

Zastosowanie testów diagnostyki mikrobiologicznej u pacjentów z chorobą przyzębia

***Agnieszka Osmólska-Bogucka**

Zakład Ortodoncji Instytutu Stomatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik Zakładu: dr n. med. Barbara Siemińska-Piekarczyk

MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTIC TESTS IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH PERIODONTAL DISEASE

Summary

Introduction: Dental plaque plays a major role in the initiation process of periodontal disease. Therefore, research is still ongoing in order to develop more sensitive and specific microbiological tests. Studies of many authors also show that the antibiotic therapy applied based on microbiological test results of periopathogenic microflora, is of significant benefit to patients as it leads to reduction of bacteria, and consequently to improvement of the clinical status of periodontium.

The purpose of this study is to present the microbiological tests on the basis of available literature. Microscopic observation of the colony, bacterial cultures, immunological and enzymatic as well as genetic methods were considered.

Conclusions: All currently available tests based on the analysis of bacteria and their products have advantages and disadvantages. At present there is no perfect test available, but in spite of this the use of a clinical trial in combination with diagnostic tests meant to monitor periopathogens can provide optimal patient care.

Key words: microbiology, periodontitis, sampling

WSTĘP

Początki diagnostyki mikrobiologicznej jamy ustnej sięgają roku 1676, wówczas holenderski sprzedawca materiałów Antoni van Leeuwenhoek używając mikroskopu własnej konstrukcji wykonanego ze szkła do badania jakości tekstyliów opisał bakterie znajdujące się w płytce nazębnej. Odkrycie to dało początek badaniom flory bakteryjnej jamy ustnej, a także doprowadziło do dalszego rozwoju mikrobiologii. Wpłynęło również na rozwój metod badawczych stosowanych w periodontologii. Prace badawcze koncentrujące się wokół udziału bakterii w etiopatogenezie zapaleń przyzębia trwają już ponad 100 lat, natomiast od przeszło 40 lat koncentrują się wokół określonych gatunków bakterii i ich interakcji. Dzięki temu, poza stwierdzeniem infekcji, można prognozować dalszy przebieg choroby oraz oceniać wyniki już podjętego leczenia. Nadal trwają badania nad opracowaniem coraz bardziej czułych i specyficznych testów mikrobiologicznych (1-3).

W dostępnym piśmiennictwie spotyka się rozbieżności dotyczące podziału testów diagnostycznych stosowanych u pacjentów z chorobą przyzębia. Eley (3) wyróżnia 5 grup testów z udziałem następujących biomarkerów:

bakterie i ich produkty, enzymy uwolnione z martwych komórek, składniki immunologicznej odpowiedzi gospodarza oraz produkty resorpcji kości. Wolf (4) podaje zaś 4 grupy testów, opierając je na: bakteriach, ogólnoustrojowej odpowiedzi gospodarza, reakcji metabolizmu tkanki kostnej oraz zmianach klinicznych.

Celem pracy jest przedstawienie testów mikrobiologicznych na podstawie piśmiennictwa.

PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

Szczelina dziąsłowa jest niszą ekologiczną dla kilkuset gatunków mikroorganizmów, lecz według najnowszych badań tylko kilka odgrywa kluczową rolę w zainicjowaniu i progresji choroby przyzębia (1, 3, 4). Do bakterii mających znaczenie w zapaleniach przyzębia, między innymi ze względu na zwiększoną aktywność w miejscach toczącego się procesu chorobowego, zalicza się Gram-ujemne bakterie beztlenowe: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter recta*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*. W etiopatogenezie zapalenia przyzębia znaczącą rolę odgrywa również interakcja

pomiędzy patogennymi antygenami bakteryjnymi, a odpowiedzią immunologiczną organizmu, stąd wzrost zainteresowania poziomem markerów stanu zapalnego – prostaglandyn czy cytokin w płynie szczeliny dziąsłowej. Ze względu na możliwość hodowli w warunkach laboratoryjnych tylko połowy bakterii płytki poddziąsłowej znaczną przewagę w metodach diagnostyki mikrobiologicznej zyskują obecnie testy oparte na analizie materiału genetycznego (1-4). Kluczowym elementem oceny flory periodontologicznej jest właściwe pobranie materiału do badania.

Metody pobierania materiału do badania

Metody badawcze stosowane do analizy płytki bakteryjnej wymagają odpowiedniego pobrania materiału, ponieważ od tej czynności zależą wyniki diagnostyki mikrobiologicznej. W wielu pracach badawczych (4, 5, 22) poruszany jest problem powtarzalności pobierania materiału do diagnostyki. Używane są dwie podstawowe techniki pobierania próbek płytki nazębnej poddziąsłowej. Pierwsza – przy użyciu ezy, druga z zastosowaniem absorpcji na sączkach papierowych (2). W jednym i drugim przypadku należy zachować ścisłą aseptykę (8). Aby nie doszło do zanieczyszczenia lub rozcieńczenia badanego materiału wskazane jest przed pobraniem próbki usunięcie naddziąsłowej płytki bakteryjnej przy użyciu sterylnej gaziki (2, 8, 11). Następnie miejsce należy dokładnie osuszyć bez używania sprężonego powietrza, a po pobraniu próbki zapobiec jej ewentualnemu zetknięciu się z krwią, śliną, wysiękiem ropnym oraz błoną śluzową jamy ustnej, a także mikroflorą innych tkanek i narządów (8). Badania porównawcze skuteczności obu metod wykazują rozbieżności. Według badań Tales i wsp. (22) użycie ezy umożliwia uzyskanie w 95% wiarygodnych i powtarzalnych wyników próbki płytki poddziąsłowej. Badania Baker i wsp. (5) wykazały, iż sączki papierowe nie są w stanie dotrzeć do najgłębiej położonych rejonów, natomiast lepiej się sprawdzają do pobierania materiału klinicznego z okolicy brzegu dziąsłowego. Natomiast według badań Jervøe-Storm i wsp. (26) ezy w porównaniu z sączkami papierowymi pobierają większą ilość płytki, natomiast skład jakościowy bakterii nie różni się znacząco. Natomiast badania Renvert i wsp. (31) podają, iż metoda z użyciem sączków papierowych zawiera wyższe proporcje bakterii periopatogennych w porównaniu z metodą z użyciem ezy. Należy podkreślić fakt, że skład mikroflory kieszonek przyzębnych zależy nie tylko od metody pobrania, ale również od wielu innych czynników, takich jak: stopień zaawansowania choroby i miejsce pobrania próbki (wykazano różnice pomiędzy stroną mezjalną i dystalną tego samego zęba), a nawet, jak pokazały doniesienia Haffajee i wsp., od szerokości geograficznej, w jakiej żyją pacjenci (27). Badania wykazały również, że u jednego pacjenta każda kieszka dziąsłowa ma niepowtarzalny profil mikrobiologiczny, dlatego też próbka płytki z miejsca, gdzie toczy się proces zapalny, nie może świadczyć o florze bakteryjnej całej jamy ustnej (7). Haffajee i wsp. stwierdzili w swoim eksperymencie, analizując 1596 pró-

bek pobieranych różnymi metodami z tego samego miejsca, iż *Actinobacillus actinomycetemcomitans* nie został wykryty w 49% próbek. Analiza wykazała również, że wskazane jest pobieranie do badań więcej niż jednej próbki z kieszeni, aby zminimalizować fałszywie ujemne wyniki (6). W zależności od planowanego testu diagnostycznego próbka jest badana natychmiast lub przeniesiona na specjalne podłoże transportowe i wysyłana do laboratorium. W trakcie transportu na wzrost i przeżycie drobnoustrojów ma wpływ szereg czynników, takich jak: potencjał oksydoredukcyjny, temperatura, ciśnienie osmotyczne, stężenie jonów wodorowych (8). Melado i wsp. (17) porównywali otrzymane wyniki hodowli i wrażliwości na antybiotyki próbek pobranych z tych samych miejsc jamy ustnej, a przesyłanych do dwóch różnych laboratoriów mikrobiologicznych. Dane różniły się pod względem stwierdzonego składu poszczególnych gatunków, a także ich wrażliwości na antybiotyki. Od lat trwają poszukiwania właściwej metody diagnostycznej mikroorganizmów pochodzących z kieszonek przyzębnych. Do testów opartych na mikroorganizmach i ich produktach należą: obserwacja mikroskopowa kolonii, hodowle bakteryjne na podłożach, metody immunologiczne i enzymatyczne, a także genetyczne (3). Obecnie wykorzystywane techniki identyfikacji mikrobiologicznej można także podzielić na metody fenotypowe i genotypowe (10).

Metody fenotypowe

Metody mikroskopowe (mikroskopia w ciemnym polu, fazowo-kontrastowa, preparaty barwione metodą Grama)

Obserwacja bakterii pod mikroskopem była jedną z pierwszych metod uwidaczniających różnice pomiędzy szczeliną dziąsłową a kieszenią patologiczną (25). Jest to metoda wizualna, pozwalająca ocenić skład płytki bakteryjnej na podstawie kształtu i sposobu poruszania się bakterii, a także udziału procentowego bakterii Gram-ujemnych w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Leczenie periodontologiczne powoduje zmianę patogennej flory poddziąsłowej, w której dominują bakterie obdarzone ruchem (krętki i śrubowce) oraz o kształcie pałeczek, na zdominowaną przez ziarenkowce i nieruchliwe (7, 9). W zdrowej szczelinie dziąsłowej przeważają bakterie Gram-dodatnie, natomiast w postaci zaawansowanej choroby przyzębia flora poddziąsłowa jest zdominowana przez bakterie Gram-ujemne (3, 7). Obraz z mikroskopu w ciemnym polu flory kieszeni patologicznej nieaktywnej uwidacznia stosunek bakterii spirochetów do ziarenkowców w proporcji 1:40, natomiast rozkład ten ulega zmianie na 4:1 w aktywnej kieszeni patologicznej (9, 11). Do zalet mikroskopii możemy zaliczyć: możliwość oceny ewolucji płytki w trakcie przebiegu choroby i leczenia, prostotę i szybkość wykonania, możliwość wykonania testu w gabinecie przy pacjencie – dzięki czemu metoda ma nieocenione znaczenie w motywacji i edukacji pacjentów (2, 11). Nie pozwala natomiast na: identyfikację poszczególnych gatunków

bakterii, ocenę rozkładu ilościowego, prognozowanie ponownego wystąpienia choroby, a także stwierdzenie wrażliwości na antybiotyki.

Metody hodowli mikrobiologicznych

Jest to metoda diagnostyczna, która umożliwia analizę określonych gatunków bakterii. Do wzrostu periopatogenów stosowane są sprecyzowane podłoża mikrobiologiczne (proste, wzbogacone, wybiórcze i różnicujące biochemicznie). W kolejnym etapie przy użyciu licznych testów, do których zaliczamy ocenę morfologii kolonii, metodę barwienia Grama, testy biochemiczne oraz chromatografii gazowej końcowych produktów metabolizmu, następuje identyfikacja szczepu (8). Do głównych korzyści tej metody należy zaliczyć możliwość oceny wrażliwości bakterii na antybiotyki (a co ważniejsze ich oporności) oraz wykrywanie rzadkich bakterii. Posiada także zasadnicze wady, takie jak: długi czas oczekiwania na wynik – nawet do 3 tygodni, problemy związane z hodowlą większej ilości gatunków bakterii, brak możliwości wykrywania niewielkiej ilości mikroorganizmów w pobranej próbce – granica wykrywalności na pożywkach selektywnych wynosi 10^2 - 10^3 , intensywny nakład pracy laboratoryjnej. Próbkę wymaga zachowania żywotności bakterii – wiele wrażliwych mikroorganizmów ginie w nowym środowisku – z tego powodu hodowla nie odzwierciedla faktycznego składu pobranej próbki, utrudniając ocenę proporcji poszczególnych bakterii oraz całkowitą ich ilość w pobranym materiale.

Testy oparte na metodach immunologicznych

Testy immunologiczno-enzymatyczne polegają na identyfikacji bakteryjnych antygenów powierzchniowych przy użyciu przeciwciał. Markery są zlokalizowane na strukturach typu rzęski, włoski czy też glikoproteiny. Obecnie dostępnych jest kilka metod immunologicznych: immunofluorescencja pośrednia (ELISA) i bezpośrednia (ELIA), aglutynacja lateksowa (8). Do korzyści tej metody należy zaliczyć: niską granicę wykrywalności bakterii od 10^2 , niskie koszty, możliwość wykonania przy fotelu pacjenta. Do wad zaliczymy możliwość reakcji z martwymi bakteriami oraz brak możliwości wykonania antybiogramu (11).

Testy oparte na analizie enzymatycznej

Testy oparte na analizie enzymatycznej polegają na możliwości wykrywania enzymów produkowanych przez określone gatunki. W przypadku bakterii należących do „kompleksu czerwonego” (Socransky i wsp.): *T. forsythia*, *Treponema denticola* i *Porphyromonas gingivalis* analiza enzymatyczna oparta jest na wykorzystaniu reakcji enzymu podobnego do trypsyny, wytwarzanego przez wyżej wymienione gatunki. Jeżeli na pasku nasączonym bezbarwnym substratem benzoyl-arginilo-naftylaminy (BANA) umieścimy połączenie tych trzech bakterii, nastąpi zmiana zabarwienia paska na intensywny ciemnoniebieski (2, 3). Do plusów reakcji BANA należy zaliczyć możliwość wykonania badania w gabinecie, jego prostotę, szybkość odczytu wyników

(po 5 minutach) oraz niskie koszty. Zalety te mogą się przełożyć na wykorzystanie badania do poprawy współpracy z pacjentem. Minusami natomiast są: brak możliwości oceny proporcji poszczególnych bakterii spośród 3 wyżej wymienionych w próbce płytki nazębnej, próg wykrywalności wynoszący 10^4 (11), a także niewykrywanie obecności innych gatunków bakterii periopatogennych. Należy również pamiętać o tym, iż *Porphyromonas gingivalis* produkuje proporcjonalnie więcej enzymu w porównaniu z *T. forsythia* i *T. denticola* oraz *Capnocytophaga* spp. i niektóre bakterie *Actinomyces* są również BANA-pozytywne (11-13). Test może również, według Cox i Eley, wykazywać aktywność enzymów pochodzących od gospodarza (24).

Metody genotypowe

Do metod genotypowych zaliczamy osiągnięcia biologii molekularnej ostatnich lat, takie jak: hybrydyzację kwasów nukleinowych przy zastosowaniu sond molekularnych oraz metodę polimeryzowanej reakcji łańcuchowej (PCR).

Sondy genetyczne wykorzystywane w diagnostyce mikrobiologicznej

Sondy używane w diagnostyce mikrobiologicznej składają się ze znanej sekwencji kwasu nukleinowego wyznakowanej radioizotopem lub znacznikiem enzymatyczno-kalorymetrycznym. Łączą się z komplementarnym rejonem DNA drobnoustroju i dzięki znacznikowi uwidaczniają się, fluoryzując lub wykazując luminescencję chemiczną. Wyróżniamy kilka rodzajów sond genetycznych: sondy DNA, RNA oraz oligonukleotydowe. Sondy DNA większych rozmiarów zawierają cały genom wykrywanego mikroorganizmu (nazywane również genomowymi), natomiast mniejszych rozmiarów zawierają sklonowane fragmenty kwasu nukleinowego. Stosowanie sond genomowych ze względu na duże rozmiary łączy się z ryzykiem niezyskania swoistości, gdyż mogą zawierać sekwencje wspólne z innymi gatunkami, doprowadzając do reakcji krzyżowej. W 1988 roku Savitt i wsp. (14) opublikowali wyniki badań porównawczych skuteczności wykrywania periopatogenów sondami DNA i metodą hodowli bakteryjnej. Analiza wykazała, iż diagnostyka przy użyciu sond jest co najmniej równoznaczna, a nawet bardziej czuła w zestawieniu z hodowlami bakteryjnymi, a zdecydowanie mniej kosztowna. W celu dokonania analizy przy użyciu sond rozbija się bakterie poprzez dodanie enzymów i detergentów, potem denaturuje się DNA bakteryjny w celu uzyskania pojedynczych nici, a następnie dodawane są wyznakowane sondy genetyczne, które łączą się z komplementarnym odcinkiem docelowym bakteryjnego DNA. Kolejnym etapem jest odczyt przy użyciu fotometru, luminometru, czy miernika promieniowania gamma.

Zalety testów sondujących DNA/RNA: metoda umożliwia ocenę jakościową, jak również ilościową drobnoustrojów w próbce, nie wymaga skomplikowanych metod hodowlanych, próbki mogą być przesyłane do oddalonych laboratoriów i nie wymagają zachowania

żywności drobnoustrojów, granica wykrywalności wynosi 10^2 . Testy oparte na sondach genetycznych pozwalają w sposób szybki ocenić typ kieszonki (od 1-5) i w zależności od tego dobrać najbardziej skuteczną terapię. W przypadku typów 1-3 zalecane jest podjęcie leczenia podstawowego, w typie 4 i 5 wymagane jest leczenie z zastosowaniem antybiotykoterapii. Natomiast do wad należy zaliczyć trudny dostęp do specyficznych gatunkowo sond oraz wysoki koszt w przypadku użycia w warunkach praktyki klinicznej (23).

Metoda PCR

Pozwala na szybkie powielenie w procesie replikacji wybranych odcinków DNA lub RNA w postaci kopii i dzięki temu wykrycie w krótkim czasie określonych mikroorganizmów. Metodę cechuje wysoka czułość, teoretycznie z jednego fragmentu DNA można uzyskać 10^6 kopii. Proces polimeryzacji rozpoczyna się od rozdzielania DNA na pojedyncze nici, potem następuje przyłączenie startera, następnie polimeraza Taq przyłącza nukleotydy do starterów. Uzupełnieniem metody PCR jest technika Real-Time PCR, pozwalająca na ocenę ilości kopii w badanych próbkach. W celu oceny ilości DNA w czasie rzeczywistym jego amplifikacji stosowane są techniki fluorescencyjne. Metoda ta jest bardzo czuła i pozwala na wykrycie już na początku reakcji pojedynczych fragmentów DNA (8, 10).

Metoda PCR pomimo wielu zalet, takich jak: duża czułość i specyficzność, krótki czas oczekiwania na wynik w porównaniu z hodowlami bakteryjnymi, zautomatyzowanie procedur laboratoryjnych, nieduży nakład pracy, ma również swoje wady. Należy do nich przede wszystkim możliwość otrzymania wyników fałszywie dodatnich w wyniku wykrycia martwych i zneutralizowanych w mechanizmie fagocytozy bakterii, co może utrudniać odróżnienie czynnego procesu zapalnego od nieaktywnego (28).

Technika PCR w połączeniu z sondami molekularnymi jest obecnie jedną z najbardziej czułych i swoistych metod wykorzystywanych w diagnostyce mikrobiologicznej, zrewolucjonizowała obecną medycynę, w piśmiennictwie spotkać można również badania z zakresu diagnostyki zakażeń krwi czy zakażeń szpitalnych.

Przykłady testów opartych na wykrywaniu bakterii i ich produktów dostępnych w warunkach gabinetu (tzw. „chair-site” tests):

- Micro-IDent® i micro-IDent®plus – dają możliwość zdiagnozowania ilościowego i jakościowego 5-9 bakterii periopatogennych oraz ich przynależności do poszczególnych kompleksów bakteriologicznych przy użyciu techniki PCR i sond molekularnych. Do tego typu testów zaliczamy również: PerioBac Test, DMDx-PathoTek, IAI PadoTest 4.5,
- Evalusite test immunoenzymatyczny – ELISA – umożliwiający wykrycie w płytce poddziąsłowej antygenów powiązanych z *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*,
- Omnigene – test inżynierii genetycznej, wykorzystujący specjalnie opracowane sondy DNA dla

ośmiu periopatogenów: *Porphyromonasgingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacteractinomycetemcomitans*, *Fusobacteriumnucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacterrectus*, *Tannerellaforssythia* i *Treponemadenticola*,

- PerioScan, Oral-B Laboratories, DentoCheck, PerioCheck – wykorzystują reakcje BANA w celu wykrycia na zasadzie kolorymetrii produktów enzymatycznych bakterii,
- DiamondProbe/Perio 2000 System – składa się z końcówki w postaci sondy jednorazowego użytku, która przesyła informacje do urządzenia pomiarowego o stężeniu związków siarki wytwarzanych przez bakterie beztlenowe Gram-ujemne,
- Perio-Analysetest, PET TEST – pozwala na identyfikację 9 periopatogenów przy użyciu reakcji PCR Real-Time.

PODSUMOWANIE

Biorąc pod uwagę dane epidemiologiczne, które wykazały, że zapalenie dziąseł lub przyzębia stwierdzane jest u 93,7% osób w wieku 35-45 lat (15), a u 3-13% populacji może rozwinąć się ciężkie przewlekłe zapalenie przyzębia (16), niezwykle istotne są badania nad dalszym rozwojem i udoskonalaniem metod diagnostyki mikrobiologicznej. Ilość stosowanych metod, jak też analiza ich zalet i wad, prowadzą do wniosku, że na dzień dzisiejszy nie istnieje metoda idealna. Obecnie w dostępnym piśmiennictwie rzadko spotykane są prace badawcze oceniające użyteczność metod diagnostyki mikrobiologicznej w celu planowania, leczenia i kontrolowania chorób przyzębia, a także porównujące skuteczność metod między sobą.

Do czynników ograniczających wartość badań z wykorzystaniem testów, których biomarkerem są bakterie oraz ich produkty, możemy zaliczyć: różnice w składzie flory bakteryjnej kieszeni dziąsłowych u jednego pacjenta, problemy z transportem i hodowlą bakterii – mniej niż 50% bakterii z próbek płytki poddziąsłowej może być wyhodowana w warunkach laboratoryjnych (3, 4, 18), różnice w odpowiedzi organizmów na czynnik patogeny, problemy z właściwym pobraniem próbek oraz z transportem do laboratorium.

Badania przeprowadzone przez wielu autorów (21, 29, 30) pokazują, że antybiotykoterapia, zastosowana na podstawie wyników badań pochodzących z testów mikrobiologicznych przynosi znaczne korzyści pacjentom w postaci redukcji bakterii periopatogennych, a także poprawy stanu klinicznego przyzębia. Stosowanie badania klinicznego w połączeniu z testami diagnostycznymi do monitorowania periopatogenów może zapewnić optymalną opiekę nad pacjentem. Uzyskane wyniki ułatwiają dobranie właściwej terapii indywidualnie dla danego przypadku – „personalizacja leczenia” – włączając do terapii podstawowej leczenie z użyciem antybiotykoterapii miejscowej lub ogólnej. Takie postępowanie zwiększa szansę na większy efekt leczniczy.

Poza nieoszacowaną użytecznością w podejmowaniu decyzji leczniczych testy mikrobiologiczne pomagają

ją także w ustaleniu grupy pacjentów, u których istnieje ryzyko wystąpienia choroby przyzębia przed pojawieniem się objawów klinicznych.

Najnowsze testy diagnostyczne pozwalają znaleźć miejsca najbardziej predysponowane do rozwoju choroby oraz oszacować skład kieszeni periodontologicznej (wg typów kieszeni 1-5 Cluster/Socransky oraz rodzaju kompleksu) (18-20). □

Piśmiennictwo

1. Socransky SS, Haffajee AD: The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63: 322-331.
2. Loomer PM: Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2004; 34: 49-56.
3. Eley BM, Soory M, Manson JD: *Periodontologia*. Elsevier Urban&Partner, Wrocław 2011.
4. Socransky SS, Haffajee AD: Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 2002; 28: 12-55.
5. Baker PJ, Butler R, Wiksejo UM: Bacterial sampling by absorbent paper points. An in vitro study. *J Periodontol* 1991; 62: 142-146.
6. Haffajee AD, Socransky SS: Effect of sampling strategy on the false-negative rate for detection of selected subgingival species. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 57-59.
7. Wierzbicka M (red.): *Periodontologia Kliniczna. Część 1*, Sanmedia, Med. Tour Press International, Warszawa 1992.
8. Łuczak M, Swoboda-Kopeć E: *Wybrane zagadnienia z mikrobiologii jamy ustnej*. Czelej, Lublin 2004.
9. Wolf FW, Rateitschak EM, Rateitschak KH: *Periodontologia*. Czelej, Lublin 2006.
10. Krawczyk B: Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Post Mikrobiol* 2007; 46, 4: 367-378.
11. Müller H, Klaus H, Rateitschak EM: *Periodontologia*. Czelej, Lublin 2004.
12. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J et al.: Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponemadenticola* and *Bacteroidesforisynthus*. *J of Clinic Microbiology* 1992; 30(2): 427-33.
13. Loesche WJ, Giordano J, Hujjel PP: The utility of the BANA test for monitoring anaerobic infections due to spirochetes (*Treponemadenticola*) in periodontal disease. *J Dent Res* 1990; 69: 1696-1702.
14. Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro KK et al.: Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroidesgingivalis*, and *Bacteroidesintermedius* in subgingival plaque samples. *J Periodontol* 1988; 59(7): 431-8.
15. Jańczuk Z, Ciągło A: *Podstawy epidemiologii*

chorób narządu żucia. Centrum Edukacji Medycznej, Warszawa 1999.

16. Conrads G: DNA probes and primers in dental practice. *Clin Infect Dis* 2002; 35(Suppl 1): 72-7.
17. Mellado JR, Freedman AL, Salkin LM et al.: The clinical relevance of microbiologic testing: A comparative analysis of microbiologic samples secured from the same sites and cultured in two independent laboratories. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21: 233-239.
18. Choi D, Cha B, Jost-Brinkmann P, Lee S: Microbiologic Changes in Subgingival Plaque After Removal of Fixed Orthodontic Appliances. *Angle Orthod* 2009; 79, 6: 1149-1155.
19. Wade WG: Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *J Clin Periodontol* 2011; 38 (Suppl 11): 7-16.
20. Listgarten MA: Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. *J Periodontol* 1992; 63(4 Suppl): 332-7.
21. Rosenberg ES, Torosian JP, Hammond BF et al.: Routine anaerobic bacterial culture and systemic antibiotic usage in the treatment of adult periodontitis: a 6-years longitudinal study. *Int J Periodont Restor Dent* 1993; 13: 213-243.
22. Teles FR, Haffajee AD, Socransky SS: The reproducibility of curet sampling of subgingival biofilm. *J Periodontol* 2008; 79, 4: 705-713.
23. Teles F, Teles R, Siegelin Y et al.: RNA-oligonucleotide quantification technique (ROQT) for the enumeration of uncultivated bacterial species in subgingival biofilms. *Molecular Oral Microbiology* 2011; 26: 127-139.
24. Cox SW, Eley BM: Tryptase-like activity in crevicular fluid from gingivitis and periodontitis patients. *J Periodontal Res* 1989; 24: 41-44.
25. Listgarten MA: Direct microscopy of periodontal pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 1986; 1: 31-36.
26. Jervøe-Storm P, AlAhdab H, Koltzsch M et al.: Quantification of periodontal pathogens by paper point sampling from the coronal and apical aspect of periodontal lesions by real-time PCR. *J Periodontol* 2007; 78, 5: 909-917.
27. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H: Subgingivalmicrobiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 996-1002.
28. Budzyńska A, Kaczmarek A, Gospodarek E: Diagnostyka molekularna bakteryjnych zakażeń krwi. *Post Nauk Med* 2008; 12: 828-833.
29. Renvert S, Dahlen G, Wikstrom M: Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. Relation between microbiological and clinical parameters during 5 years. *J Periodontol* 1996; 67: 562-571.
30. Worch KP, Listgarten MA, Korostoff JM: A multidisciplinary approach to the diagnosis and treatment of early-onset periodontitis: a case report. *J Periodontol* 2001; 72: 96-106.
31. Renvert S, Wikstrom M, Helmersson M et al.: Comparative study of subgingival microbiological sampling techniques. *J Periodontol* 1992; 63: 797-801.

nadesłano: 06.03.2012

zaakceptowano do druku: 10.04.2012

Adres do korespondencji:

*Agnieszka Osmólska-Bogucka

Zakład Ortodoncji IS WUM

ul. Nowogrodzka 59, 02-005 Warszawa

tel.: +48 (22) 502 14 18

e-mail: agabog@mp.pl