stomatologie_5_06 26.9.2006 14:11 Str. 127
proLékaře.cz | 19.9.2024

Perspektivy pokročilých molekulárních metod při detekci parodontálních patogenů

Janata J.[1], Hercík K.[1], Novotná G.[1], Branny P.[1], Dušková J.[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

Publikace shrnuje současný stav v diagnostice parodontálních patogenů. Autoři diskutují o hlavních přednostech a úskalích klasických kultivačních metod a nových DNA technik. Z nastupujících metod molekulární diagnostiky představuje podrobněji metodu hybridizace in situ. Vysvětluje její podstatu, různé varianty provedení i možnosti, včetně konkrétních příkladů použití pro detekci parodontálních patogenů.
Klíčová slova: parodontální patogeny – anaeroby – molekulární diagnostika – hybridizace in situ

Janata J., Hercík K., Novotná G., Branny P., Dušková J.:
Perspectives of Advanced Molecular Methods for the Detection of Periodontal Pathogens

Summary: The publication summarizes the present state in the diagnostic of periodontal pathogens. It discusses main advantages and pitfalls in classical cultivation methods and new DNA techniques. In the recent methods of molecular diagnostics the method of hybridization in situ is described in more detail. Its basis, various variant procedures and possibilities are explained including specific examples of the use the detection of periodontal pathogens.
Key words: periodontal pathogens – anaerobic microorganisms – molecular diagnostics – hybridization in situ

Čes. Stomat., roč. 106, 2006, č. 5, s. 127–130.

ÚVOD

Mikroorganismy významné v etiopatogenezi onemocnění parodontu

Onemocnění parodontu, které u dospělé populace patří mezi onemocnění s hromadným výskytem, ve svých důsledcích představuje u osob starších 25 let stejně častý důvod ztráty zubu jako následky zubního kazu.

Úloha plaku – rozhodující formy existence mikrorganismů v ústní dutině – v etiopatogenezi onemocnění parodontu není zcela definována. Zásadní obtíž ve stanovení příčinné souvislosti mezi bakteriálním původcem a vznikem nebo rozvojem onemocnění je jak na straně hostitele, tak i mikroorganismů. Na straně hostitele neexistují znalosti o stavu parodontálního biotopu z hlediska atraktivity pro adherenci (kvantita, resp. kvalita vazebných receptorů na povrchu buněk gingivy), na straně mikroorganismů nebyl dosud popsán jeden druh nebo skupina, které by se vyskytovaly výhradně v lokalitě s patologickými změnami a mohly být označeny za původce onemocnění.

Parodontální mikroorganismy, osídlující zdravý i patologicky změněný parodont, byly a jsou i nadále intenzivně studovány. I přes veliké množství vyizolovaných bakteriálních druhů, a jejich množství se neustále rozšiřuje, lze tyto dosud publikované studie ve vztahu k etiopatogenezi vzniku onemocnění parodontu shrnout takto:

✓ Stávajícími vyšetřovacími možnostmi byly zjištěny nepříliš výrazné změny ve složení mikrobiálního osídlení zdravé a patologicky změněné lokality.

✓ Vysoký počet druhů izolovaných z hlubokých parodontálních chobotů nereflektuje vždy klinický nález.

✓ Stávající znalosti vedly k vytypování skupiny „suspektních parodontálních patogenů" přítomných s větší frekvencí v lokalitách změněných než klinicky zdravých.

Komplexita mikrobiálního ekosystému sliznice

proLékaře.cz | 19.9.2024

ústní dutiny i složitost interakce mikroorganismů s parodontálním biotopem hostitele znemožňuje přímočaře popsat úlohu mikroorganismů v etiopatogenezi onemocnění parodontu. Nebyl dosud popsán jeden druh či skupina vyskytující se výhradně v lokalitě s patologickými změnami, tedy jednoznačný původce onemocnění. Z prostředí gingiválního sulku nebo parodontálního chobotu bylo izolováno u různých jedinců více než 300 druhů mikrooganismů, a dokonce až 40 druhů z jediného místa, přesto jen několik z nich je spojováno s onemocněním parodontu [1]. Většina autorů i závěr Světového workshopu (The American Academy of Periodontology World Workshop) [2] shodně definují trojici parodontálních patogenů, pro kterou existují silné důkazy o jejich roli v etiopatogenezi onemocnění. Jsou jimi *Actinobacillus actinomycetemcomitans Porphyromonas gingivalis* a *Tannerella forsythensis* (dříve *Bacteroides forsythus*). Tyto bakteriální druhy, kromě statisticky významné asociace s destruktivní parodontitidou, sekretují široké spektrum potenciálních virulentních faktorů, které podporují jejich patogenitu [3]. Konkrétně *A. actinomycetemcomitans* produkuje leukotoxin, *P. gingivalis* argininové a lyzinové proteázy (tzv. gingipains), spojované s destrukcí tkání parodontu. *T. forsythensis* sekretuje sialidasu, trypsinu podobné proteázy a BspA protein, umožňující adhezi k fibronektinu a fibrinogenu.

Vývoje onemocnění se velmi pravděpodobně účastní i další mikroorganismy sliznice ústní dutiny, které se však většinou nacházejí běžně i u zdravých osob. Nejčastěji jsou z této skupiny zmiňovány *Prevotella intermedia* a *Prevotella nigrescens, Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eubacterium nodatum*. *Peptostreptococcus micros, Fusobacterium nucleatum* a různé spirochety, např. *Treponema denticola* [4, 5].

Hledání nových možností detekce parodontálních patogenů

Ačkoliv jsou dosud kultivační metody považovány za referenční standard v parodontální mikrobiologii, nemohou být považovány za metodu optimální. Na druhou stranu je třeba říci, že zatím ani žádná z nových DNA metod nesplňuje bezezbytku všechny požadavky. Na rozdíl od kultivační metody nezachycují neobvyklé a nové druhy.

Kultivační metody bývají považovány za nenáročné a levné, avšak rozhodně tomu tak není v tomto případě. Kultivace druhově širokého spektra parodontálních patogenů rozhodně není jednoduchá, neboť jde vesměs o anaerobní mikroorganismy. Vyžaduje proto specializované pracoviště se speciálně vyškoleným personálem, nákladným vybavením a relativně drahým provozem. Přesto záchytnost dosahovaná kultivačními metodami bývá problematická. Hlavní důvod jejího selhávání je právě v samé podstatě metody, v nutnosti kultivace. Do formy viditelné kolonie vyrostou pouze životaschopné buňky, tedy ty, které samy sebe dokáží amplifikovat. Zkušenosti ukazují, že nesprávně provedený odběr vzorků, skladování a transport zcela znemožní následnou kultivační detekci parodontálních patogenů. Metoda tak klade vysoké nároky nejen na specializované diagnostické pracoviště, ale i přímo na pracovníky provádějící odběr, což je neřešitelnou bariérou pro rutinní použitelnost v praxi.

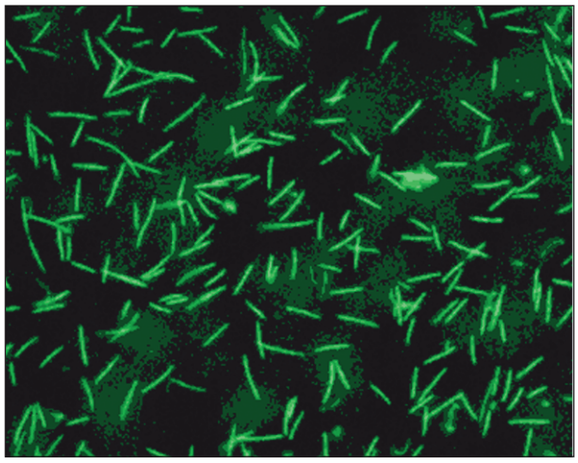
V této souvislosti stojí za zmínku, že výše zmíněného konsenzu o skladbě nejvýznamnějších parodontálních patogenů bylo dosaženo až po nástupu molekulárně genetických metod detekce. Do té doby mezi ně nebyly řazeny některé nejvýznamnější druhy, jejichž přítomnost stanovená DNA technikami nejlépe koreluje s onemocněním. Nejvýznamnějším příkladem takového posunu je *T. forsythensis* [6, 7, 8]. Zcela nekultivovatelná je většina spirochet rodu *Treponema* [9]. Výsledky založené na kultivačních testech tedy značně zkreslují skutečné zastoupení, a tím i význam jednotlivých druhů pro vznik onemocnění.

Z výše uvedeného je zřejmé, že v případě parodontálních patogenů se hledá ideální diagnostická metodika s vynecháním kultivačního kroku. Měla by dokázat zpracovat nejen buňky živé, ale i záznam o buňkách „mrtvých“. To obecně splňují molekulární metody směřované na neživou a chemicky daleko odolnější DNA. Tyto metody musí být vysoce citlivé. Amplifikace buněk musí být nahrazena amplifikací specifické cílové struktury (specifického úseku DNA v případě metod PCR) anebo možností amplifikovat signál. To je případ hybridizačních metod, zejména metody hybridizace *in situ*, která umožňuje druhově či skupinově specificky vizualizovat jednotlivé buňky vytypovaného mikroorganismu (a i několika současně) přímo v odebraných vzorcích tkáně.

Metoda hybridizace *in situ* a použitelnost pro parodontální patogeny

Pro vizualizaci bakteriálních buněk je obecně možné použít nespecifické značení pomocí fluorescenčních barev, které mají nejčastěji afinitu k nukleovým kyselinám. Jako příklady fluorochromů, využitelných k tomuto způsobu značení, lze uvést např. SYTO BC a SYBR Green I. Příklad takto vizualizovaných buněk kultury *Capnocytophaga ochracea* znázorňuje obr 1. Tato metoda je velice efektní, nicméně nedovoluje specifickou detekci a vizualizaci jednoho nebo něko-

stomatologie_5_06 26.9.2006 14:11 Str. 129
proLékaře.cz | 19.9.2024



Obr. 1. Buňky bakterie *Capnocytophaga ochracea* vizualizované ve fluorescenčním mikroskopu, značené nespecificky flourescenční barvou (SYTO BC) s afinitou k DNA. Zvětšení 1250x.

lika vybraných druhů bakterií ve směsných kulturách, infekčním nebo kontaminovaném materiálu.

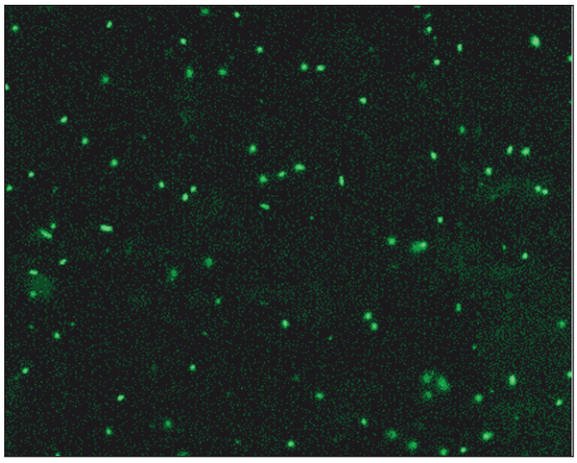
Hybridizace *in situ* je naproti tomu vysoce selektivní technika umožňující detekovat specifické sekvence nukleových kyselin v morfologicky zachované tkáni, tkáňových řezech nebo celých buňkách pomocí značených DNA nebo RNA sond. V klinickém materiálu je tak možné detekovat např. infekční agens, jako jsou bakterie nebo virové nukleové kyseliny. Při použití vícenásobného značení specifických sond umožňuje tato metoda detekovat i několik bakteriálních druhů v jediném kroku. Jsou-li jako cílové struktury pro značenou sondu použity odpovídající markery, je možné detekovat v populaci i jedince nesoucí geny s virulentními faktory nebo geny pro rezistenci k antibiotikům. Příkladem takových vhodných specifických cílových struktur u trojice hlavních parodontálních patogenů jsou jejich potenciální virulentní faktory uvedené v úvodním odstavci článku. Ty byly již využity jinou pokročilou DNA technikou – „Real–time PCR“ [3].

Metodu hybridizace *in situ* poprvé popsali Pardue a Gall [10]. S rozvojem molekulární biologie, imunologie a moderních technologií je dnes dostupná široká škála použitelných značek, způsobů detekce signálu, metod přípravy sond a pracovních postupů, což umožňuje použít *in situ* hybridizaci jako metodu detekce a vizualizace specifických sekvencí nukleových kyselin a amplifikace signálu nejen v laboratořích, ale i pro rutinní diagnostické účely.

Hybridizace *in situ* zahrnuje následující kroky: a) přípravu značené DNA nebo RNA sondy; b) přípravu cílové struktury: tkáně, tkáňového řezu, buněčné suspenze; c) opracování cíle pro usnadnění průniku sondy; d) vlastní hybridizaci sondy s cílovou nukleovou kyselinou; e) oplach, odstranění nenavázané sondy; f) detekci hybridizované sondy v závislosti na typu použité značky. Tato metoda také může být kombinována s PCR, což vede k další amplifikaci signálu a zlepšení senzitivity a možnosti detekce.

Co se týká značení sondy, existují dvě hlavní varianty: radioaktivní značení, detekovatelné autoradiograficky, a neradioaktivní, detekovatelné buď přímo nebo nepřímo imunocytochemicky. Výhodou použití radioaktivních izotopů je možnost následné kvantifikace signálu a vysoká senzitivita. Neradioaktivní značky (hapteny) mají velikou výhodu v bezpečnosti při manipulaci, stabilitě a vysoké rychlosti zpracování signálu. V zásadě existují dva typy hybridizačních metod využívajících neradioaktivně značené sondy: přímá a nepřímá. Přímá metoda je založena na vizualizaci detekovatelné značky - nejčastěji fluorochromu, která je přímo, kovalentně vázána na sondu - ihned po hybridizační reakci. Pokud existují protilátky proti této molekule, je možné konvertovat přímou metodu v metodu nepřímou [11]. Nepřímá metoda vyžaduje sondu s vázanou molekulou, která je následně detekovatelná afinitní cytochemickou reakcí. Velice často se jedná o detekci haptenu specifickou protilátkou konjugovanou s fluorochromem nebo enzymem produkujícím stabilní barevný nebo fluoreskující substrát.

Preparáty hybridizované se sondami značenými přímo fluorochromy mohou být ihned vizualizovány ve fluorescenčním mikroskopu. Fluorochromy nejčastěji využívanými pro *in situ* hybridizaci jsou např.: AMCA (amino-methylcoumarin-acetic acid), fluorescein, rhodamin, Texas Red, Cy3, Cy5 nebo Alexa Fluor dyes. Příklad



Obr. 2. Specifická detekce suspenze buněk *Porphyromonas gingivalis* pomocí DNA sondy značené Alexa Fluor 488, vizualizované ve fluorescenčním mikroskopu. Zvětšení 1250 x.

stomatologie_5_06 26.9.2006 14:11 Str. 130
proLékaře.cz | 19.9.2024

druhově specifické vizualizace buněk *P. gingivalis* znázorňuje obr.2.

Buňky určené pro *in situ* hybridizaci je nutné nejprve fixovat. Fixace vzorku je jedním z nejdůležitějších kroků pro úspěšnou hybridizaci. Umožňuje zachování správné morfologie vzorku, tvarů i velikostí, fixování nukleových kyselin v buňkách a usnadnění průniku sondy. Jako nejefektivnější se ukázaly být zesíťovací činidla, např. paraformaldehyd, formaldehyd nebo glutaraldehyd. Cílový vzorek může být dále opracován: organickými rozpouštědly či detergenty k odstranění lipidických dvojvrstev; proteázami k částečnému rozštěpení buněčných proteinů, a tím k lepšímu rozvolnění a průniku sondy; nukleázami k odstranění nežádoucí DNA nebo RNA. Velice důležité může být zablokování nespecifických vazebných míst pro sondu (např. BSA). Vlastní hybridizační reakce musí probíhat za optimálních reasociačních podmínek – především teploty, koncentrace jednomocných kationtů a pH. Odstranění nenavázané nebo nespecificky navázané sondy po skončení hybridizace je také naprosto esenciální pro získání relevantních výsledků.

Metoda hybridizace *in situ* byla použita při průkazu parodontálních patogenů *A. actinomycetemcomitans* a *P. gingivalis* přímo uvnitř lidských epitelových buněk tvářové sliznice, které těmto choulostivým anaerobům vytvářejí „ochranný plášť“ a umožňují jejich průnik do jinak nepříznivého aerobního prostředí i šíření v něm [12]. Dalším recentním příkladem použití metody je vizualizace, a tedy průkaz výskytu parodontálních patogenů *in situ* v periapikálních ložiscích u endodonticky ošetřených zubů [13].

ZÁVĚR

Studium etiologie a patogeneze onemocnění parodontu s cílem rozšířit současné možnosti prevence a terapie tohoto onemocnění patří k současným prioritám výzkumu v oboru zubní lékařství. Hybridizace *in situ* je jednou z perspektivních metod molekulární diagnostiky s potenciálem pro využití při detekci parodontálních patogenů, a to jak pro účely základního výzkumu, tak pro klinickou diagnostiku s jedinečnou možností prokázat cílové mikroorganismy přímo ve tkáních, s možností kvantifikace a současného sledování několika bakteriálních druhů i skupin.

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

LITERATURA

1. **Moore, W. E., Moore, L. V.:** The bacteria of periodontal diseases. Periodontol, 2000, 5, s. 66-77.
2. **Genco, R. J.:** Current view of risk factors for periodontal diseases. J. Periodontol, 67, 1996, s. 1041-1049.
3. **Morillo, J. M., Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Martin, C., Silva, A.:** Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. J. Clin. Periodontol, 31, 2004, s. 1054-1060.
4. **Papapanou, P. N.:** Risk assessments in the diagnosis and treatment of periodontal diseases. J. Dent. Educ., 62, 1998, 10, s. 822-839.
5. **Sanz, M., Lau, L., Herrera, D., Morillo, J. M., Silva, A.:** Methods of detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. J. Clin. Periodontol, 31, 2004, s. 1034-1047.
6. **Ashimoto, A., Chen, C., Bakker, I., Slots:** Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol. Immunol., 11, 1996, s. 266-273.
7. **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., 13, 1998, s. 30-35.
8. **Sakamoto, M., Suzuki, M., Umeda, M., Ishikawa, L., Benno, Y.:** Reclassification of Bacteroides forsythus (Tanner et al. 1986) as Tannerella forsythensis corrig., gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 2002, s. 841-849.
9. **Choi, B. K., Paster, B. J., Dewhirst, F. E., Gobel, U. B.:** Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destruction periodontitis. Infection and Immunity, 1994, s. 1889-1895.
10. **Pardue, M. L, Gall, J. G.:** Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. Proc Natl Acad Sci USA, 64, 1969, s. 600-6004.
11. **Baumann, J. G., Wiegant, J. Van Duijn, P:** Cytochemical hybridization with fluorochrome-labeled RNA. III. Increased sensitivity by the use of anti-fluorescein antibodies. Histochem., 73, 1981, s. 181-193.
12. **Rudney, J. D., Chen, R., Sedgewick, G. J.:** Intracellular actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in buccal epithelial cells collected from human subjects. Infect. Immun., 69, 2001, s. 2700-2707.
13. **Sunde, P. T., Olsen, I., Gobel, U. B., Theegarten, D., Winter, S., Debelian, G. J., Tronstad, L., Moter, A.:** Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. Microbiology, 149, 2003, s. 1095-1102.

Ing. Jiří Janata, CSc.
Mikrobiologický ústav AV ČR
Vídeňská 1083
140 00 Praha 4