, DrSc.

Souhrn

Autoři navrhují jednoduchý algoritmus analýzy genetického materiálu mikroorganismů sliznice ústní dutiny restrikčními endonukleázami, který významně zpřesňuje druhovou identifikaci bakterií spjatých s onemocněním parodontu. Metodika je založena na analýze části genu pro 16S rRNA, její využití je proto univerzální a lze ji kombinovat s identifikací dalších klinicky významných mikroorganismů ústní dutiny, např. viridujících streptokoků. Metodika je přístrojově i celkově finančně nenáročná, neboť využívá omezený počet restrikčních enzymů. Ačkoliv je cenově srovnatelná s klasickými biochemickými postupy druhové identifikace, rozvíjí je o možnost jednoznačného zařazení mikroorganismů, což je obecný rys molekulárně genetických technik.
Klíčová slova: mikroorganismy ústní dutiny – parodontální patogeny – DNA techniky

Novotná G., Janata J., Dušková J., Janatová T.:
Application of Restriction Analysis of the Gene for 16S rRNA for Verification of Species Identity of Important Oral Microorganisms
II. Periodontal Microorganisms

Summary: The authors recommend a simple algorithm for the restriction-endonuclease analysis of genetic material of microorganisms present on mucous membrane of oral cavity. The method provides a significantly more precise species identification of bacteria associated with diseases of periodontium. The method is based on analysis of the part of the gene for 16S rRNA and its use is therefore universal and may be combined with identification of other clinically important organisms of oral cavity, e.g. viridans streptococci. The requirements of the method for equipment and cost are not high, as it uses a limited number of restriction enzymes. Although the method is comparable with classical biochemical methods as far as the cost is concerned, it represents an improvement due to unequivocal classification of the microorganisms, which is a general feature of molecular-genetic techniques.
Key words: microorganisms of oral cavity – periodontal pathogens – DNA techniques

Čes. Stomat., roč. 106, 2005, č. 6, s. 17–21.

ÚVOD

Sekvence rDNA, kódující 16S rRNA, je vysoce konzervovaná v celé prokaryotické říši. Stupeň variability některých jejich úseků je přitom plně dostačující pro jednoznačnou mezidruhovou identifikaci i pro stanovení vzájemné příbuznosti taxonů [3, 5]. Proto je sekvence 16S rDNA považována za obecný standard pro určování a popisování bakteriálních druhů a jejich zařazování do vyšších taxonů.

Na rozdíl od prokazatelné spojitosti destrukce tvrdých zubních tkání s viridujícími streptokoky skupiny mutans, není úloha mikroorganismů v etiopatogenezi onemocnění parodontu tak přímočará. Nebyl dosud popsán jeden druh, ale ani jediná skupina, která by se vyskytovala výhradně v lokalitě s patologickými změnami a mohla být označena za původce onemocnění. Stávající znalosti vedly k vytipování skupiny „suspektních parodontálních patogenů“ přítomných s větší frekvencí v lokalitách změněných než klinicky zdravých. Nejčastěji jsou v souvislosti s onemocněním parodontu zmiňovány *Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans* a *Tannerella forsythensis* (dříve *Bacteroides*

stomatologie 1 31.1.2006 14:26 Str. 18
proLékaře.cz | 30.10.2026

forsythus). Dále jsou do této skupiny zařazovány *Prevotella intermedia, Campylobacter rectus, Eikenella corrodens, Capnocytophaga ochracea, Eubacterium sp., Treponema denticola* a některé další druhy [7].

Z výše uvedeného širokého výčtu druhů je patrný rozdíl oproti druhové identifikaci taxonomicky jasně definované a uzavřené skupiny orálních streptokoků, řešené v předchozí části této práce [6]. Suspektní parodontální patogeny zahrnují taxonomicky velmi rozmanité druhy, uvnitř jednotlivých skupin jsou však naopak druhy velmi blízké, těžko rozlišitelné biochemickými testy. To spolu s všeobecně obtížnou kultivovatelností těchto vesměs anaerobních mikroorganismů zvýhodňuje právě genetické metody identifikace.

Záchytnost dosahovaná metodami kultivačními bývá problematická (*Tannerella forsythensis, Porphyromonas gingivalis* a rod *Prevotella*), v horším případě zcela nedostatečná (rod *Treponema*) [4]. Výsledky založené na kultivačních testech tedy značně zkreslují skutečné zastoupení a význam jednotlivých druhů pro vznik onemocnění. Záchytnost parodontálních patogenů DNA technikami je oproti kultivaci několikanásobně vyšší a výsledky daleko lépe korespondují s diagnostikovanou parodontitidou [1, 2, 8]. Příslibem v této oblasti je zejména rozvoj techniky „real-time PCR“, umožňující kvantifikovat zastoupení významných parodontálních patogenů. Úplná náhrada kultivačního kroku při druhové identifikaci pokročilými DNA technikami však tvoří samostatnou kapitolu této problematiky a přesahuje rámec této publikace.

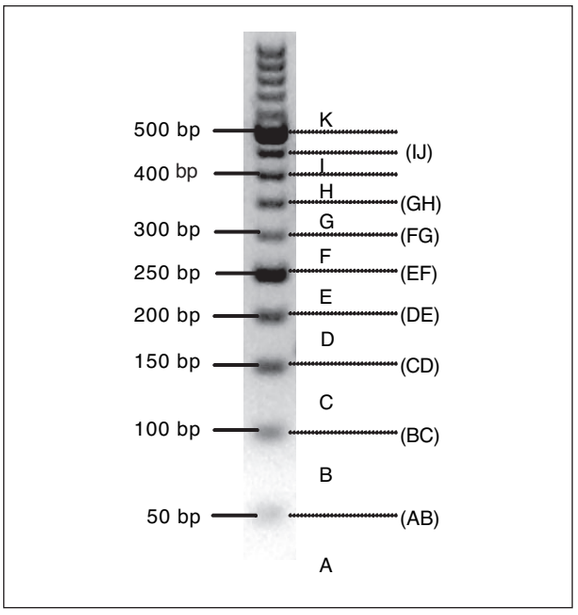
DNA metody se dobře uplatní i jako doplněk klasických identifikačních postupů. Cílem této práce bylo zhodnotit možnosti použití restrikční analýzy oblasti 16S rDNA pro potvrzení a zpestření identifikace významných orálních mikroorganismů podílejících se na vzniku onemocnění parodontu. Navrhovaný postup přináší jednoznačnost při určení druhu a celý proces ekonomicky významně nezatíží.

VÝBĚR TESTOVANÉHO ÚSEKU

Úsek genu 16S rDNA pro restrikční analýzu byl volen tak, aby variabilní oblast, umožňující druhové rozlišení, byla ohraničena oblastmi konzervovanými. To zaručuje univerzální použitelnost i pro druhy taxonomicky značně vzdálené, což je pro daný případ zvláště žádoucí. Modifikovali jsme pro účely uvažované skupiny jeden ze dvojice primerů ověřených pro identifikaci viridujících streptokoků. Ověřili jsme na vybraných zástupcích parodontálních patogenů jednak originální dvojici primerů použitou při identifikaci viridujících streptokoků [6] – přímý 16U1F (5‘-GTTTGATC(AC)TGGCTCAG-3‘) a zpětný 16SCR1 (5‘-CTGCTGGCACGTAGTTA-3‘) ohraničující nejvariabilnější část 16S rDNA na 5‘ konci genu. Amplifikací vymezeného úseku rDNA vznikal ve všech případech očekávaný PCR produkt. Protože u některých cílových druhů existuje ve dvou nukleotidech reverzního primeru variabilita, která by mohla amplifikaci těchto sekvencí teoreticky komplikovat, byl navržen alternativní zpětný primer 16SCR2 (5‘-CGTGCCAGCAGCCGC-3‘). Tento primer je posunutý o šest nukleotidů oproti 16SCR1, délka PCR produktu se proto nepatrně liší. Oba PCR produkty jsou svou délkou (cca 540 párů bází) vhodné pro jednoduchou restrikční analýzu a dále navržené schéma je použitelné pro obě popsané varianty.

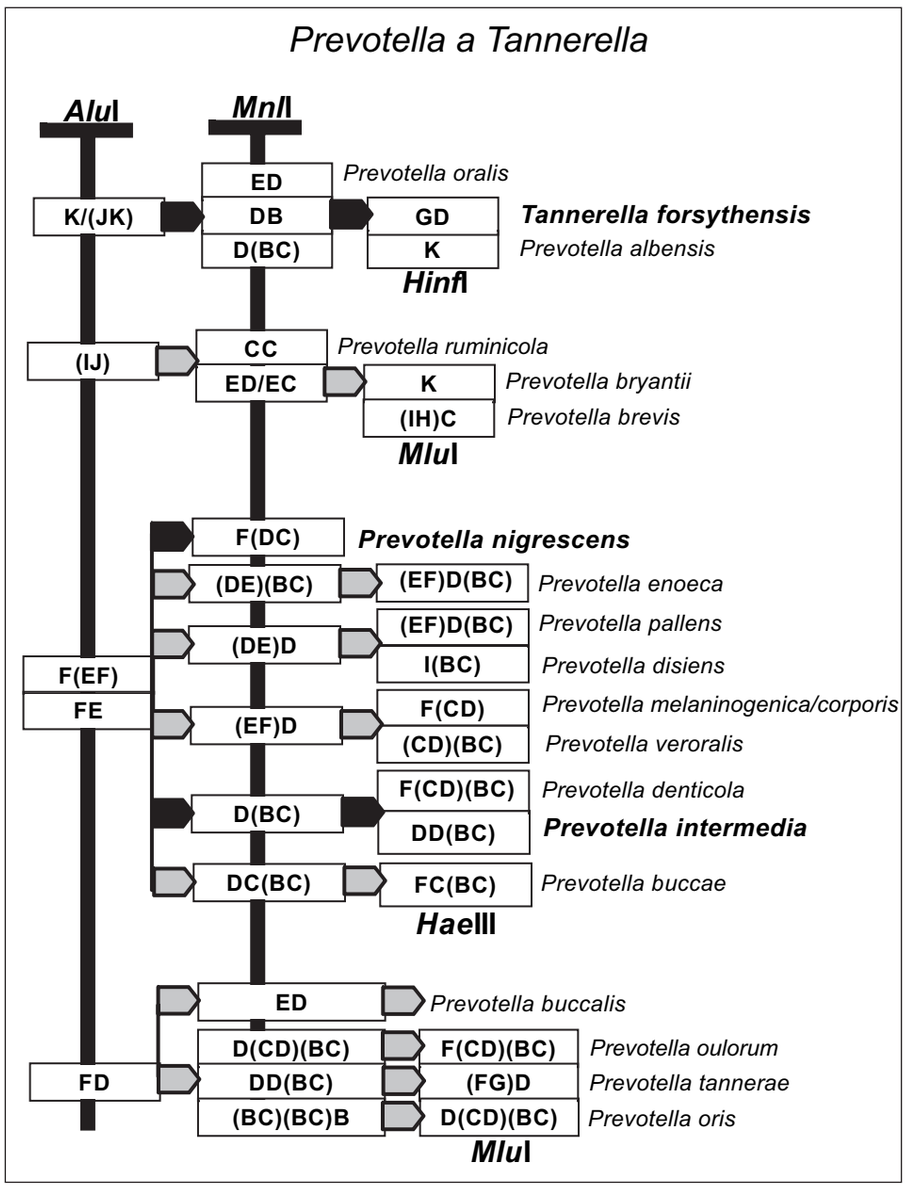
NÁVRH TESTOVACÍHO ALGORITMU

Výběr enzymů a schéma postupu byly navrženy na základě publikovaných sekvencí cílových mikroorganismů. Parametry pro výběr vhodné kombinace enzymů a způsob kódování jsou analogické postupu uvedenému v první části publikace [6]. Pro analýzu byly vybrány tyto restrikční endonukleázy: *Alu*I, *Mnl*I, *Hae*III, *Mlu*I, *Mbo*I a *Stu*I. Analýza sekvencí, výběr enzymů a sestavení pracovního schématu byly provedeny pomocí programů Windows 32 EditSeq 4.03, DNASTAR, Windows 32 MegAlign 4.03, DNASTAR a Clone Manager for Windows, ver. 4.01, Scientific and Education Software.



Obr. 1. Označení polí vymezených fragmenty standardu použité při navrhování algoritmu identifikace významných parapatogenů.

proLékaře.cz | 30.10.2026



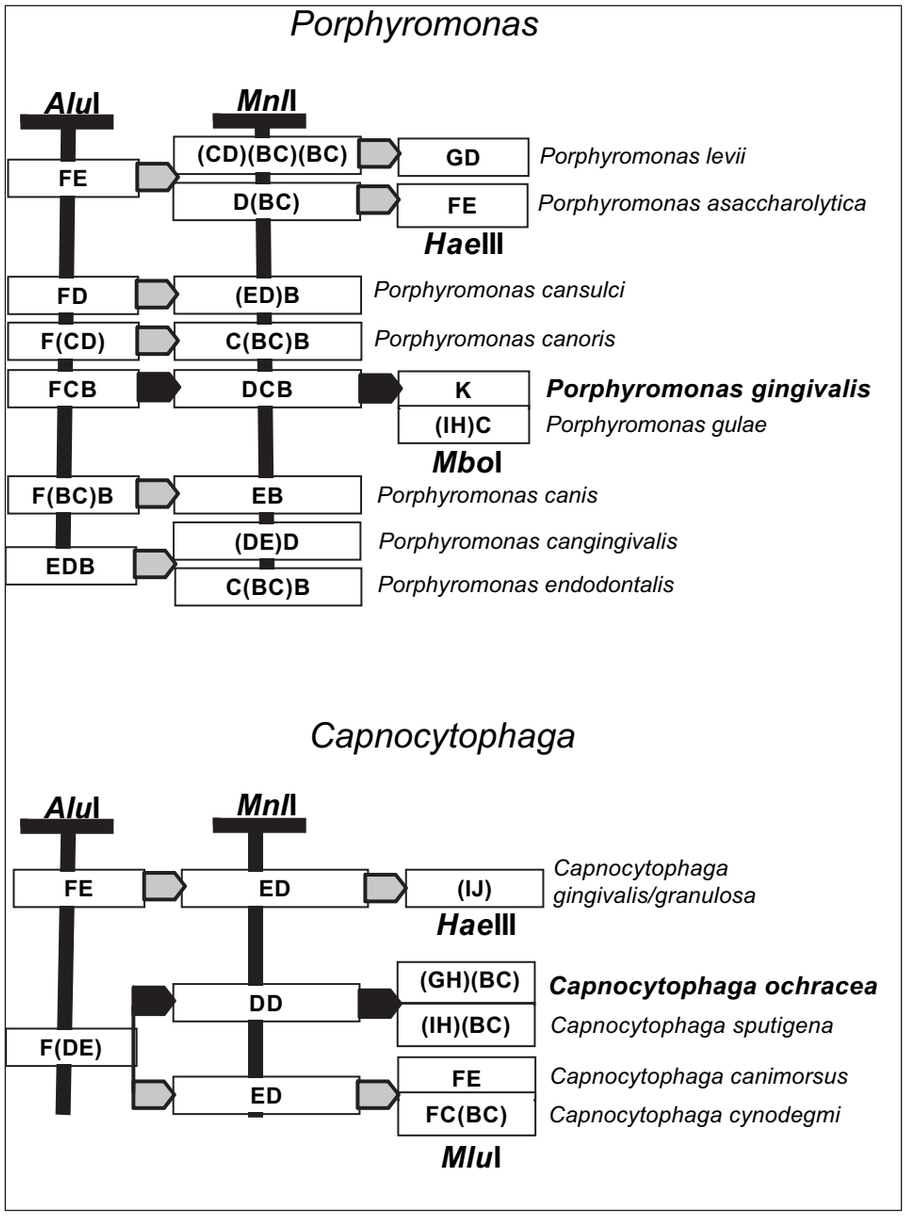
Obr. 2. Schéma algoritmu pro druhovou identifikaci rodů *Prevotella* a *Tannerella*.

Navržený systém umožňuje rozlišení zástupců z rodů *Porphyromonas, Prevotella, Tannerella, Capnocytophaga* a *Actinobacillus,* jejichž někteří zástupci jsou považováni za hlavní suspektní parodontální patogeny (zvýrazněny v obr. 2). Tento obrázek sumarizuje navržený postup restrikční analýzy. Je z něj patrno, že pro jednoznačné určení všech uvažovaných druhů je dostačující restrikce 2–3 enzymy. První dvě štěpení PCR produktů enzymy *Alu*I a *Mnl*I jsou společná pro analýzu všech druhů. Jimi lze většinu kmenů zařadit do menších skupin většinou blízce příbuzných druhů a některé druhy i zcela identifikovat. Výsledek této společné části identifikace určuje případný následný postup dalším enzymem. To je postačující pro rozlišení všech uvedených druhů. Je však nutno upozornit, že v uvažovaném souboru patogenů existují dvojice či skupiny zástupců různých skupin, které prvotní analýzou enzymy *Alu*I a *Mnl*I poskytují zaměnitelné produkty štěpení. Jde konkrétně o druhy *Prevotella intermedia* či *Prevotella denticola* vs. *Porphyromonas asaccharolytica* anebo *Prevotella pallens* či *Prevotella disiens* vs. *Capnocytophaga gingivalis*. Ve všech zmíněných i možných dalších případech však analýza třetím enzymem bezpečně jednotlivé druhy odliší (obr. 2 – obr. 4).

EKONOMICKÉ HODNOCENÍ

Přímé využití DNA sekvenačních metod, poskytujících absolutní výsledky, je pro rutinní druhovou identifikaci limitováno svou finanční náročností. Materiálové náklady jedné sekvenační reakce i s vyhodnocením se pohybují v řádu několika set korun, při analýze v obou směrech dosahují tisíce korun. Dalším limitem je závislost kli-

stomatologie 1 31.1.2006 14:26 Str. 20
proLékaře.cz | 30.10.2026



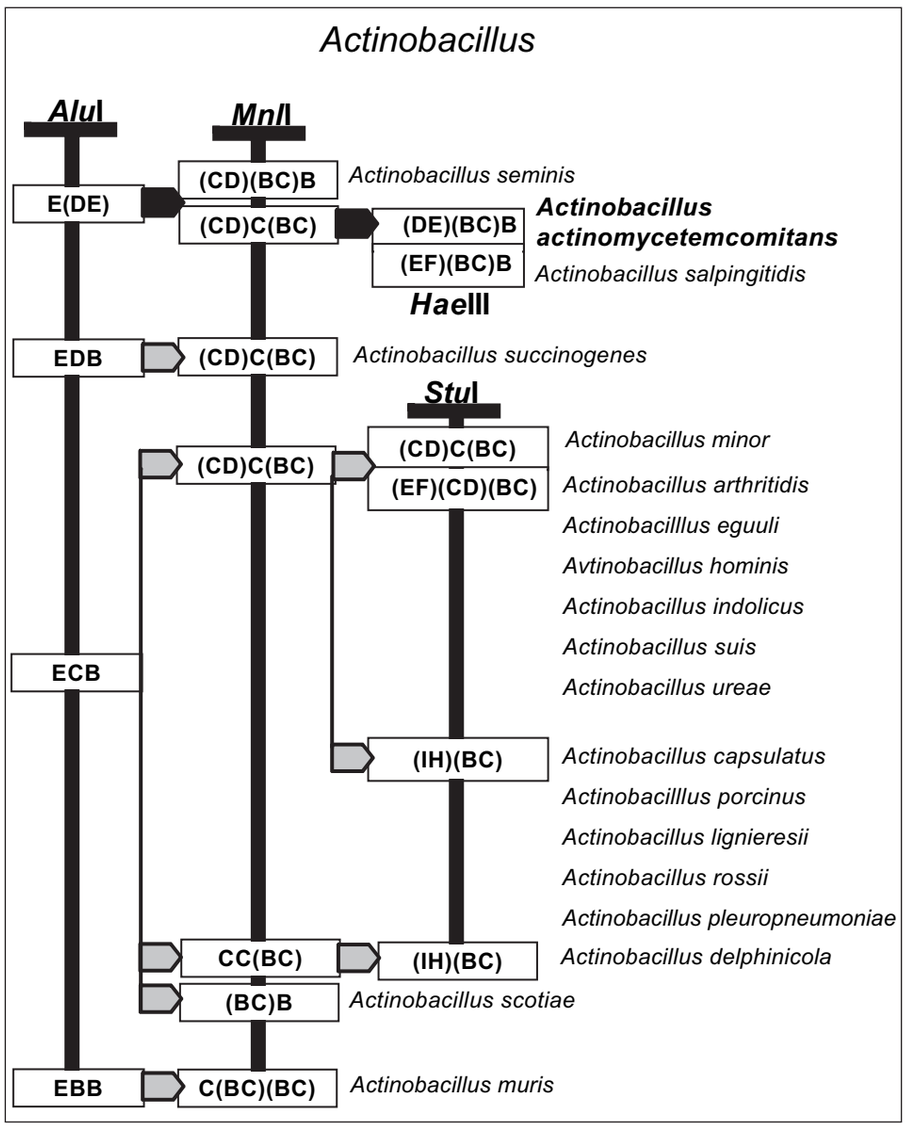
Obr. 3. Schéma algoritmu pro druhovou identifikaci rodů *Porphyromonas* a *Capnocytophaga*.

nické laboratoře na servisním pracovišti. Potřebné přístrojové vybavení nebývá kvůli vysokým pořizovacím nákladům součástí klinických laboratoří. Neznamená to však obecně, že molekulárně genetické metody nemohou svou cenou konkurovat metodám klasickým. Navržený systém je toho příkladem. Nejdražší složkou podobných systémů jsou použité enzymy. Proto byla při výběru vhodných restrikčních enzymů uvažovaná i jejich cena. Pro společný a mnohdy dostatečný úsek analýzy základními enzymy *Alu*I a *Mnl*I (New England Biolabs) jsou celkové náklady na enzymy (5 jednotek na analýzu) nižší než 25 Kč. Cena enzymu v PCR reakci (objem 30 µl; 1 jednotka DyNAzyme II DNA Polymerasy) je cca 10 Kč/reakci. I při započtení ostatního materiálu (plast, nukleotidy, agaróza atd.) lze materiál pro jednu analýzu pořídit zhruba za 50 Kč. I pokud je nutná následná restrikční analýza třetím či čtvrtým enzymem, zůstávají celkové náklady v řádu desítek korun. To je řádově méně než v případě stanovení DNA sekvence. Navíc je cena srovnatelná s náklady biochemických testů, jejichž výsledky navrhovaná metoda bezpochyby zpřesní.

ZÁVĚR

Restrikční analýzou sice nemůže být nikdy dosaženo kvality a přesnosti dosažených DNA sekvenováním, avšak tato metodika může posloužit jako levný a přesto dostatečně citlivý postup při ověřování identity druhů určených jiným způsobem, ať už biochemicky nebo genetickými metodami založenými na specifických sondách.

stomatologie 1 31.1.2006 14:26 Str. 21
proLékaře.cz | 30.9.2026



Obr. 4. Schéma algoritmu pro druhovou identifikaci rodu *Actinobacillus*.

LITERATURA

1. **Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I., Slots, M.:** Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol. Immunol., roč. 11, 1996, 266–273.
2. **Dibart, S., Skobe, Z., Snapp, K. R., Socransky, S. S., Smith, C. M., Kent, R.:** Identification of bacterial species on or in crevicular epithelial cells from healthy and periodontally diseased patients using DNA-DNA hybridization Oral Microbiol. Immunol., roč. 13, 1998, s. 30–35.
3. **Gutell, R. R., Larsen, N., Woese, C. R.:** Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. Microbiol. Rev., roč. 58, 1994, s. 10–26.
4. **Choi, B. K., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Gobel, U. B.:** Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochaetes from a patient with severe destruction periodontitis. Infection and Immunity, 1994, s. 1889–1895.
5. **Kiratisin, P., Li, L., Murray, P. R., Fischer, S. H.:** Identification of bacteria recovered from clinical specimens by 16S rRNA gene sequencing. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., roč. 22, 2003, s. 628–631.
6. **Novotná, G., Janata, J., Dušková, J., Janatová, T.:** Využití restrikční analýzy genu pro 16S rRNA pro ověření druhové identity významných orálních mikroorganismů, I. Viridující streptokoky. Čes. Stomat., 105, 2005, s. 170–174.
7. **Papapanou, P. N.:** Risk assessments in the diagnosis and treatment of periodontal diseases. J. Dent. Educ., roč. 62, 1998, 10, s. 822–839.
8. **Zijnge, V., H. J. Harmsen, Kleinfelder, J. W., Rest, van der M. E., Degener, J. E., Welling, G. W.:** Denaturing gradient gel electrophoresis analysis to study bacterial community structure in pockets of periodontitis patients. Oral Microbiol. Immunol., roč. 18, 2003, 1, s. 59–65.

Práce vznikla za finanční podpory IGA MZ ČR, reg. č. grantového projektu NK 7385-3.

Mgr. Gabriela Novotná
Mikrobiologický ústav AV ČR
Vídeňská 1083
140 00 Praha 4