

Received: 2015.07.30
Accepted: 2016.03.21
Published: 2017.01.28

DOI: 10.5604/17322693.1229820

Diagnostyka molekularna zapalenia przyzębia

Molecular diagnostics of periodontitis

Izabela Korona-Głowniak¹, Radosław Siwiec¹, Marcin Berger², Anna Malm¹,
Jolanta Szymańska³

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

²Zakład Zaburzeń Czynnościowych Narządu Żucia, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

³Katedra i Zakład Stomatologii Wieku Rozwojowego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Polska

Streszczenie

Drobnoustroje wchodzące w skład płytki nazębnej są główną przyczyną zapalenia przyzębia. Poznanie ich oraz zrozumienie złożonych zależności i oddziaływań między nimi, czynnikami środowiskowymi i stanem zdrowia gospodarza pozwalają na usprawnienie diagnostyki i terapii celowanej u pacjentów chorych na zapalenie przyzębia. W tym celu coraz szerzej stosuje się techniki diagnostyki molekularnej, zarówno oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy, jak i na analizie kwasów nukleinowych przez hybrydyzację. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa omówiono następujące metody: łańcuchową reakcję polimerazy (PCR), łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR), sekwencjonowanie genu kodującego 16S rRNA, hybrydyzacje typu „checkerboard” i „reverse-capture checkerboard”, mikromacierze, elektroforezę w gradencie czynnika denaturującego (DGGE) i w gradencie temperatury (TGGE) oraz polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (TRFLP), a także sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). Zwrócono uwagę na zalety i wady każdej z nich przy badaniu periopatogenów. Wymienione wyżej techniki diagnostyki molekularnej pozwalają na szybkie wykrycie nawet niewielkich ilości patogenu obecnego w materiale diagnostycznym i okazują się szczególnie użyteczne do wykrywania mikroorganizmów, których hodowla w laboratorium jest trudna lub niemożliwa.

Słowa kluczowe:

zapalenie przyzębia • płytka nazębna • techniki molekularne • diagnostyka

Summary

The microorganisms that form dental plaque are the main cause of periodontitis. Their identification and the understanding of the complex relationships and interactions that involve these microorganisms, environmental factors and the host's health status enable improvement in diagnostics and targeted therapy in patients with periodontitis. To this end, molecular diagnostics techniques (both techniques based on the polymerase chain reaction and those involving nucleic acid analysis via hybridization) come increasingly into use. On the basis of a literature review, the following methods are presented: polymerase chain reaction (PCR), real-time polymerase chain reaction (real-time PCR), 16S rRNA-encoding gene sequencing, checkerboard and reverse-capture checkerboard hybridization, microarrays, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), temperature gradient gel electrophoresis (TGGE), as well as terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP) and next generation sequencing (NGS). The advantages and drawbacks of each method in the examination of periopathogens are indicated. The techniques listed above allow fast detection of even small quantities of pathogen present in diagnostic material and prove particularly useful to detect microorganisms that are difficult or impossible to grow in a laboratory.

Key words:

periodontitis • dental plaque • molecular methods • diagnostics

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1229820>

Word count: 4256

Tables: –

Figures: –

References: 81

Adres autorki: prof. dr hab. n. med. Jolanta Szymańska, Katedra i Zakład Stomatologii Wieku Rozwojowego Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Karmelicka 7, 20-018 Lublin;
e-mail: szymanska.polska@gmail.com

WPROWADZENIE

Zapalenie przyzębia (łac. *periodontitis*) jest powszechnie występującym schorzeniem, dotyczącym do 90% światowej populacji. W odróżnieniu od łagodniejszej postaci – zapalenia dziąseł (łac. *gingivitis*), jest nieodwracalne. Schorzenie to prowadzi do niszczenia tkanki łącznej przyzębia oraz kości wyrostka zębodołowego. Jest jedną z głównych przyczyn utraty zębów wśród dorosłych [54]. Zapalenie przyzębia, poza zmianami w jamie ustnej, może wywoływać również inne negatywne skutki zdrowotne, m.in. zakażenia odogniskowe [33]. Rozważany jest jego związek z cukrzycą typu 2, chorobami układu krwionośnego, bólem przewlekłym oraz niektórymi nowotworami [3,8,32,50].

Etiologia zapalenia przyzębia jest wieloczynnikowa, przy czym główną rolę odgrywają mikroorganizmy występujące w jamie ustnej. Wpływ bakterii na występowanie zapalenia przyzębia dostrzeżono stosunkowo późno, gdy w 1956 r. opublikowano wyniki badań nad wpływem penicyliny na *periodontitis* [26]. W odróżnieniu od większości zapaleń wywołanych infekcją, zapalenie przyzębia nie jest spowodowane przez jedną swoistą bakterię, lecz przez grupą drobnoustrojów [6]. Za powstawanie zapaleń przyzębia odpowiadają przede wszystkim bakterie płytki nazębnej.

Płytkę nazębną określa się mianem biofilmu, gdyż ma właściwości podobne do innych biofilmów spotykanych w przyrodzie. Ocenianie płytki nazębnej w kategoriach biofilmu jest niezbędne do zrozumienia zachodzących w niej zjawisk. Między bakteriami występującymi w płytce nazębnej zachodzą niezwykle złożone oddziaływania. Większość z nich można określić mianem synergistycznych, występują jednak również zjawiska antagonistyczne. Bakterie zawarte w biofilmie są zdolne do komunikowania się między sobą za pomocą sygnałów wysyłanych za pośrednictwem wytwarzanych substancji chemicznych (quorum sensing) [26].

Teorie na temat mechanizmu niekorzystnego wpływu płytki nazębnej na stan zdrowia jamy ustnej zmieniały się na przestrzeni lat. Pod koniec XIX w. zrodziła się tzw. hipoteza płytki nieswoistej, oparta głównie na bada-

niach Millera i Blacka. Hipoteza ta zakłada, iż płytka nazębna oddziałuje na gospodarza w sposób nieswoisty jako biomasa i liczba zawartych w niej bakterii, czyli wielkość płytki, i to wszystko decyduje o jej patogenności [58]. W 1998 r. Socransky i wsp. opisali kompleksy bakterii związanych z chorobami przyzębia [66]. Powiązali parametry kliniczne zapalenia przyzębia, takie jak krwawienie podczas zgłębnikowania oraz głębokość kieszonki przyzębnej z mikroorganizmami poddziąsłowymi. Zaproponowali koncepcję kompleksów bakteryjnych, które były związane z nasileniem choroby przyzębia i wyróżnili ich pięć oznaczonych kolorami – żółtym, czerwonym, zielonym, pomarańczowym i fioletowym. Najbardziej patogenny w zapaleniu przyzębia jest kompleks czerwony, składający się z *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* i *Treponema denticola*. Kompleks fioletowy z *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* jest związany z występowaniem agresywnych postaci zapalenia przyzębia, takich jak umiejscowione młodzieńcze zapalenie przyzębia (localized juvenile periodontitis) oraz z opornym na leczenie zapaleniem przyzębia (refractory periodontitis). Pozostałe kompleksy odznaczają się niskim bądź umiarkowanym ryzykiem rozwoju zapalenia przyzębia [66]. Koncepcja kompleksów Socransky'ego oparta była na teorii płytki specyficznej i zakładała, iż jedynie niewielka liczba konkretnych drobnoustrojów odpowiada za powstawanie chorób. Według niektórych autorów teoria ta była zbyt uproszczona. Philip Marsh w 1994 r. zaproponował tzw. hipotezę płytki ekologicznej. Zasugerował, iż choroba jest wynikiem zaburzenia równowagi w mikroflorze bakteryjnej w związku ze stresem ekologicznym, zwiększającym występowanie patogenów czy też mikroorganizmów związanych z chorobami (skład płytki nazębnej jest przede wszystkim uzależniony od czynników środowiskowych – ekologicznych). Zmiany składu bakteryjnego płytki są według Marsha związane z czynnikami ekologicznymi, takimi jak obecność określonych substancji odżywczych oraz niezbędnych kofaktorów, pH i potencjały oksydacyjno-redukcyjne [40]. Hajishengallis i wsp. zaproponowali hipotezę podstawowych patogenów (keystone pathogen hypothesis), według której określone, nieliczne patogeny mogą przez zmianę składu ilościowego i jakościowego mikrobiomu jamy ustnej doprowadzać do dysbiozy i przewlekłego stanu przyzębia; jednym z nich jest *P. gingivalis* [24].

Obecnie obserwuje się zmianę poglądów na temat roli bakterii w powstawaniu chorób przyzębia: następuje stopniowe odchodzenie od analizy wpływu konkretnych patogenów na rzecz analizy całych mikrobiomów. Zmieniające się koncepcje związane z rolą bakterii w powstaniu zapaleń przyzębia wymagają nowych metod diagnostyki mikrobiologicznej, pozwalających wykrywać coraz bardziej złożone zależności między drobnoustrojami, czynnikami środowiskowymi a stanem zdrowia gospodarza. Zazwyczaj przedmiotem badań tradycyjnej mikrobiologii jest pojedyncza komórka bakteryjna. W przypadku biofilmów, takich jak płytka nazębna, badania są prowadzone w odniesieniu do tej struktury jako do „całego organizmu”, gdzie każda bakteria jest zależna od obecności innych gatunków [1]. Poznanie etiologii schorzeń wywoływanych przez te struktury wymaga identyfikacji tworzących je mikroorganizmów [72]. Niemożliwe jest wyhodowanie w warunkach laboratoryjnych większości (ponad 99%) gatunków bakterii występujących w jamie ustnej, ponieważ nie ma możliwości odtworzenia delikatnych zależności troficznych panujących w ich naturalnym środowisku. Dlatego też większość gatunków zasiedlających jamę ustną nie jest wykrywalna za pomocą standardowych testów mikrobiologicznych [69,72]. W celu dokładnego zdiagnozowania czynników etiologicznych wywołujących różne schorzenia jamy ustnej stosuje się techniki diagnostyki molekularnej.

Różnorodność gatunkowa mikroorganizmów tworzących biofilm była przyczyną intensywnych prac nad rozwojem technik ich identyfikacji. Badania zaowocowały opracowaniem wielu metod diagnostyki molekularnej, które można podzielić na metody analizy kwasów nukleinowych przez hybrydyzację oraz w oparciu o łańcuchową reakcję polimerazy.

ŁAŃCUCHOWA REAKCJA POLIMERAZY – PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (polymerase chain reaction) została opracowana przez Kary'ego Mullisa w 1983 r. Dziesięć lat później otrzymał on za opracowanie tej techniki Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii [2,44]. Metoda odzwierciedla naturalny proces replikacji materiału genetycznego i umożliwia w warunkach laboratoryjnych, w trakcie pojedynczego, kilkugodzinnego procesu enzymatycznego, powielenie (amplifikację) ściśle określonych odcinków DNA 10^6 - 10^9 razy w stosunku do ich wyjściowej liczby kopii [2]. Amplifikowane fragmenty łańcucha kwasu deoksyrybonukleinowego mogą mieć długość od kilkudziesięciu do kilkunastu tysięcy par zasad [2]. Do przeprowadzenia reakcji PCR potrzebne jest matrycowe DNA, oligonukleotydy (starter lub primer) o znanej sekwencji, które zainicjują elongację w pożądanym miejscu nici DNA, trójfosforany deoksynukleotydów (dNTP) – substraty niezbędne do syntezy komplementarnej nici oraz enzym katalizujący elongację łańcucha DNA – polimerazę DNA, zawieszony w buforze reakcyjnym o odpowiednim pH z dodatkiem kofaktora – dwuwartościowych kationów magnezu (Mg^{2+}). Najpopularniej-

szymi enzymami wykorzystywanymi w reakcjach PCR są polimeraza *Taq* (wyizolowana z *Thermus aquaticus*) oraz polimeraza *Pfu* (wyizolowana z *Pyrococcus furiosus*) [75]. Obydwa enzymy różnią się nieznacznie, ale mają dwie zdolności, które czynią je użytecznymi w reakcjach PCR. Syntetyzują nowe nici DNA na podstawie matrycowego DNA z udziałem starterów oraz są niewrażliwe na wysokie temperatury. Standardowa reakcja PCR składa się z cyklicznie powtarzanych 3 etapów:

- denaturacji dwuniciowej matrycy DNA – w temperaturze 90-95°C;
- hybrydyzacji starterów do jednoniciowej matrycy DNA (annealing) – w temperaturze 40-65°C i
- syntezy nici komplementarnej (elongation) – w temperaturze około 72°C.

Po 30 cyklach ilość powielanego materiału wzrasta około milion razy [2]. Reakcje PCR przeprowadza się w termocyklerze. Jest to urządzenie spełniające rolę bloku grzejącego, w którym elektronicznie zmieniane są (szybko i precyzyjnie) temperatury właściwe dla poszczególnych etapów reakcji PCR [3].

Podczas przeprowadzania reakcji PCR można wyróżnić cztery fazy. W czasie fazy wstępnej startery łączą się z regionami komplementarnymi w obrębie matrycy. W tym czasie reakcja jest mało efektywna, ponieważ skanowanie matrycy przez startery w celu znalezienia komplementarnych sekwencji jest czasochłonne. Długość fazy zależy od stężenia matrycowego DNA w mieszaninie reakcyjnej. Wraz ze wzrostem liczby kopii powielanych sekwencji reakcja wchodzi w fazę wykładniczą. W ciągu tej fazy następuje wykładniczy przyrost ilości produktu. Jako kolejna następuje faza liniowa, podczas której wydajność reakcji zaczyna maleć. Czwarta faza nazywana jest stacjonarną (lub plateau), podczas niej następuje dalsze spowolnienie tempa reakcji, aż do jej zahamowania [70]. Obecność produktu reakcji PCR sprawdza się, przeprowadzając rozdział elektroforetyczny w żelu poliakrylamidowym lub agarozowym z dodatkiem barwnika – bromku etydy (EtBr). Już w 1966 r. opisano jego zdolność do fluorescencji po połączeniu się z kwasami nukleinowymi [36]. Żel po elektroforezie poddaje się obserwacji w świetle ultrafioletowym, które uwidacznia DNA połączone z barwnikiem fluorescencyjnym. Produkty reakcji PCR są widoczne w żelu w postaci prążków. W celu określenia wielkości produktu, tj. długości ampikonów stosuje się markery – mieszaninę fragmentów DNA o znanych długościach. Zaletą diagnostyki metodą PCR jest to, iż materiał wyjściowy do analizy PCR może zawierać DNA w małym stężeniu lub w znacznym stopniu zdegradowany. Amplifikacji podlega swoista, wybrana do badań sekwencja, która może posłużyć do analizy lub dalszych manipulacji genetycznych [37].

Standardowy proces PCR stosowany w diagnostyce infekcji jamy ustnej jest metodą jakościową. Pozwala na

określenie obecności danego patogenu, ale nie jest możliwe określenie jego ilości. Przykładem jest diagnostyka bakterii *Streptococcus mutans* przez amplifikację swobodnego fragmentu genu *spaP*, który koduje wytwarzanie powierzchniowego antygeny I/II [46].

Jest to najczęściej stosowana metoda mikrobiologii molekularnej z używanych w diagnostyce chorób przyzębia – przez lata uważana za złoty standard [14,57]. PCR umożliwia wykrywanie pojedynczych bakterii związanych z występowaniem chorób przyzębia, takich jak *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, czy *T. denticola*. Jej główną przewagą w stosunku do metod konwencjonalnych jest możliwość wykrycia mikroorganizmów niedających się hodować w warunkach laboratoryjnych [9]. W przypadku diagnostyki zapaleń przyzębia jest to niezmiernie istotna cecha, gdyż wiele spośród wywołujących je drobnoustrojów jest trudnych do hodowli lub ich hodowla jest w ogóle niemożliwa. Technika znalazła również zastosowanie w wykrywaniu wirusów mogących mieć związek z chorobami przyzębia [38]. Ponadto PCR umożliwia wykrycie mikroorganizmów, które znajdują się w badanej próbce w liczbie niewystarczającej do wykrycia z wykorzystaniem hodowli oraz stwarza znacząco mniej problemów związanych z transportem materiału do laboratorium [9,68].

REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY W CZASIE RZECZYWISTYM

Rewolucyjną odmianą standardowej łańcuchowej reakcji polimerazy jest real-time PCR. Technika znajduje zastosowanie w precyzyjnym rozpoznawaniu i określeniu kopii swoistych sekwencji nukleotydowych w próbkach z bardzo małą ilością materiału genetycznego [75]. Umożliwia określenie, które z gatunków bakterii tworzących biofilm jamy ustnej są dominujące, co umożliwia zastosowanie efektywnej terapii celowanej przeciwko wykrytym mikroorganizmom. Metoda real-time PCR polega na amplifikacji określonego odcinka DNA oznaczonego barwnikiem fluorescencyjnym, co umożliwia ciągłe kontrolowanie ilości namnażanego produktu przez badanie zmian natężenia emitowanego światła. Na początku lat dziewięćdziesiątych XX w. jako barwnika do real-time PCR używano bromku etydyny. Obecnie najpopularniejszą sondą fluorescencyjną wykorzystywaną w doświadczeniach przeprowadzanych z wykorzystaniem omawianej techniki jest SYBR Green I. Barwnik przyłącza się do bruzdy mniejszej w podwójnej nici DNA (dsDNA – double stranded DNA), emitując przy tym 1000 razy większą fluorescencję niż gdy pozostaje w postaci niezwiązanej w roztworze [78]. Na tej zależności opiera się mechanizm działania i większość zalet real-time PCR. Zwiększająca się ilość dsDNA oznacza więcej związanego barwnika, co powoduje wzrost natężenia fluorescencji pochodzącej od SYBR Green I. Dzięki kamerom umieszczonym w termocyklerze można śledzić zmiany natężenia i mierzyć ilość powstałego produktu amplifikacji. Możliwe jest również określenie początkowej ilości materiału matrycowego danej reakcji przez odczytanie liczby cykli potrzebnych do przekroczenia zdefiniowanej

wartości progowej (F_t – fluorescence threshold) przez odpowiednio wysokie natężenie sygnału fluorescencyjnego [75]. F_t w reakcji real-time PCR to umowna wartość natężenia fluorescencji, która wskazuje początek fazy logarytmicznego przyrostu ilości produktu. Cykl progowy (C_t , threshold cycle) to numer cyklu reakcji, w którym ilość namnożonego produktu przekracza próg. Im wcześniej to następuje, tym większa była początkowa ilość matrycowego DNA. W celu określenia początkowej liczby kopii DNA w badanej próbce sporządza się serię rozcieńczeń roztworu o znanym stężeniu i liczbie kopii DNA, przeprowadza się reakcje real-time PCR i na podstawie otrzymanych wyników C_t wyznacza się krzywą standardową. Wartość C_t próby badanej porównuje się z krzywą wzorcową i oszacowuje początkową liczbę cząsteczek DNA. Końcowy produkt można poddać ogrzewaniu w coraz wyższej temperaturze i określić jego „punkt topnienia”, czyli temperaturę, w której dsDNA ulega denaturacji i powstają dwie komplementarne pojedyncze nici DNA (ssDNA, single stranded). Temperatura zależy od długości nici oraz od składu nukleotydowego [75].

Real-time PCR znajduje zastosowanie w ocenie jakościowej oraz ilościowej periopatogenów płytki nazębnej [21,59]. Określenie liczby poszczególnych drobnoustrojów pozwala lepiej zobrazować ekosystem jamy ustnej i uwidocznienie dominację konkretnych bakterii lub ich kompleksów [71].

Ze względu na powyższe cechy oraz stosunkowo krótki czas analizy real-time PCR i uproszczenie, wykorzystywany jest w badaniach nad występowaniem periopatogenów w różnych populacjach [21,59,80].

SEKWENCJONOWANIE GENU KODUJĄCEGO 16S rRNA

Inną metodą wykorzystywaną przy diagnostyce molekularnej w zapaleniu przyzębia jest sekwencjonowanie genu kodującego 16S rRNA, który jest składową podjednostki 30S w prokariotycznym rybosomie. Wspomniany gen ma długość około 1,500 bp i jest wysoce konserwowany. Wszystkie bakterie mają go w swoim genomie, występują w nim unikatowe różnice w sekwencji, które pozwalają zakwalifikować badany mikroorganizm do określonego rodzaju, a nawet gatunku [29]. Znajomość sekwencji DNA genu kodującego 16S rRNA badanych mikroorganizmów pozwala na ich identyfikowanie, badanie genetycznego pokrewieństwa oraz tworzenie drzew filogenetycznych [17]. Metoda identyfikacji gatunków za pomocą sekwencjonowania genu kodującego 16S rRNA bazuje na łańcuchowej reakcji polimerazy. DNA wyizolowane z próbki biofilmu lub kultury bakteryjnej poddaje się reakcji PCR ze starterami umożliwiającymi amplifikację całego genu lub mniejszych fragmentów polimorficznych (hypervariable region HVR) kodujących 16S rRNA. Następnie produkt PCR poddaje się sekwencjonowaniu, po czym otrzymane sekwencje porównuje się z bazami danych znanych gatunków bakterii [72]. Pierwszą globalną bazą danych zawierającą

informacje na temat mikroorganizmów występujących w jamie ustnej była „HOMD” (Human Oral Microbiome Database). Dostarcza sprawdzonych informacji prawie o 700 gatunkach prokariotów, które występują w ludzkiej jamie ustnej. Około 49% z nich jest oficjalnie nazwanych, 17% nienazwanych, lecz możliwych do hodowli i 34% uważa się za niemożliwe do hodowli filotypy (phylotypes), czyli jednostki taksonomiczne różnej rangi: szczepy, gatunki, rodzaje (www.homd.org). Narzędzia bazy HOMD umożliwiają porównanie sekwencji badanego mikroorganizmu z dostępnymi w bazie informacjami fenotypowymi, filogenetycznymi, klinicznymi i bibliograficznymi. Dostępne są dane na temat całych genomów 315 rodzajów bakterii, co stanowi 46% wszystkich rodzajów zawartych w HOMD. Podobną, lecz nieco nowszą bazą danych jest „CORE” (<http://microbiome.osu.edu/>). Jej stworzenie miało na celu zapewnienie pełnej i aktualnej wiedzy taksonomicznej, która umożliwiłaby przypisanie bakterii zasiedlających ludzką jamę ustną do rodzaju i gatunku oraz analizowanie dużej liczby danych [11,22]. Przyjęto, że jeżeli otrzymana sekwencja genu 16S rRNA jest przynajmniej w 97% podobna do znanej sekwencji z bazy danych, to można przypisać badaną bakterię do rodzaju. Natomiast 99% podobieństwa jest wystarczające, aby zakwalifikować ją do gatunku [13]. Zaletami sekwencjonowania 16S rDNA są m.in. możliwość projektowania swoistych starterów dla danych grup lub szczepów bakterii oraz możliwość przeprowadzenia amplifikacji z materiału genetycznego wyizolowanego z próbki bez konieczności prowadzenia hodowli. Umożliwia to diagnostykę infekcji powodowanych przez bakterie niehodowlalne. Wadą metody jest mała skuteczność w rozróżnianiu blisko spokrewnionych i wysoce rekombinowalnych gatunków, takich jak gatunki z rodzaju *Neisseria* i niektóre gatunki z rodzaju *Streptococcus* [12,25]. Mimo to sekwencjonowanie genu kodującego 16S rRNA przyniosło wiele korzyści w badaniach dotyczących biofilmu jamy ustnej. Wykazano m.in. obecność ponad 300 gatunków bakterii, których nie wykryto standardowymi metodami hodowli mikroorganizmów [31].

Ponieważ znaczna część mikroorganizmów poddziąsłowej płytki nazębnej jest trudna bądź niemożliwa do wykrycia metodami tradycyjnymi przez hodowlę, wprowadzenie metody z wykorzystaniem 16S rRNA miało znaczący wpływ na dokładne poznanie tego mikrobiomu [51]. Metoda 16S rRNA może być wykorzystywana do oceny jakościowej poszczególnych periopatogenów. Była stosowana do porównania skuteczności terapii mających na celu eliminację periopatogenów poddziąsłowej płytki nazębnej. Wykorzystując tę metodę oznaczano występowanie *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* oraz *T. denticola* [56]. Metoda sekwencjonowania genu kodującego 16S rRNA pozwala również na wykrycie bakterii odpowiedzialnych za zapalenie przyzębia w innych obszarach ciała, gdzie bakterie te mogą się znaleźć w wyniku zakażenia odogniskowego [10]. Metoda sekwencjonowania genu kodującego 16S rRNA może być pomocna w diagnostyce zakażeń endo-periodontalnych,

gdź określenie składu bakteryjnego w obrębie zmiany umożliwia ustalenie źródła zakażenia [19]. Ponadto dzięki tej metodzie możliwe jest badanie nie tylko wybranych periopatogenów, lecz całego mikrobiomu. W związku z tym używa się jej do określania wpływu rozmaitych czynników na jego strukturę. Stosowano ją do porównywania mikrobiomów płytki poddziąsłowej palaczy oraz osób niepalących, a także do zbadania mikrobiomu związanego z zapaleniem wokół wszczepów (periimplantitis) [42,62]. Badanie mikrobiomów metodą 16S rRNA umożliwiło także wykrycie interakcji między wiriomek płytki nazębnej a jej mikrobiomem bakteryjnym. Zjawisko to może w istotny sposób wpływać na przebieg chorób przyzębia [38].

HYBRYDYZACJE TYPU „CHECKERBOARD” I „REVERSE-CAPTURE CHECKERBOARD”

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych to zjawisko, w którym powstają stabilne dwuniciowe struktury z cząsteczek pojedynczych łańcuchów polinukleotydowych o wzajemnie komplementarnych sekwencjach. Hybrydyzacja zachodzi między dwoma jednoniciowymi łańcuchami kwasów nukleinowych, tj.: DNA i DNA, DNA i RNA oraz RNA i RNA [2]. W metodach hybrydyzacji wykorzystuje się kwasy nukleinowe o znanej sekwencji nukleotydów, które są komplementarne do określonych sekwencji genomu patogenów. Otrzymuje się je w procesie klonowania lub syntezy chemicznej. Kwasy nukleinowe wyznakowane radioizotopem ³²P pełnią funkcję sondy molekularnej. Coraz częściej stosuje się sondy molekularne wyznakowane technikami nieradioaktywnymi, polegającymi na przyłączeniu do nich fluorochromów biotyny lub digoksygeniny [2]. Szczególna odmiana hybrydyzacji DNA-DNA o nazwie „checkerboard” (szachownica) jest przyjęta jako „złoty standard” przy badaniu biofilmu jamy ustnej [72]. Umożliwia jednoczesne badanie wielu próbek i rozpoznanie wielu gatunków mikroorganizmów. Metoda została opracowana przez zespół pod kierownictwem Socransky’ego w 1994 r. [67]. Polega na połączeniu DNA wyizolowanego z próbek bakteryjnych z powierzchnią filtra nylonowego lub nitrocelulozowego. Tak przygotowany filtr poddaje się następnie hybrydyzacji z sondami DNA przynajmniej 40 gatunków bakterii [67]. Liczbę poszczególnych mikroorganizmów w próbce można ogólnie określić na podstawie natężenia światła fluorescencyjnego lub chemiluminescencyjnego pochodzącego od sond molekularnych. Na początku hybrydyzacja DNA-DNA była użyteczna jedynie do identyfikacji mikroorganizmów niemożliwych do hodowli. Wraz z rozwojem i popularyzacją technik PCR opracowano metodę hybrydyzacji typu „reverse-capture checkerboard” (odwrotnego uchwytu). Polega na amplifikacji genu 16S rRNA od 30 znanych mikroorganizmów i połączeniu ich z membraną. Następnie tak przygotowaną membranę poddaje się hybrydyzacji z odcinkami genu 16S rDNA mikroorganizmów z badanej próbki, powielonymi w reakcji PCR. Startery do amplifikacji genu 16S rRNA w badanej próbce są wyznakowane za pomocą uniwersalnych

sond, które są zdolne do chemifluorescencji. Technika „reverse-capture checkerboard” umożliwia jednoczasową hybrydyzację 1350 prób 16S rDNA na jednej membranie [48].

Wymienione metody hybrydyzacji są przydatne w badaniu mikroorganizmów występujących na różnych powierzchniach jamy ustnej, określaniu składu biofilmu w zapaleniu przyzębia oraz określeniu dominujących gatunków bakterii w poszczególnych przypadkach [39]. Techniki tych używano również do oszacowania wyniku postępowania terapeutycznego [23]. Wadą metod jest ich pracochłonność i czasochłonność, a obecnie powszechniej stosuje się metody badawcze PCR niezwiązane z hybrydyzacją [72]. Mimo tych ograniczeń hybrydyzacja DNA-DNA jest jednak stosunkowo często stosowana. Wykorzystywana była m.in. do identyfikacji periopatogenów związanych z agresywnym zapaleniem przyzębia, do oceny skuteczności wybranych terapii periodontologicznych oraz wpływu palenia tytoniu na rekolonizację bakterii po leczeniu [15,16,53,54]. Hybrydyzacja typu „reverse-capture checkerboard” zastosowana została przez Pastera i wsp. w celu analizy bakterii związanych z martwiczo-wrzdziejającym zapaleniem przyzębia u nosicieli wirusa HIV [49].

MIKROMACIERZE WYKORZYSTUJĄCE METODĘ HYBRYDYZACJI

Mikromacierze (microarray) są stosowane do identyfikacji mikroorganizmów oraz określania ekspresji genów [17]. Zbudowane są z jednoniciowych sond związanych kowalencyjnie z powierzchnią szklanych lub nylonowych chipów przez reaktywne grupy terminalne bądź za pośrednictwem adsorpcji lub powinowactwa [5]. W celu detekcji swoistych fragmentów kwasów nukleinowych stosuje się sondy w postaci jednoniciowych fragmentów DNA o znanej sekwencji, produktów PCR lub oligonukleotydów [30]. Sondy są zaprojektowane tak, aby mogły hybrydować z określonymi sekwencjami RNA lub DNA z badanej próbki materiału biologicznego. Sekwencje sond najczęściej dobierane są z baz danych, takich jak np. GeneBank i UniGene [30]. Próbkami poddawany analizie mogą być produkty PCR, całkowity DNA, cDNA – komplementarny DNA (complementary DNA), genomowy DNA, plazmidowy DNA lub oligonukleotydy. Zazwyczaj pierwszym etapem przygotowania próbki do diagnostyki jest jej amplifikacja w procesie PCR. Próbkę znakuje się bezpośrednio przez inkorporację nukleotydów znakowanych fluorescencyjnie lub radioizotopowo w procesie PCR. Najczęściej stosuje się barwniki cyjaninowe Cy3 (zielony) i Cy5 (czerwony). Możliwe jest również znakowanie próbek z fotobiotyną [65]. Wszystkie dostępne na rynku platformy mikromacierzy mają taki sam mechanizm działania. Po naniesieniu próbki na powierzchnię chipa poszukiwany fragment jednoniciowego kwasu nukleinowego hybryduje z komplementarną sondą. Powstają dwuniciowe fragmenty, które rejestruje detektor, np. fluorescencyjny, chemiluminescencyjny lub spektrometrii masowej [30]. Do kontroli stosuje się cząsteczki DNA różniące się od zastosowanej

sondy jednym, centralnie położonym nukleotydem, co pozwala na oszacowanie intensywności sygnału pochodzącego od nieswoistego związanego DNA [27,30]. Intensywność otrzymanego sygnału z próby badanej pozwala na określenie ilości związanego kwasu nukleinowego, a tym samym na oszacowanie liczby mikroorganizmów lub poziomu ekspresji genów w badanym materiale [52]. Stosując odpowiednie sondy, można również badać markery związane ze zjadliwością mikroorganizmów, jak również geny oporności na antybiotyki. Mikromacierze DNA stwarzają nieograniczone możliwości wykrywania różnych sekwencji DNA [30]. Mikromacierze o małej gęstości zawierają od setek do tysięcy sond umieszczonych na powierzchni membrany. Natomiast mikromacierze o dużej gęstości zawierają od tysięcy do milionów sond molekularnych [52].

Zarówno sondy o małej, jak i dużej gęstości znalazły zastosowanie w identyfikacji mikroorganizmów jamy ustnej [7]. Mikromacierze wykorzystano w badaniu odpowiedzi transkrypcyjnej *P. gingivalis* na działanie środków antybakteryjnych [43]. Użycie mikromacierzy pozwoliło na poznanie odpowiedzi transkrypcyjnej wywołanej przez interakcje między obecnymi w kieszonkach przyzębnych mikroorganizmami, które należą do różnych kompleksów [61]. Moffatt i Lamont zastosowali mikromacierze do badania ekspresji mikroRNA w komórkach nabłonka dziąsłowego przez *P. gingivalis*, mającej chronić ten mikroorganizm przed układem odpornościowym gospodarza [41].

Dostępne są komercyjne chipy-DNA pozwalające ustalić do jakiego gatunku należą bakterie odpowiedzialne za powstawanie choroby przyzębia. Mikromacierz do klinicznej diagnostyki periodontologicznej ParoCheck® umożliwia wykrycie 10 gatunków bakterii związanych z zapaleniem przyzębia [73].

ELEKTROFOREZY DGGE I TGGE

Elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE) oraz elektroforeza w gradiencie temperatury (Temperature Gradient Gel Electrophoresis – TGGE) to metody oparte o reakcję PCR i elektroforezę żelową. Opracowane w celu wykrywania pojedynczych mutacji w ludzkim materiale genetycznym, są również z powodzeniem wykorzystywane do rozdziału produktów PCR matrycowego DNA mieszaniny mikroorganizmów pochodzących z biofilmu jamy ustnej [37,72]. Umożliwiają rozdział zamplifikowanych fragmentów markerowych genów (w tym 16S rDNA) w żelu poliakrylamidowym w gradiencie stężeń czynnika denaturującego. W przypadku DGGE jest nim wzrastające stężenie mocznika, natomiast w przypadku TGGE wzrastająca temperatura. Układ prążków na żelu powstały w wyniku procesu elektroforezy zależy od temperatury topnienia cząsteczek DNA, a więc od ich sekwencji. Każdy prążek zaobserwowany na żelu odpowiada jednej bakteryjnej populacji w obrębie biofilmu, a cały powstały układ prążków odzwierciedla jego zło-

zoność i różnorodność. Skuteczność rozdziału DNA metodami DGGE i TGGE jest mniejsza, jeżeli różnice w sekwencjach są większe niż jedna para zasad. Jest to spowodowane podobieństwem proporcji nukleotydów tworzących różne nici. W efekcie dwie różne sekwencje mogą mieć taką samą charakterystykę topnienia. Istnieje również możliwość dokładniejszego zbadania materiału genetycznego tworzącego pojedynczy prążek. W tym celu należy wyciąć badany materiał z żelu i zbadać jego sekwencję w sekwenatorze. Po porównaniu otrzymanej sekwencji z bazami danych możliwe jest przypisanie mikroorganizmu do gatunku [72].

Metoda DGGE została po raz pierwszy zastosowana w diagnostyce mikrobiologicznej jamy ustnej przez Muzera i wsp. w 1993 r. [45]. Zijngel i wsp. porównali skuteczność wykrywania bakterii związanych z zapaleniem przyzębia z zastosowaniem elektroforezy DGGE z PCR oraz klasycznymi metodami hodowlanymi. Technika DGGE była równie skuteczna w identyfikacji *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia* oraz *T. forsythensis*, jak wspomniane metody. DGGE przewyższa PCR oraz hodowlę pod względem czułości w wykrywaniu *A. actinomycetemcomitans*. Zaletą DGGE jest możliwość identyfikacji wielu gatunków jednocześnie oraz możliwość wykrywania patogenów w zależności od obecności innych gatunków [81].

Ledder i wsp. wykorzystali tę technikę do identyfikacji drobnoustrojów związanych z występowaniem przewlekłych zapaleń przyzębia, porównując skład płytki podziąsłowej osób zdrowych oraz pacjentów cierpiących na chorobę przyzębia [35]. DGGE stosowano także w diagnostyce mikrobiologicznej mieszanych zakażeń endo-periodontalnych, w których mogą być pomocne w ustaleniu pierwotnego źródła zakażenia [79].

POLIMORFIZM DŁUGOŚCI TERMINALNYCH FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH

Polimorfizm długości terminalnych fragmentów restrykcyjnych (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism – TRFLP) to metoda bazująca na technice PCR, która znajduje zastosowanie m.in. do badania różnorodności gatunkowej biofilmu jamy ustnej u osób zdrowych oraz u pacjentów z zapaleniem przyzębia, badania zmian w populacjach mikroorganizmów jamy ustnej po leczeniu, a także w badaniu bakterii zasiedlających zainfekowane kanały korzeniowe [28,60]. Przedmiotem badań są amplikony genów markerowych, w tym 16S rRNA, otrzymane w reakcji łańcuchowej polimerazy z wykorzystaniem swoistych starterów znakowanych sondami fluorescencyjnymi. Produkt reakcji PCR poddaje się trawieniu enzymami restrykcyjnymi, po czym fragmenty DNA rozdziela się w procesie elektroforezy kapilarnej [72]. Analizie poddaje się fragment DNA najbliższy końca amplifikowanego genu. Wyniki są analizowane za pomocą komputera z odpowiednim oprogramowaniem. Wynikiem takiej analizy jest tzw. „odcisk palca” (fingerprint) danej populacji mikroorganizmów

[74]. Zastosowania metody TRFLP wykraczają poza świat medycyny. Z powodzeniem prowadzono badania nad mikrobiologiczną różnorodnością środowiska gleby oraz zmiennością sezonową i dynamiką wymiany gatunków w biofilmach występujących w rzekach i naturalnych zbiornikach wodnych [18,77]. Zaletami metody TRFLP są: szybkość i czułość, z jaką wykrywa się genetyczną różnorodność w badanym materiale, brak potrzeby izolowania kultur bakteryjnych oraz powtarzalność szacowania różnorodności złożonych populacji bez potrzeby znajomości sekwencji genomowych badanych mikroorganizmów [60]. Do wad metody należy zaliczyć konieczność posiadania kosztownej aparatury i bazy danych, służących do analizy uzyskanych wyników [34].

Za pomocą metody TRFLP oceniano zmiany w mikrobiomie podziąsłowym po zaprzestaniu palenia papierosów, wykazując bardzo istotną rolę porzucenia nałogu w leczeniu zapaleń przyzębia [20]. Papapostolou i wsp. wykorzystali TRFLP do badania różnic między mikrobiomem płytki nazębnej u bliźniąt jednojajowych i dwujajowych, wykazując brak wpływu genotypu gospodarza na skład mikrobiomu [47].

SEKWENCJONOWANIE NOWEJ GENERACJI (NEXT GENERATION SEQUENCING – NGS)

W ciągu ostatnich lat nastąpił znaczny rozwój technologii sekwencjonowania DNA. Od 2005 r. na rynku pojawiło się kilka platform oferujących systemy sekwencjonowania nowej generacji. Możemy je podzielić na dwie grupy. Pierwsza to urządzenia bazujące na technologii PCR: Roche 454 Genome Sequencer (Roche Diagnostics Corp., Branford, CT, USA), HiSeq 2000 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), AB Solid™ System (Life Technologies, South San Francisco, CA, USA). Drugą grupą są systemy bazujące na sekwencjonowaniu pojedynczych molekuł (Single Molecule Sequencing – SMS). Systemy te nie przeprowadzają amplifikacji DNA przed procesem sekwencjonowania. Do tej grupy zaliczają się dwa systemy: HeliScope (Helios BioSciences Corp., Cambridge, MA, USA) oraz PacBio RS SMRT system (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA). NGS umożliwia jednoczesne sekwencjonowanie milionów krótkich (25–150 bp) fragmentów nici DNA, skrócenie czasu badania całego genomu bakteryjnego do kilku godzin oraz znaczne obniżenie kosztów [76]. Sekwencjonowanie nowej generacji znalazło zastosowanie przy identyfikacji i poznaniu bioróżnorodności genomów wirusów, m.in. grypy, HIV i wirusowego zapalenia wątroby typu B [55]. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) jest doskonałym narzędziem do badania różnorodności biofilmów środowiskowych, jak również tych znajdujących się w jamie ustnej człowieka [64]. Techniki sekwencjonowania nowej generacji z pewnością znajdą zastosowanie w diagnostyce molekularnej zapalenia przyzębia, lecz wymagają standaryzacji. Dotychczas metody tej używano do oceny zmian składu mikrobiomu podziąsłowego w odpowiedzi na leczenie periodontologiczne oraz do porównania mikrobiomów kieszonek przyzębnych palaczy i osób niepalących [4,63].

PODSUMOWANIE

Poznanie gatunków oraz zrozumienie złożonych zależności i oddziaływań między mikroorganizmami tworzącymi biofilm jamy ustnej może dostarczyć informacji niezbędnych do usprawnienia diagnostyki i terapii celowanej u pacjentów cierpiących z powodu zapalenia przyzębia. Dostępne techniki diagnostyki molekularnej pozwalają na szybkie wykrycie patogenu obecnego nawet w niewielkich ilościach w materiale diagnostycznym. Diagnostyka molekularna jest szczególnie użyteczna do wykrywania mikro-

organizmów, których hodowla w laboratorium jest trudna lub niemożliwa. Metody bazujące na reakcji hybrydyzacji kwasów nukleinowych pozwalają na jednoczesne badanie wielu próbek, lecz są kosztowne i czasochłonne. Techniki wykorzystujące PCR wykazują większą czułość i swoistość, pozwalają również oszczędzić czas i zmniejszyć koszty badania. Obecny stan wiedzy i liczba metod diagnostycznych pozwalają z powodzeniem poznawać biofilm jamy ustnej, niemniej jednak potrzebne są dalsze badania nad udoskonaleniem i obniżeniem kosztów tych technik.

PIŚMIENICTWO

- [1] Aas J.A., Paster B.J., Stokes L.N., Olsen I., Dewhirst, F.E.: Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.*, 2005; 43: 5721-5732
- [2] Bartkowiak J.: Molecular methods in the diagnosis of infectious diseases. *Przegląd Epidemiol.*, 2003; 57: 381-389
- [3] Bartova J., Sommerova P., Lyuya-Mi Y., Mysak J., Prochazkova J., Duskova J., Janatova T., Podzimek S.: Periodontitis as a risk factor of atherosclerosis. *J. Immunol. Res.*, 2014; 2014: 636893
- [4] Bizzarro S., Loos B.G., Laine M.L., Crielaard W., Zaura E.: Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in periodontitis: an exploratory study using traditional targeted techniques and a next-generation sequencing. *J. Clin. Periodontol.*, 2013; 40: 483-492
- [5] Call D.R., Borucki M.K., Loge F.J.: Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J. Microbiol. Methods*, 2003; 53: 235-243
- [6] Chiranjeevi T., Prasad O.H., Prasad U.V., Kumar A.K., Chakravarthi V.P., Rao P.B., Sarma P.V., Reddy N.R., Bhaskar M.: Identification of microbial pathogens in periodontal disease and diabetic patients of South Indian population. *Bioinformatics*, 2014; 10: 241-245
- [7] Colombo A.P., Boches S.K., Cotton S.L., Goodson J.M., Kent R., Haffajee A.D., Socransky S.S., Hasturk H., Van Dyke T.E., Dewhirst F., Paster B.J.: Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J. Periodontol.*, 2009; 80: 1421-1432
- [8] de Ávila E.D., de Molon R.S., de Godoi Gonçalves D.A., Camparis C.M.: Relationship between levels of neuropeptide Substance P in periodontal disease and chronic pain: a literature review. *J. Investig. Clin. Dent.*, 2014; 5: 91-97
- [9] D'Ercole S., Catamo G., Tripodi D., Piccolomini R.: Comparison of culture methods and multiplex PCR for the detection of periodontopathogenic bacteria in biofilm associated with severe forms of periodontitis. *New Microbiol.*, 2008; 31: 383-391
- [10] Ding F., Lyu Y., Han X., Zhang H., Liu D., Hei W., Liu Y.: Detection of periodontal pathogens in the patients with aortic aneurysm. *Chin. Med. J.*, 2014; 127: 4114-4118
- [11] Do T., Devine D., Marsh P.D.: Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.*, 2013; 5: 11-19
- [12] Do T., Jolley K.A., Maiden M.C., Gilbert S.C., Clark D., Wade W.G., Beighton, D.: Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology*, 2009; 155: 2593-2602
- [13] Drancourt M., Bollet C., Carlouz A., Martelin R., Gayral J.P., Raoult, D.: 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2000; 38: 3623-3630
- [14] Eick S., Pfister W.: Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J. Clin. Periodontol.*, 2002; 29: 638-644
- [15] Elabdeen H.R., Mustafa M., Hasturk H., Klepac-Ceraj V., Ali R.W., Paster B.J., Van Dyke T., Bolstad A.L.: Subgingival microbial profiles of Sudanese patients with aggressive periodontitis. *J. Periodontal Res.*, 2015; 50: 674-682
- [16] Feres M., Bernal M., Matarazzo F., Faveri M., Duarte P.M., Figueiredo L.C.: Subgingival bacterial recolonization after scaling and root planing in smokers with chronic periodontitis. *Aust. Dent. J.*, 2015; 60: 225-232
- [17] Fox G.E., Stackebrandt E., Hespell R.B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T.A., Wolfe R.S., Balch W.E., Tanner R.S., Magrum L.J., Zablen L.B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B.J. i wsp.: The phylogeny of prokaryotes. *Science*, 1980; 209: 457-463
- [18] Frąc M., Jezierska-Tys S.: Różnorodność mikroorganizmów środowiskowych gleby. *Post. Mikrobiol.*, 2010; 40: 47-58
- [19] Fujii R., Muramatsu T., Yamaguchi Y., Asai T., Aida N., Suehara M., Morinaga K., Furusawa M.: An endodontic-periodontal lesion with primary periodontal disease: a case report on its bacterial profile. *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, 2014; 55: 33-37
- [20] Fujinaka H., Takeshita T., Sato H., Yamamoto T., Nakamura J., Hase T., Yamashita Y.: Relationship of periodontal clinical parameters with bacterial composition in human dental plaque. *Arch. Microbiol.*, 2013; 195: 371-383
- [21] Gatto M.R., Montevecchi M., Paolucci M., Landini M.P., Checchi, L.: Prevalence of six periodontal pathogens in subgingival samples of Italian patients with chronic periodontitis. *New Microbiol.*, 2014; 37: 517-524
- [22] Griffen A.L., Beall C.J., Firestone N.D., Gross E.L., Difrancia J.M., Hardman J.H., Vriesendorp B., Faust R.A., Janies D.A., Leys E.J.: CORE: a phylogenetically-curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. *PLoS One*, 2011; 6: e19051
- [23] Haffajee A.D., Cugini M.A., Tanner A., Pollack R.P., Smith C., Kent R.L.Jr., Socransky S.S.: Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J. Clin. Periodontol.*, 1998; 25: 346-353
- [24] Hajishengallis G., Darveau R.P., Curtis M.A.: The keystone pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2012; 10: 717-725
- [25] Hanage W.P., Fraser C., Spratt B.G.: Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol.*, 2005; 3: 6
- [26] He X.S., Shi W.Y.: Oral microbiology: past, present and future. *Int. J. Oral Sci.*, 2009; 1: 47-58
- [27] Heller M.J.: DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2002; 4: 129-153

- [28] Hommez G.M., Verhelst R., Claeys G., Vaneechoutte M., De Moor R.J.: Investigation of the effect of the coronal restoration quality on the composition of the root canal microflora in teeth with apical periodontitis by means of T-RFLP analysis. *Int. Endod. J.*, 2004; 37: 819-827
- [29] Janda J.M., Abbott S.L.: 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.*, 2007; 45: 2761-2764
- [30] Karczmarczyk M., Bartoszcze M.: DNA microarrays - new tool in the identification of biological agents. *Przegl. Epidemiol.*, 2006; 60: 803-811
- [31] Kroes I., Lepp P.W., Relman D.A.: Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 96: 14547-14552
- [32] Kumar M., Mishra L., Mohanty R., Nayak R.: Diabetes and gum disease: The diabolic duo. *Diabetes Metab. Syndr.*, 2014; 8: 255-258
- [33] Kumar P.S.: Oral microbiota and systemic disease. *Anaerobe*, 2013; 24: 90-93
- [34] Kuramitsu H.K., He X., Lux R., Anderson M.H., Shi W.: Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2007; 71: 653-670
- [35] Ledder R.G., Gilbert P., Huws S.A., Aarons L., Ashley M.P., Hull P.S., McBain A.J.: Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 516-523
- [36] Le Pecq J.B., Paoletti C.: A new fluorometric method for RNA and DNA determination. *Anal. Biochem.*, 1966; 17: 100-107
- [37] Liczbańska A., Woźniak A., Wawrocka A., Krawczyk M.R.: Techniki wykorzystywane w diagnostyce molekularnej chorób jedynogowych. *Now. Lek.*, 2006; 75: 486-490
- [38] Ly M., Abeles S.R., Boehm T.K., Robles-Sikisaka R., Naidu M., Santiago-Rodriguez T., Pride D.T.: Altered oral viral ecology in association with periodontal disease. *MBio*, 2014; 5: e01133-14
- [39] Mager D.L., Ximenez-Fyvie L.A., Haffajee A.D., Socransky S.S.: Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J. Clin. Periodontol.*, 2003; 30: 644-654
- [40] Marsh P.D.: Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.*, 2004; 38: 204-211
- [41] Moffatt, C.E., Lamont R.J.: Porphyromonas gingivalis induction of microRNA-203 expression controls suppressor of cytokine signaling 3 in gingival epithelial cells. *Infect. Immun.*, 2011; 79: 2632-2637
- [42] Moon J.H., Lee J.H., Lee J.Y.: Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in Korean chronic periodontitis patients. *Mol. Oral Microbiol.*, 2015; 30: 227-241
- [43] Moon J.H., Lee J.H., Lee J.Y.: Microarray analysis of the transcriptional responses of Porphyromonas gingivalis to polyphosphate. *BMC Microbiol.*, 2014; 14: 218
- [44] Mullis K.B.: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.*, 1990; 262: 56-61, 64-65
- [45] Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993; 59: 695-700
- [46] Ono T., Hirota K., Nemoto K., Fernandez E.J., Ota F., Fukui K.: Detection of Streptococcus mutans by PCR amplification of spaP gene. *J. Med. Microbiol.*, 1994; 41: 231-235
- [47] Papapostolou A., Kroffke B., Tatakis D.N., Nagaraja H.N., Kumar P.S.: Contribution of host genotype to the composition of health-associated supragingival and subgingival microbiomes. *J. Clin. Periodontol.*, 2011; 38: 517-524
- [48] Paster B.J., Bartoszyk I.M., Dewhirst F.E.: Identification of oral streptococci using PCR-based, reverse-capture, checkerboard hybridization. *Methods Cell Sci.*, 1998; 20: 223-231
- [49] Paster B.J., Russell M.K., Alpagot T., Lee A.M., Boches S.K., Galvin J.L., Dewhirst F.E.: Bacterial diversity in necrotizing ulcerative periodontitis in HIV-positive subjects. *Ann. Periodontol.*, 2002; 7: 8-16
- [50] Pendyala G., Joshi S., Chaudhari S., Gandhage D.: Links demystified: periodontitis and cancer. *Dent. Res. J.*, 2013; 10: 704-712
- [51] Pihlstrom B.L., Michalowicz B.S., Johnson N.W.: Periodontal diseases. *Lancet*, 2005; 366: 1809-1820
- [52] Pozhitkov A.E., Beikler T., Flemmig T., Noble P.A.: High-throughput methods for analysis of the human oral microbiome. *Periodontol.* 2000, 2011; 55: 70-86
- [53] Preus H.R., Dahlen G., Gjerme P., Baelum V.: Microbiological observations after four treatment strategies among periodontitis patients maintaining a high standard of oral hygiene: a secondary analysis of a randomized controlled clinical trial. *J. Periodontol.*, 2015; 86: 856-865
- [54] Queiroz A.C., Suaid F.A., de Andrade P.F., Novaes A.B.Jr., Taba M.Jr., Palioto D.B., Grisi M.F., Souza S.L.: Antimicrobial photodynamic therapy associated to nonsurgical periodontal treatment in smokers: microbiological results. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2014; 141: 170-175
- [55] Radford A.D., Chapman D., Dixon L., Chantrey J., Darby A.C., Hall N.: Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J. Gen. Virol.*, 2012; 93: 1853-1868
- [56] Ramich T., Schacher B., Scharf S., Röhlke L., Arndt R., Eickholz P., Nickles K.: Subgingival plaque sampling after combined mechanical and antibiotic nonsurgical periodontal therapy. *Clin. Oral Investig.*, 2015; 19: 27-34
- [57] Riggio M.P., Macfarlane T.W., Mackenzie D., Lennon A., Smith A.J., Kinane D.: Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque samples. *J. Periodontol. Res.*, 1996; 31, 496-501
- [58] Rosier B.T., De Jager M., Zaura E., Krom B.P.: Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014; 4: 92
- [59] Sakamoto M., Takeuchi Y., Umeda M., Ishikawa I., Benno Y.: Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiol. Immunol.*, 2001; 45: 39-44
- [60] Sakamoto M., Takeuchi Y., Umeda M., Ishikawa I., Benno Y.: Application of terminal RFLP analysis to characterize oral bacterial flora in saliva of healthy subjects and patients with periodontitis. *J. Med. Microbiol.*, 2003; 52: 79-89
- [61] Sarkar J., McHardy I.H., Simanian E.J., Shi W., Lux R.: Transcriptional responses of Treponema denticola to other oral bacterial species. *PLoS One*, 2014; 9: e88361
- [62] Schaumann S., Staufienbiel I., Scherer R., Schilhabel M., Winkel A., Stumpp S.N., Eberhard J., Stiesch M.: Pyrosequencing of supra- and subgingival biofilms from inflamed peri-implant and periodontal sites. *BMC Oral Health*, 2014; 14: 157
- [63] Schwarzberg K., Le R., Bharti B., Lindsay S., Casaburi G., Salvatore F., Saber M.H., Alonaizan F., Slots J., Gottlieb R.A., Caporaso J.G., Kelley S.T.: The personal human oral microbiome obscures the effects of treatment on periodontal disease. *PLoS One*, 2014; 9: e86708
- [64] Shokralla S., Spall J.L., Gibson J.F., Hajibabaei M.: Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol. Ecol.*, 2012; 21: 1794-1805
- [65] Small J., Call D.R., Brockman F.J., Straub T.M., Chandler D.P.: Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001; 67: 4708-4716
- [66] Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C., Kent R.L.:

Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.*, 1998; 25: 134-144

[67] Socransky S.S., Smith C., Martin L., Paster B.J., Dewhirst F.E., Levin A.E.: "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *BioTechniques*, 1994; 17: 788-792

[68] Somma F., Castagnola R., Bollino D., Marigo L.: Oral inflammatory process and general health. Part 1: The focal infection and the oral inflammatory lesion. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2010; 14: 1085-1095

[69] Staley J.T., Konopka A.: Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1985; 39: 321-346

[70] Studzińska A., Tyburski J., Dąca P., Tretyn A.: Real time PCR. The idea of the method and strategies of reaction monitoring. *Biotechnologia*, 2008; 80: 71-85

[71] Suzuki N., Yoshida A., Nakano Y.: Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clin. Med. Res.*, 2005; 3: 176-185

[72] Tomita S., Komiya-Ito A., Imamura K., Kita D., Ota K., Takayama S., Makino-Oi A., Kinumatsu T., Ota M., Saito A.: Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis. *Microb. Pathog.*, 2013; 61-62: 11-15

[73] Topcuoglu N., Kulekci G.: 16S rRNA based microarray analysis of ten periodontal bacteria in patients with different forms of periodontitis. *Anaerobe*, 2015; 35: 35-40

[74] Trafny E.A.: Jak zdobyć i wykorzystać wiedzę o wielogatunkowych biofilmach? *Post. Mikrobiol.*, 2012; 51: 205-211

[75] Valasek M.A., Repa J.J.: The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.*, 2005; 29: 151-159

[76] Wain J., Mavrogiorgou E.: Next-generation sequencing in clinical microbiology. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2013; 13: 225-227

[77] Wey J.K., Jürgens K., Weitere M.: Seasonal and successional influences on bacterial community composition exceed that of protozoan grazing in river biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012; 78: 2013-2024

[78] Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P.: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 1997; 22: 130-131, 134-138

[79] Xia M., Qi Q.: Bacterial analysis of combined periodontal-endodontic lesions by polymerase chain reaction denaturing-gradient gel electrophoresis. *J. Oral Sci.*, 2013; 55: 287-291

[80] Zhou X., Liu X., Li J., Aprecio R.M., Zhang W., Li Y.: Real-time PCR quantification of six periodontal pathogens in saliva samples from healthy young adults. *Clin. Oral Investig.*, 2015; 19: 937-946

[81] Zijngje V., Welling G.W., Degener J.E., van Winkelhoff A.J., Abbas F., Harmsen H.J.: Denaturing gradient gel electrophoresis as a diagnostic tool in periodontal microbiology. *J. Clin. Microbiol.*, 2006; 44: 3628-3633

Autorzy deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.