

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Patogenní mikroflóra parodontu
Liubov Alkhimenko

Bakalářská práce
2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Liubov Alkhimenko**
Osobní číslo: **C17369**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Téma práce: **Patogenní mikroflóra parodontu**
Téma práce anglicky: **The Pathogenic Periodontal Microflora**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Charakterizujte onemocnění parodontu způsobené patogenními bakteriemi.
2. Popište hlavní patogenní bakterie dutiny ústní.
3. Uveďte laboratorní diagnostiku těchto patogenních bakterií.
4. Nastíňte terapii a možnosti prevence.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Iveta Brožková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Patogenní mikroflóra parodontu jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 20.6.2022

Liubov Alkhimenko v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D a Ing. Květě Koryčanové, Ph.D za cenné rady, věnovaný čas, pomoc, trpělivost a vstřícný přístup při vypracování bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá bakteriemi, které jsou považovány za patogenní mikroflóru parodontu. Zaměřuje se hlavně na bakterie *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* vyvolávající chronickou parodontitidu a *Actinomyces actinomycetemcomitans*, která je původcem agresivní parodontitidy. Práce je věnována charakteristice bakterií, faktorům virulence, diagnostice a léčbě.

KLÍČOVÁ SLOVA

Chronická parodontitida, agresivní parodontitida, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces actinomycetemcomitans*

TITLE

The Pathogenic Periodontal Microflora

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with bacteria that are considered as pathogenic periodontal microflora. It focuses mainly on the bacteria *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* causing chronic periodontitis and *Actinomyces actinomycetemcomitans*, which is the causative agent of aggressive periodontitis. The work is devoted to the characteristics of bacteria, virulence factors, diagnosis and treatment.

KEYWORDS

Chronic periodontitis, aggressive periodontitis, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomyces actinomycetemcomitans*

Obsah

| | |
|--|----|
| Seznam obrázků..... | 10 |
| Seznam tabulek..... | 11 |
| Seznam zkratk..... | 12 |
| Úvod..... | 14 |
| 1 Onemocnění parodontu způsobené patogenními bakteriemi..... | 15 |
| 1.1 Anatomie parodontu..... | 15 |
| 1.2 Mikrobiální flóra dutiny ústní..... | 16 |
| 1.3 Rozvoj zánětu parodontu..... | 16 |
| 1.4 Klasifikace onemocnění parodontu..... | 17 |
| 1.5 Onemocnění gingivy – gingivitida..... | 17 |
| 1.5.1 Onemocnění gingivy indukované plakem..... | 17 |
| 1.5.2 Onemocnění gingivy neindukované plakem..... | 18 |
| 1.6 Parodontitida..... | 18 |
| 1.6.1 Chronická parodontitida..... | 18 |
| 1.6.2 Agresivní parodontitida..... | 19 |
| 1.6.3 Projev parodontitidy jako celkového onemocnění..... | 19 |
| 1.7 Nekrotizující onemocnění parodontu – parodontitida a onemocnění gingivy..... | 20 |
| 1.8 Abscesy parodontu..... | 20 |
| 1.9 Parodontitida spojená s endodontickými lézemi..... | 20 |
| 1.10 Vývojové a získané porušení a stavy..... | 21 |
| 2 Hlavní patogenní bakterie dutiny ústní..... | 22 |
| 2.1 <i>Treponema denticola</i> | 22 |
| 2.2 <i>Tannerella forsythia</i> | 23 |
| 2.3 <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 24 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.4 | <i>Actinomyces actinomycetemcomitans</i> | 25 |
| 3 | Faktory virulence | 26 |
| 3.1 | Faktory virulence <i>Treponema denticola</i> | 26 |
| 3.2 | Faktory virulence <i>Tannerella forsythia</i> | 28 |
| 3.3 | Faktory virulence <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 29 |
| 3.4 | Faktory virulence <i>Actinomyces actinomycetemcomitans</i> | 31 |
| 4 | Diagnostika | 33 |
| 4.1 | Diagnostika červeného komplexu | 34 |
| 4.1.1 | Kultivační technika | 35 |
| 4.1.2 | Diagnostika pomocí PCR testu | 35 |
| 4.1.3 | Metoda dot-blot hybridizace | 37 |
| 4.1.4 | Diagnostika pomocí testu BANA | 38 |
| 4.2 | Diagnostika bakterie <i>Actinomyces actinomycetemcomitans</i> | 39 |
| 4.2.1 | Kultivační technika | 40 |
| 4.2.2 | MALDI-TOF | 41 |
| 4.2.3 | Diagnostika pomocí PCR testu | 41 |
| 5 | Terapie | 43 |
| 5.1 | Terapie při chronické parodontitidě | 43 |
| 5.1.1 | Mechanická terapie | 43 |
| 5.1.2 | Podání antibiotika při léčbě chronické parodontitidy | 44 |
| 5.1.3 | Hygiena ústní dutiny | 46 |
| 5.2 | Terapie při agresivní parodontitidě | 46 |
| 5.2.1 | Mechanická terapie | 46 |
| 5.2.2 | Antimikrobiální terapie | 47 |
| 5.2.3 | Chirurgická terapie | 47 |
| 5.2.4 | Podpůrná terapie | 48 |

| | | |
|---|-----------------|----|
| 6 | Závěr | 49 |
| 7 | Reference | 50 |

Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 — Anatomie parodontu..... | 15 |
| Obrázek 2 — Vzorek plaku, buňky <i>Treponema denticola</i> (Zhou, 2015)..... | 22 |
| Obrázek 3 — Kolonie <i>Tannerella forsythia</i> na krevním agaru..... | 23 |
| Obrázek 4 — <i>P. gingivalis</i> krevním agaru s koňskou krví | 24 |
| Obrázek 5 — Kolonie <i>A. aktinomycetemcomitans</i> (krevní agar) | 25 |
| Obrázek 6 — Struktura bakterie <i>Treponema denticola</i> (Mohanty, 2019)..... | 27 |
| Obrázek 7 — Diagram ukazující vztah mezi subgingiválními druhy. Základna pyramidy se skládá z druhů, které kolonizují povrch zubů a množí se v rané fázi parodontitidy (Mohanty, 2019) | 34 |
| Obrázek 8 — Identifikace DNA metodou dot-blotting..... | 37 |
| Obrázek 9 — BANA reagenční proužek se vzorkem subgingiválního plaku (Dhalla, 2015) | 38 |
| Obrázek 10 — Inkubace reagenčního proužku po dobu 15 minut při teplotě 55 °C ± 5 °C (Dhalla, 2015) | 39 |
| Obrázek 11 — Čtení výsledků pomocí diagramu (Dhalla, 2015)..... | 39 |
| Obrázek 12 — Kolonie s drsnou texturou kmene <i>A. aktinomycetemcomitans</i> na čokoládovém agaru. Průměr kolonií nedosáhl 2 mm po 3 dnech inkubace v 5 % CO ₂ (Nørskov-Lauritsen, 2019)..... | 40 |
| Obrázek 13 — Elektroforéza na agarózovém gelu amplifikovaných produktů. Dráha M je marker velikosti DNA. Dráha 1 je negativní kontrola. Dráha 2 je negativní vzorek nevykazující žádnou infekci. Dráha 3 ukazuje 500 bp. <i>A. aktinomycetemcomitans</i> (Ramez, 2018)..... | 42 |
| Obrázek 14 — Dezinfekce ústní dutiny: odstranění zubního kamene a leštění kořenů (Osorio, 2012) | 44 |

Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Charakteristika antibiotik používaných k léčbě chronické parodontitidy (Walters, 2015)..... | 45 |
| Tabulka 2 Reprezentativní antibiotická terapie pro použití v léčbě chronické parodontitidy (Walters, 2015) | 45 |

Seznam zkratek

| | |
|---------------------------------|---|
| <i>A. actinomycetemcomitans</i> | <i>Actinomyces actinomycetemcomitans</i> |
| ATB | antibiotika |
| BANA | test enzymatického štěpení [N-benzoyl-dL-arginin-2naftylamidu] |
| BHI | infuze mozkové a srdeční tkáň |
| BspA | bacteroides surface protein A |
| CDT | cytolethal distending toxin |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| GCF | gingivální crevikulární tekutina |
| IgA, IgG | imunoglobulin A, G |
| IL | interleukin |
| INF | interferon |
| Kgp | lysin K |
| LPS | lipopolysacharid |
| LtxA | leukotoxin |
| MALDI-TOF | metoda matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace |
| MIC ₉₀ | koncentrace antibiotické látky, které je potřebné pro inhibice 90% kmenů daného bakteriálního druhu |
| MMP | metaloproteináza |
| MurNAc | kyselina N-acetylmuramová |
| O-antigen | O-specifický polysacharidový řetězec |
| OppA | ortholog oligopeptidové transportní jednotky |
| PAI | inhibitor aktivátoru plazminogenu |
| PCR | polymerázová řetězcová reakce |
| <i>P.gingivalis</i> | <i>Porphyromonas gingivalis</i> |
| qPCR | kvantitativní polymerázová řetězcová reakce |
| Rgp | arginin R |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| rRNA | ribozomální ribonukleová kyselina |
| TD | <i>Treponema denticola</i> |
| <i>T. denticola</i> | <i>Treponema denticola</i> |
| <i>T. forsythia</i> | <i>Tannerella forsythia</i> |

| | |
|----------------|---|
| TGVS | trypton – kvasinkový extrakt – želatina – mastné kyseliny – sérum medium |
| TLR2 | toll-like receptor 2 |
| t-PA | aktivátor plazminogenu |
| Tris/EDTA pufr | nebo TE pufr (tris(hydroxymethyl)aminomethan) o koncentraci 10 mM a ethylendiaminotetraoctová kyselina o koncentraci 1 mM |
| TSBV | Tryptic Soy-Serum-Bacitracin-Vancomycin Agar |
| UV | ultrafialové záření |
| VMGA III | mikrobiostatické médium podporující životaschopnost, anaerobně připravený |

Úvod

V ústní dutině člověka se nachází velké množství mikroorganismů. Za normálních podmínek tyto mikroorganismy nepoškozují tkáň člověka a koexistují s ním. Ale s porušením vnějších podmínek, jako je stres, kouření, špatná ústní hygiena nebo systémové onemocnění, se to může změnit. Parodontální bakterie mohou způsobit řadu onemocnění ústní dutiny, ztrátu zubů a vést ke značnému nepohodlí v každodenním životě člověka.

Tato práce je zaměřená na onemocnění agresivní a chronické paradontitidy a bakterie, které způsobují tyto choroby.

Chronická paradontitida je onemocnění, které se vyvíjí dlouhou dobu a způsobuje těžké poškození parodontu u dospělých lidí. Hlavní příčinou onemocnění je nedostatečná ústní hygiena. Chronická paradontitida je spojena s bakteriemi červeného komplexu. Do červeného komplexu patří tyto bakterie: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola*. V této práci jsou výše zmíněné bakterie charakterizovány včetně jejich faktorů virulence, což je schopnost mikroorganismů způsobovat onemocnění hostitele.

Další část práce je věnována přezkoumání agresivní paradontitidy a patogenní bakterie, která vyvolává toto onemocnění. Agresivní paradontitida je charakterizována rychlým poškozením parodontálních tkání. Na rozdíl od chronické paradontitidy postihuje hlavně mladé lidi, dospívající a děti. Hlavním původcem onemocnění je gramnegativní bakterie *Actinomyces actinomycetemcomitans*.

1 Onemocnění parodontu způsobené patogenními bakteriemi

1.1 Anatomie parodontu

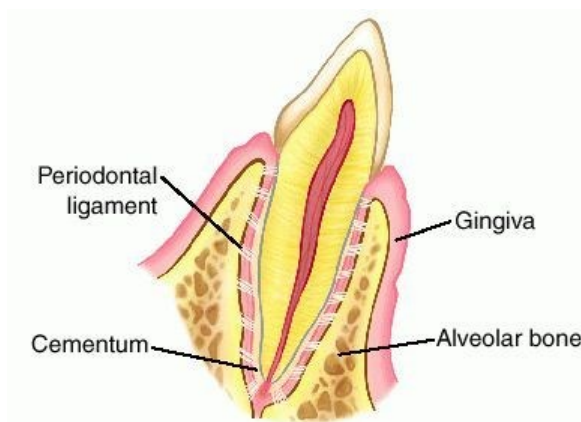
Parodont (řec. para – u, při; řec. *odús, odontos* – zub) je strukturní a funkční skupina tkání, které společně usnadňují ukotvení zubů v čelistech. Parodont se skládá ze zubního cementu, alveolární kosti, dásně (gingivy) a periodontia, který je tvořen spojovacím epitelem a souborem vazivových vláken (Reed, 2015).

Dásně (gingiva) jsou součástí sliznice, kryjí alveolární výběžky a přímo sousedí se zuby. Dáseň je tvořena vícevrstevným dlaždicovým nerohovějícím epitelem. Zdravá dáseň má světlou barvu (růžovo-bílou až růžovo-červenou), pevnou strukturu a nekrvácí po dráždění (Dostálová, 2010).

Alveolární kost (*alveolus dentis*) je část kosti dolní a horní čelisti, která podporuje zuby. Alveolární kost se skládá z vnější (ze strany tváře a pysku) a vnitřní stěny (ze strany jazyka), které jsou uspořádány ve formě oblouků podél okrajů čelistí (Barer, 2008).

Zubní cement (*cementum*) je tvrdá tkáň, která kryje povrch kořene zubu. Cement neobsahuje krevní a lymfatické cévy, ale tvoří jej velké množství anorganických látek (65 %). Zubní cement dělíme na: acelulární cement (primární) – bezbuněčná hmota, rozvijí se během vývoje a prořezání zubu a celulární cement (sekundární) vzniká později než primární, je tvořen buňkami zvané cementocyty (Balko, 2017).

Periodontium představuje soubor kolagenových vazivových vláken, které se nachází v periodontální štěrbině mezi cementem a alveolární kostí. Hlavní funkce periodontu je ukotvení zubu do alveolární kosti a zabránění rotaci a oslabení tlaku při žvýkání (Šedý, 2009).



Obrázek 1 — Anatomie parodontu
Zdroj: wordpress.com (19.10.2021)

1.2 Mikrobiální flóra dutiny ústní

V ústní dutině člověka se za normálních podmínek nachází rozmanité skupiny mikroorganismů jako jsou: bakterie, viry, kvasinky, protozoa, mezi nimi jsou nejpočetněji zastoupeny bakterie. Při bakteriologickém vyšetření zdravého člověka v ústní dutině můžeme nalézt kolem 400 druhů bakterií. Mikrobiální ekosystém a organismus člověka žijí v souladu s oboustrannými výhodami, ale za změněných podmínek bakterie mohou vyvolat onemocnění zubů, sliznic a hlavně parodontu (Votava, 2007).

Většina mikroorganismů osídluje ústní dutinu v podobě biofilmu. Biofilm je definován jako strukturované mikrobiální společenství, které je uloženo v mezibuněčné hmotě a pevně adhuje k inertním i živým povrchům. Na rozdíl od planktonického výskytu bakterie, které existují jenom v malém množství v ústní dutině jako izolované buňky, bakterie v podobě biofilmu mají vyšší odolnost k nepříznivým podmínkám prostředí a také vyšší rezistenci k antibiotikům (ATB) (Stepanova, 2016).

1.3 Rozvoj zánětu parodontu

Hlavní příčinou vzniku a rozvoje onemocnění parodontu je zubní plak.

Během dne počet bakterií v ústní dutině roste a vytváří se zubní plak, který je tvořen v podobě biofilmu a přítomen v lidském organismu za fyziologických podmínek (Ryšková, 2004). Zubní plak je bílá až nažloutlá měkká vrstva, která se usazuje v chrupu na místech se sníženou schopností samočištění (Dostálová, 2010). Při špatném nebo nedokonalém odstranění zubního plaku začíná rychlý růst kolonií mikroorganismů. Za 4 hodiny množství mikroorganismů zubního plaku se dostává na hodnoty 10⁴ bakterií na 1 mm² zubního povrchu (Barer, 2008). Za 24-48 hodin bakterie produkují enzymy a kyseliny, které podporují vznik zubního kazu a onemocnění parodontu (Šedý, 2009).

Na vznik zubního plaku se mohou podílet tyto faktory: konzistence jídla, zádrž jídla v ústní dutině, dieta, porušení ekosystému ústní dutiny, metabolismus mikroorganismů zubního plaku, zubní kámen, zubní náhrada, kouření (Barer, 2008).

Lidská ústní dutina zahrnuje různá stanoviště pro mikroby, včetně sliznice epitelu, povrchu jazyka a tvrdých povrchů zubů, které se dělí na supragingivální povrch, tj. nad linií dásní, a subgingivální, tj. pod linií dásní (Valm, 2019).

1.4 Klasifikace onemocnění parodontu

Klasifikace onemocnění parodontu (parodontopatií) se mění velmi dynamicky. Mezinárodní klasifikace parodontopatií dělí onemocnění do 9 tříd:

- A. Onemocnění gingivy indukované plakem – pro vznik onemocnění je nutná přítomnost zubního plaku
- B. Onemocnění gingivy neindukované plakem – onemocnění vyvolá bakteriální, virová nebo houbová infekce
- C. Chronická parodontitida – lokalizovaná a generalizovaná
- D. Agresivní parodontitida – lokalizovaná a generalizovaná
- E. Projev parodontitidy jako celkového onemocnění – souvisí s hematologickými nebo genetickými poruchami
- F. Nekrotizující onemocnění parodontu – parodontitida a onemocnění gingivy
- G. Abscesy parodontu
- H. Parodontitida spojená s endodontickými lézemi
- I. Vývojové a získané porušení a stavy

1.5 Onemocnění gingivy – gingivitida

Gingivitida je orální zánětlivé onemocnění, postihuje jenom gingivu a nedochází k porušení jiných částí parodontu. Neléčená gingivitida může vést k parodontitidě (Šedý, 2009). Mezi příznaky gingivitidy patří zčervenalé, oteklé a lesklé dásně, které krvácejí po čištění zubu (Dostálová, 2010).

Onemocnění gingivy můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin: indukované plakem a neindukované plakem onemocnění gingivy.

1.5.1 Onemocnění gingivy indukované plakem

Toto onemocnění je považováno za nejběžnější formu onemocnění parodontu a je definováno jako zánětlivá reakce gingiválních tkání vyplývající z hromadění plaku na a pod okrajem dásní. Podle rozsahu rozlišujeme lokalizovanou a generalizovanou formu.

Počáteční patologické změny často nemají klinické projevy. Mezi běžné klinické příznaky gingivitidy indukované plakem patří erytém, edém, krvácení, citlivost a zvětšení gingivy. Intenzita klinických příznaků a symptomů se liší mezi jedinci a mezi místy v chrupu.

Gingivitida, která je indukovaná plakem často může být doprovázena hormonálními změnami a tkáňové reakce v parodontu mohou být modulovány androgeny, estrogeny a progestiny v té či oné době v životě člověka. Puberta, menstruační cyklus, těhotenství nebo perorální antikoncepce samy o sobě nejsou považovány za diagnózy, ale mohou být spojeny s gingivitidou (Murakami, 2018).

1.5.2 Onemocnění gingivy neindukované plakem

Mezi příčiny onemocnění dásně neindukované plakem patří bakteriální, virové a houbové infekce, genetické poruchy a mukokutánní nemoci. Může být také způsobeno alergickými reakcemi, ranami nebo reakcemi na cizí tělesa, jako jsou zubní protézy (Bascones-Martinez, 2011).

1.6 Parodontitida

Parodontitida je onemocnění charakterizované zánětlivým procesem v parodontu a postihuje nejen gingivu, ale i hlubší struktury parodontu (Šedý, 2009). Různé formy parodontitidy rozlišujeme na základě bakteriálního původu a dalších systémových a genetických faktorů (Detienville, 2005).

1.6.1 Chronická parodontitida

Chronická parodontitida je nejčastější a nejzávažnější chronické zánětlivé onemocnění ústní dutiny (Majumder, 2019). Chronická forma parodontitidy je infekční onemocnění parodontu, která je vyvolána zubním plakem. Je charakterizována destrukcí parodontálních vazeb, resorpcí alveolární kosti a někdy i ztrátou zubů. Prevalence chronické parodontitidy se zvyšuje s věkem a onemocnění se obvykle stává klinicky významným pouze u dospělých (Journal of Proteomics, 2020) .

Kromě mikrobiálního poškození existuje několik rizikových faktorů spojených s chronickou parodontitidou. Náchylnost zahrnuje zejména genetické faktory, faktory životního stylu, jako například kouření a onemocnění jako obezita, diabetes mellitus, osteoporóza (Majumder, 2019).

Pro chronickou parodontitidu je typické vysoké množství mikrobiálních depozit a tvorba zubního kamene. Mezi mikroorganismy, které často převládají v subgingiválním sulku u pacientů s chronickou parodontitidou, patří hlavně gramnegativní anaerobní bakterie, které spolupracují na parodontálním ničení. Z nich byly jako červený komplex označeny

Porphyromonas gingivalis, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola*. Ale přítomnost patogenních bakterií nemusí nutně vést k paradontitidě. K patogenezi periodontálního onemocnění přispívají také aspekty jako je prostředí a genetické faktory (Wang, 2019).

Klinická diagnostika chronického onemocnění parodontu je založena na vizuálním a rentgenovém hodnocení parodontálních tkání a na měření prostoru mezi zubem a dásní. Ale klinická kritéria však nestačí pro určení míst aktivního onemocnění, a proto je nutné stanovit účinné markery indikující progresi paradontitidy (Morozumi, 2016).

1.6.2 Agresivní paradontitida

Agresivní paradontitida se často vyskytuje u lidí mladších 35 let, ale může postihnout i starší pacienty. Toto onemocnění postupuje velmi rychle a vede k destrukci tkáně parodontu. Ústní hygiena u pacientů s agresivní paradontitidou je dostatečná, s malým množstvím zubního plaku a není úměrná závažnosti onemocnění (Carvalho, 2018).

Agresivní paradontitida patří do multifaktoriálních onemocnění a může být způsobena mnoha faktory. Mezi parodontální patogeny hlavně patří bakterie *Actinomyces actinomycetemcomitans*. Dalšími faktory k výskytu, závažnosti a progresi onemocnění přispívají také genetické faktory, faktory životního stylu a prostředí (Rusyanti, 2019).

Podle průběhu onemocnění rozlišujeme lokalizovanou a generalizovanou formu, které se liší klinickými projevy. Lokalizovaná forma agresivní paradontitidy postihuje většinou trvalý chrup a obvykle zahrnuje stoličky a řezáky. Mezitím generalizovaná forma agresivní paradontitidy postihuje všechny zuby (Neville, 2019).

Hlavním kritériem pro diagnostiku agresivní paradontitidy je rychlá destrukce parodontu.

1.6.3 Projev paradontitidy jako celkového onemocnění

Parodontitida jako projev systémového onemocnění může být spojena s hematologickými, genetickými poruchami a některými dalšími onemocněními. Hlavními hematologickými stavy, které mohou mít periodontální projevy jsou získaná neutropenie a leukémie. Do genetických poruch, které mají vliv na onemocnění parodontu jsou zařazeny nemoci spojené s imunologickými poruchami (např. Syndrom Papillon-Lefèvre), nemoci postihující ústní sliznici a gingivální tkáň (např. epidermolysis bullosa), nemoci postihující pojivové tkáň (např. Ehlers-Danlovy syndromy), metabolické a endokrinní poruchy (např. hypofosfatázie). Mezi další systémové stavy, které jsou spojeny s paradontitidou,

patří cukrovka, zánětlivá onemocnění (např. zánětlivé onemocnění střev) a syndrom získaného selhání imunity (HIV) (Jepsen, 2018).

1.7 Nekrotizující onemocnění parodontu – parodontitida a onemocnění gingivy

Nekrotizující onemocnění parodontu se projevuje nekrózou periodontálních tkání a sestává se ze dvou hlavních onemocnění: nekrotizující ulcerózní gingivitida a nekrotizující ulcerózní parodontitida. Nekrotizující gingivitida je mikrobiální infekce dásně, která se klinicky projevuje nekrózou a krvácením z dásní, bolestí a zápachem z úst. Nekrotizující parodontitida je určena destrukcí periodontální tkáně a úbytkem kostní hmoty (Zia, 2015).

Existuje několik predisponujících faktorů, které vedou k vývoji nekrotizujících onemocnění parodontu. Do nejvýznamnějších faktorů patří psychický stres, kouření a nedostatek výživy. Léčba nekrotizující gingivitidy a parodontitidy spočívá ve snížení akutního zánětu odstraněním nekrotické tkáně a snížení bakteriální zátěže (Siddiqui, 2020).

1.8 Abscesy parodontu

Parodontální absces je lokalizovaná infekce, která může být způsobena nahromaděním bakterií zubního plaku nebo cizím tělesem v dásňovém žlábků. Parodontální abscesy se mohou vyskytovat na dříve zdravých místech, po chirurgické nebo nechirurgické parodontální terapii, a také se mohou vyskytnout v souvislosti s terapií zubními implantáty (Tomita, 2017).

Diagnostika parodontálního abscesu se stanovuje na základě komplexního hodnocení pacienta, včetně systémových, periodontálních, mikrobiologických a rentgenových vyšetření. Podle mikrobiologického vyšetření u periodontálních abscesů se uvádí, že převládají gramnegativní tyčinky. Také s abscesem je spojena celá řada klinických příznaků, jako jsou bolest, otok dásní a citlivost zubu na pohmat (Herrera, 2018).

Léčba parodontálního abscesu je založena na sledování akutního stavu za účelem zmírnění příznaků, zastavení destrukce tkáně a zvládnutí již existující léze u pacientů s parodontitidou (Tomita, 2017).

1.9 Parodontitida spojená s endodontickými lézemi

Existuje vztah mezi endodontickými a periodontálními strukturami, který podporuje šíření infekce a vede k projevům lézí. Tato léze se klinicky projevuje akutními příznaky zánětu a bolestí, ale často mohou zůstat bez příznaků po dlouhou dobu. Endo-periové léze jsou

charakterizovány jako zapojení pulpy a parodontálního onemocnění do stejného zubu (Oktawati, 2020).

Kombinované léze mají složitější mikroflóru, a proto léčba je náročnější a vyžaduje komplexní terapii jak endodontickou, tak parodontální, protože infekce parodontální tkáně může ovlivnit výsledek endodontické léčby (Tewari, 2018).

1.10 Vývojové a získané porušení a stavy

Do vývojových a získaných deformit hlavně patří mukogingivální deformity, okluzní trauma, lokální faktory, včetně zubních protéz.

Mukogingivální deformity jsou charakterizovány jako nedostatek zrohovatělé tkáně a recese dásní, které postihují velký počet pacientů staršího věku. Recese dásní je definována jako apikální posun gingiválního okraje, který je způsoben různými podmínkami a patologií spojenou se ztrátou upevnění zubu (Cortellini, 2018).

Okluzní traumata jsou poranění, která vedou ke změnám v parodontu v důsledku okluzní síly. Okluzní traumata se dělí na primární a sekundární. Primární okluzní trauma je definováno jako poranění, které vede ke změnám ve zdravém parodontu. Sekundární trauma vede ke změnám tkáně v důsledku okluzních sil působících na zub nebo zuby v patogenním parodontu (Fan, 2018).

2 Hlavní patogenní bakterie dutiny ústní

2.1 *Treponema denticola*

Treponema denticola je gramnegativní, pohyblivá, anaerobní bakterie ve tvaru spirochety (Chan et al. 1993). Patří do domény *Bacteria*, kmene *Spirochaetes*, třídy *Spirochaetes*, řádu *Spirochaetales*, čeledi *Treponemataceae*, rodu *Treponema*, druhu *Treponema denticola*. *Treponema denticola* je hlavním patogenem u parodontálních onemocnění a je často izolovaná u pacientů s chronickou parodontitidou (Tanno-Nakanishi, 2018).

Vzorky bakterie rodu *Treponema denticola* jsou nejlépe pozorovatelné ve tmavém poli nebo v mikroskopu s fázovým kontrastem. Buňky jsou gramnegativní, a proto se barví červeně, měří 0,1–0,4 μm \times 5–20 μm a tvoří spirálovou tyč, která může vypadat jako pravidelná nebo nepravidelná. Buňky mají jeden nebo více axiálních bičků uložených do plazmatické membrány. Vnější membrána buněk je tvořena lipidy, což jsou především fosfolipidy a glykolipidy, proteiny a sacharidy. Buněčná stěna obsahuje kyselinu muramovou, glukosamin a ornithin. V klinických vzorcích lze pozorovat velké, střední a malé spirochety (Zhou, 2015).



Obrázek 2 — Vzorek plaku, buňky *Treponema denticola*
(Zhou, 2015)

Treponema denticola (TD) se kultivuje při 37°C za anaerobních podmínek (H₂: 10 %, CO₂: 10 %, N₂: 80 %) na TGVS (trypton – kvasinkový extrakt – želatina – mastné kyseliny – sérum) mediu (Asai, 2018). Vzorky TD se izolují z dutiny ústní. Izolace a kultivace druhu probíhá náročně. Vykazují negativní katalazový, oxidazový a ureázový test.

2.2 *Tannerella forsythia*

Tannerella forsythia corrig. (Tanner et al. 1986, Sakamoto et al. 2002) je gramnegativní, nepohyblivá, anaerobní bakterie, která patří k parodontálním patogenům v dutině ústní a může způsobit gingivitidu a vést k parodontálnímu onemocnění. Přítomnost *T. forsythia* je spojena se zvýšeným rizikem parodontitidy (Malinowski, 2019). *Tannerella forsythia* patří do domény *Bakteria*, kmene *Bacteroidetes*, třídy *Bacteroidia*, řady *Bacteroidales*, čeledi *Tannerellaceae*, rodu *Tannerella*, druhu *Tannerella forsythia*.

Vzorky *Tannerella forsythia* se odebírají z parodontálních lézí v dutině ústní, je náročná na odběr a kultivaci. Bakterie se pěstuje anaerobně (85 % N₂, 5 % CO₂ a 10 % H₂) při 37 °C na tryptonovém agaru v anaerobní komoře (Jochebed, 2020).

Buňky *Tannerella forsythia* jsou nepohyblivé a mají vláknitý charakter. Kmeny *T. forsynia* lze identifikovat na základě pozitivní aktivity α -glukosidázy, β -glukosidázy, neutrominidázy, negativní aktivity indolu a katalázy. Také na základě morfologie kolonií a morfologie barvení podle Grama obvykle z média krevního agaru s deficitem MurNAc (kyselina N-acetylmuramová), bakterie také hydrolyzuje esculin. Konečnými produkty fermentace jsou kyselina octová, kyselina máselná, kyselina isovalerová, kyselina propionová a kyselina fenylactová; také může být tvořena kyselina isomáselná a kyselina jantarová (Bloch, 2019). Kolonie bakterie jsou bledé skvrnitě růžové a okrouhlé.



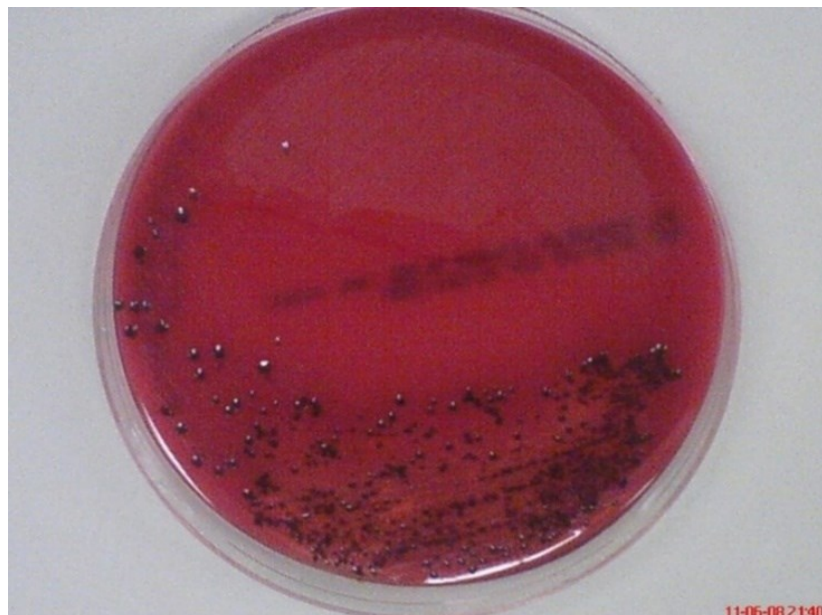
Obrázek 3 — Kolonie *Tannerella forsythia* na krevním agaru (Reimer, 2022)

2.3 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (Coykendall et al. 1980 Shah and Collins 1988) je anaerobní, gramnegativní, asacharolytická, nepohyblivá tyčinka. Patří mezi hlavní parodontální patogeny. Tato bakterie byla nalezena v 85,75 % vzorků subgingiválního plaku u pacientů s chronickou parodontitidou (How, 2016). Svou metabolickou energii buňky *P.gingivalis* získávají fermentací aminokyselin, což je podmínkou pro přežití v hlubokých periodontálních kapsách, kde se cukry nacházejí jenom v malém množství. *Porphyromonas gingivalis* patří do domény *Bakterie*, kmene *Bacteroidetes*, třídy *Bakteroidie*, řady *Bacteroidales*, čeledi *Porphyromonadaceae*, rodu *Porphyromonas*, druhu *Porphyromonas gingivalis*.

Vzorek této bakterie se odebírá z periodontálních kapes po odstranění supragingiválního plaku ze zubů. Bakterie se pěstuje na krevním agaru za anaerobních podmínek při teplotě 37°C za přítomnosti hemu a vitamínu K v živném prostředí. *Porphyromonas gingivalis* na krevním agaru vytváří černě pigmentované, hladké a lesklé kolonie po 6 až 10 dnech, které vykazují β-hemolýzu (Khalaf, 2017). Černá pigmentace *P.gingivalis* je výsledkem akumulace pigmentu obsahujícího hem, vytvořeného proteolytickým štěpením hemoglobinu.

Buňky *P.gingivalis* lze identifikovat na základě Gramova barvení, negativních výsledků na katalázový, mannitolový a ureázový test a pozitivního výsledku na indolový test a alkalickou fosfatázu.



Obrázek 4— *Porphyromonas gingivalis* na krevním agaru s koňskou krví (How, 2016)

2.4 *Actinomyces actinomycetemcomitans*

Actinomyces actinomycetemcomitans (Klinger, 1912, Topley and Wilson 1929) je gramnegativní, fakultativně anaerobní kokobacil. Hlavním místem kolonizace tohoto druhu je subgingivální plak. Bakterie *Actinomyces actinomycetemcomitans* je detekovaná u pacientů s agresivní parodontitidou a je považovaná za důležitý patogen. *Actinomyces actinomycetemcomitans* patří do domény *Bakterie*, kmene *Proteobacteria*, třídy *Gammaproteobacteria*, řady *Pasteurellales*, čeledi *Pasteurellaceae*, rodu *Aggregatibacter*, druhu *Actinomycetemcomitans*.

Actinomyces actinomycetemcomitans se kultivuje za teploty 37°C a dobře roste v mikroaerofilním prostředí s obsahem 5-10 % CO₂. Pro kultivace je vhodný krevní, čokoládový agar a BHI médium. Kultivace je náročná a pomalá. Malé kolonie se vytváří až po 7 dnech inkubace.

Actinomyces actinomycetemcomitans vykazuje pozitivní výsledky na katalázový a oxidázový test, nehydrolyzuje eskulin a neprodukuje H₂S a indol. Buňky také fermentují fruktózu, glukózu, maltózu a manózu a nefermentují sacharózu, trehalózu, laktózu, rafinózu a arabinózu (Zhou, 2015).



Obrázek 5 — Kolonie *Actinomyces actinomycetemcomitans* (krevní agar)
(Zhou, 2015)

3 Faktory virulence

3.1 Faktory virulence *Treponema denticola*

Treponema denticola je silný parodontální patogen, který spolu s *Porphyromonas gingivalis* a *Tannerella forsythia* tvoří červený komplex a má mnoho faktorů virulence. *Treponema denticola* je pomalu rostoucí a náročná vysoce invazivní obligátně anaerobní bakterie, což ztěžuje její kultivaci a manipulaci v laboratoři. Tento mikroorganismus kolonizuje dásně ve štěrbině a množí se pomocí složek gingivální štěrbinové tekutiny jako zdroje energie. Potenciální faktory virulence tohoto mikroorganismu zahrnují faktory adherence, motilitu, únikové mechanismy obrany hostitele a cytotoxické faktory pro tkáň hostitele. Hlavní protein vnějšího pláště *T. denticola* je oligomerní protein spojený s vnější membránou, který se váže na fibronectin a má cytotoxickou aktivitu, tvoří póry a narušuje intracelulární regulační dráhy (Godovikova, 2019).

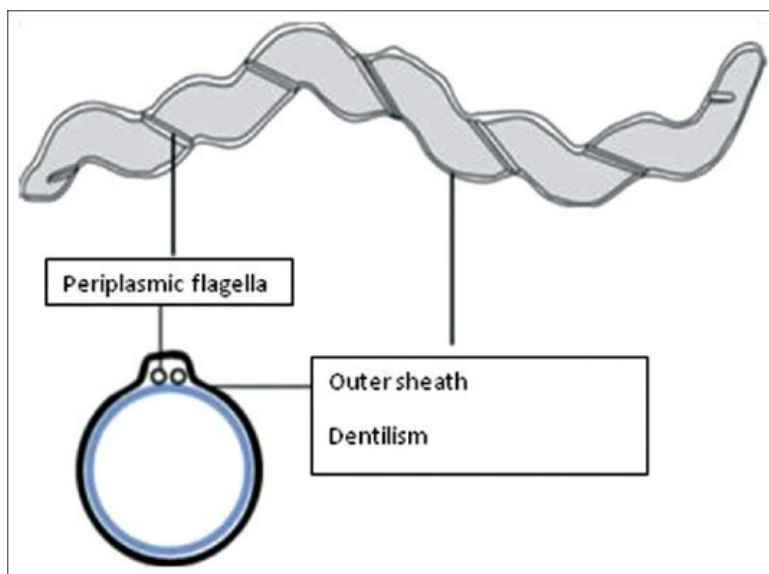
Vnější membrána *T. denticola* nemá typický lipopolysacharid, ale obsahuje lipooligosacharidy. Lipooligosacharid *T. denticola* aktivuje diferenciaci osteoklastů prostřednictvím změn v rovnováze mezi aktivátorem receptoru nukleárního faktoru kappaB a osteoprotegerinem. Protože se také uvádí, že tento mikroorganismus indukuje interleukin-1 β , interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor- α , mohou tyto cytokiny přispívat k resorpci kostí.

Dalšími faktory virulence jsou ortholog oligopeptidové transportní jednotky (OppA) a vazebné proteiny a proteinu-1 podobné faktory H. Ortholog oligopeptidové transportní jednotky jsou proteiny, které se vážou na fibronectin a plazminogen v subgingiválním prostředí, ale neváží se na imobilizované substráty ani na epitelální buňky, což naznačuje, že tento protein se neúčastní přímé adherence k receptorům vázaným na buňky. Protein-1 podobný faktoru H je odvozen z messengerové RNA faktoru H a podílí se na regulaci produkce C3b směrem dolů. Adherence mikroorganismů k těmto proteinům usnadňuje únik z alternativních kaskád komplementu a hraje roli v adherenci a invazi do hostitelské buňky (Pandit, 2016).

Také jedním z klíčových faktorů virulence *Treponema denticola* je buněčná povrchově vázaná proteináza známá také jako dentilisin, která má celou řadu funkcí. Dentilisin je hlavní povrchová proteáza, která má širokou substrátovou specificitu a může přispívat k invazi do tkání a lýze hostitelských buněk. Mezi proteiny, které jsou degradovány dentilisinem, patří IgA (imunoglobulin A), IgG (imunoglobulin G), fibrinogen, transferin, peptidy, inhibitor α 1-proteinázy, sérový albumin, kasein, fibronectin, laminin, kolagen typu IV a želatina.

Kolagen typu I není enzymem degradován. Dentilisin byl lokalizován na vnější membráně organismu pomocí imunogoldové elektronové mikroskopie a může fungovat při invazi spirochét do tkání. *Treponema denticola* má několik cytopatických účinků na epitelální buňky jako je ztráta buněčných kontaktů, degradace pericelulárního fibronektinu, cytoskeletální kolaps, tvorba povrchových skvrn a intracelulárních vakuol a buněčná smrt. Ve výše zmíněných dějích hraje také roli dentilisin. *Treponema denticola* je schopna uvolňovat proteiny ve formě membránových vezikul, které pronikají do epitelálních buněk. Povrchový komplex *T. denticola* obsahující dentilisin je také schopen indukovat produkci tumor nekrotizujícího faktoru α , interleukin-1 β , interleukin-6 a matrix metaloproteinázy-9 primárními lidskými monocyty z periferní krve (Uitto, 2013).

Pohyblivost a chemotaxe, jako je tvorba biofilmu a mezidruhová spolupráce, nejsou považovány za klasické faktory virulence bakterií, ale v případě *T. denticola* a jeho role v progresi onemocnění jsou nezbytné pro virulenci bakterie. Pohyblivost *T. denticola* je závislá na genech kódujících periplazmatické bičíky a chemotaxi. Bičíkové vlákno *T. denticola* je tvořeno třemi jádrovými proteiny vlákna (FlaB1, FlaB2 a FlaB3) a třemi proteiny vnější vrstvy vlákna (FlaA1, FlaA2 a FlaA3). Každá buňka běžně má čtyři periplazmatické bičíky, které jsou zakotvené na každém konci buňky a překrývají se uprostřed buňky. Schopnost *T. denticola* pohybovat se ve vysoce viskózních prostředích může být prospěšná i pro jeho pohyb polymikrobiálními biofilmy. Spolu s přítomností chemotaxního systému, který umožňuje pohyb a reakci na podněty prostředí, může *T. denticola* vytvářet póry v biofilmu, což umožňuje lepší pronikání živin a odstraňování odpadu (Ng, 2019).



Obrázek 6 — Struktura bakterie *Treponema denticola* (Mohanty, 2019)

Hlavní faktory virulence *T. denticola*, které hrají důležitou roli v rozvinutí chronické parodontitidy jsou jeho motilita a chemotaxe. Tyto vlastnosti umožňují rychlou kolonizaci a pronikání do parodontálních kapes a epiteliálních vrstev. A taky schopnost bakterie interagovat s jinými parodontálními patogeny na několika úrovních a produkovat cytotoxické metabolity.

3.2 Faktory virulence *Tannerella forsythia*

Prostřednictvím exprese faktorů virulence jsou parodontální patogeny schopny kolonizovat, přetrvávat v hostiteli a podporovat destrukci tkání dásní. *Tannerella forsythia* má několik faktorů virulence, a to jsou S-vrstva bakterií, glykoprotein vnější membrány BspA, povrchové lipoproteiny, karilysin, proteiny podobné trypsinu a PrtH, sialidázy a NanH, fukosidáza, glykosidázy, methylglyoxal a lipopolysacharid.

Tannerella forsythia je typická gramnegativní bakterie, která má buněčný obal sestávající z cytoplazmatické membrány, periplazmy a vnější membrány, která obsahuje lipopolysacharid hrubého typu. Kromě toho vnější membrána bakterie je zcela pokryta unikátním povrchem S-vrstvy. S-vrstva obsahuje dva glykosylované proteiny TfsA a TfsB a je přítomna jako nejvzdálenější buněčná obalová vrstva. S-vrstva poskytuje bakteriím ochranný povlak s vlastnostmi molekulárního síta a obecně funguje při udržování bakteriální integrity, projevu bakteriálních složek a interakci s hostitelskými neimunitními a imunitními buňkami (Bloch, 2019).

Bacteroides surface protein A (BspA) je povrchový protein, který obsahuje ve struktuře aminokyselinu leucin. Tento protein zprostředkovává adhezi a invazi *T. forsythia* do hostitelských buněk a také hraje roli ve vazbě bakterií na hostitelský fibronectin a srážecí faktor a také indukuje prozánětlivé cytokiny a chemokiny prostřednictvím Toll-like receptoru 2 (TLR2) (Mahalakshmi, 2018).

Bakteriální povrchové lipoproteiny jsou zásadní pro růst bakterií v hostitelském organismu. Povrchové lipoproteiny *T. forsythia* aktivují hostitelské buňky k uvolňování prozánětlivých cytokinů, indukují buněčnou apoptózu a taky stimulují lidské gingivální fibroblasty a monocytické buňky k uvolňování interleukinu-6 a faktoru nekrózy nádoru alfa.

Tannerella forsythia je asacharolytická bakterie, a proto není schopna štěpit sacharidy na energii. K růstu a získávání energie potřebuje peptidy, které jsou štěpeny proteázami podobnými trypsinu a cysteinu PrtH. Proteáza podobná trypsinu se podílí na degradaci menších peptidů a nehraje velkou roli jako faktor virulence. PrtH proteáza má schopnost štěpit větší

proteinové substráty. PrtH má cytopatickou aktivitu, která zastavuje buňky ve fázi G2. Ovlivňuje sníženou adhezenci parodontálních buněk a také ovlivňuje imunitní systém a stimulaci zánětu. Také bakterie exprimuje řadu glykosidáz jako jsou sialidázy, a-glukosidázy, b-glukosidázy, fukosidázy, arabinosidázy, glukosaminidázy, galaktosidázy a mannosidázy, které jsou schopné zpracovávat koncové glykosidické vazby komplexních oligosacharidů a proteoglykanů parodontu. Tato degradace vytváří skupinu přístupných cukrů pro příjem a výživu ústních bakterií a ovlivňuje funkční integritu parodontu (Sharma, 2010).

Další známá proteáza *T. forsythia* je karilysin. Karilysin se zpracovává do kratších forem, což vede k tvorbě zralého enzymu Kly18. Tato modifikace je doprovázena velkým zvýšením proteolytické aktivity. Karilysin degraduje kasein, želatinu, fibrinogen a fibronektin a vykazuje škodlivý účinek na imunitní odpověď hostitele během bakteriální infekce (Ksiazek, 2015).

T. forsythia je gramnegativní orální patogen, pro který je kyselina sialová klíčovým růstovým faktorem, který může být zásadní pro jeho fyziologii *in vivo*. Pochopení biologie orálních patogenů a jejich faktorů virulence je předpokladem pro udržení obecného i dentálního zdraví. Zejména faktory, které jsou spojeny s obalem bakteriálních buněk a jsou vystaveny prostředí, jsou hlavními kandidáty na zprostředkování virulence prostřednictvím jejich přímého zapojení do interakcí patogen-hostitel.

3.3 Faktory virulence *Porphyromonas gingivalis*

Indukce a progresse destrukce parodontálních tkání jsou složité procesy zahrnující akumulaci plaků, uvolňování bakteriálních látek a zánětlivou reakci hostitele. Je známo, že *Porphyromonas gingivalis* produkuje řadu faktorů virulence, které by mohly proniknout do dásní a způsobit destrukci tkáně a indukovat zánět. Schopnost organismu kolonizovat a vyhýbat se antibakteriálním obranným mechanismům hostitele, stejně jako schopnost produkovat látky, které by mohly zahájit destrukci tkáně, jsou nedílnou součástí úspěšného patogenu. Hlavní faktory virulence *P.gingivalis* jsou enzymy, kapsule, lipopolysacharid, fimbrie, exopolysacharid, proteiny vnější membrány, kolagenáza, proteáza podobná trypsinu, želatináza a aminopeptidáza. Pokud jsou tyto faktory virulence aktivní u vnímavého hostitele, mohou mít za následek rychlou a významnou destrukci periodontálních tkání, resorpci kostí, indukci odpovědi hostitele produkcí cytokinů a inhibici ochranných mechanismů hostitele (How, 2016).

Lipopolysacharid *P.gingivalis* je klíčovým faktorem při rozvoji parodontitidy. Gingivální fibroblasty, které jsou hlavními složkami gingivální pojivové tkáně, mohou přímo interagovat

s *P.gingivalis* a jeho bakteriálními produkty, včetně lipopolysacharidů v parodontálních lézích. Lipopolysacharid (LPS) je bakteriální endotoxin složený z lipidu A, jádrového oligosacharidu a O-specifického polysacharidu, který má řadu biologických aktivit a hraje silnou patogenní roli v periodontálních tkáních. Lipid A je základem pro imunologickou aktivitu LPS. Lipopolysacharid se uvolňuje po lýze bakterií nebo jako volné vezikuly ven z vnějších membrán bakterií. Tyto vezikuly obsahující LPS, které fungují jako „mikrokuličky“ přistávají na hostiteli, udržují invazivitu *P.gingivalis* a dávají jí schopnost ničit periodontální tkáň a vyvolávat záněty (Jia, 2019).

Aby se mikroorganismy usadily v ústní dutině, musí nejprve přilnout k zubům a na povrchu sliznic. Adheze je nezbytná pro zajištění odolnosti proti toku slin. Adherence je obvykle zprostředkována adhesiny na povrchu bakterií. Adhesiny se mohou objevovat jako součást buněčné stěny nebo být spojeny s buněčnými strukturami, jako jsou pouzdro nebo fimbrie. Pouzdro zvyšuje odolnost proti fagocytóze, sérovou rezistencí a podílí se na porušení gingiválních epitelálních buněk. Také bylo zjištěno, že pouzdro může případně interagovat s povrchovým proteinem, aby usnadnil připojení k hostitelským buňkám. Fimbrie jsou tenké, bílkovinné povrchové útvary o délce 3–25 μm, které vyčnívají z vnější membrány bakteriální buňky. *Porphyromonas gingivalis* má na svém buněčném povrchu dvě odlišné fimbrie: jedna se skládá z podjednotkového proteinu (*FimA* nebo fimbrillin) a je označena jako hlavní fimbrie, druhá se skládá z podjednotkového proteinu *Mfa* a označuje se jako krátká fimbrie. Tyto fimbrie jsou antigenně odlišné a liší se ve svém složení aminokyselin. Zásadní roli fimbrií spočívá ve vazbě i invazi hostitelských buněk a také v adherenci k široké škále orálních substrátů a molekul (Mysak, 2014).

Schopnost *P. gingivalis* vylučovat řadu hydrolytických, proteolytických a lipolytických enzymů spolu s toxickými metabolity je jednou z charakteristik virulence, která umožňuje těmto bakteriím prospívat v ústní dutině. Existují dvě skupiny proteáz produkovaných *P.gingivalis*. Jednou z nich je cysteinová proteináza také známá jako „trypsinu podobná“ a druhá je serinová proteináza. Gingipainy patří do rodiny cysteinových proteáz a existují ve vnějších membránách, vezikulách a extracelulárních strukturách, jsou důležitými faktory virulence, které mají zásadní funkci zprostředkování interakce mezi bakterií *P.gingivalis* a hostitelem. Gingipainy lze rozdělit do dvou kategorií: gingipain závislý na argininu R (Rgp) a gingipain závislý na lysinu K (Kgp). Aktivita gingipainové proteázy ovlivňuje složení multimikrobiálního biofilmu kvantitativně i kvalitativně. Gingipainy také fungují jako ligandy při koagregaci *P. gingivalis* s *T. denticola* a jinými orálními bakteriemi.

Na základě proteolytického působení gingipainů *P.gingivalis* štěpí nebo degraduje řadu hostitelských proteinů, aby unikly imunitní obraně, včetně imunomodulačních proteinů, regulačních proteinů signální dráhy a adhezivních molekul a také degraduje fibrinogen a hostitelské hemové proteiny, které přispívají k inhibici srážení krve a zvyšují krvácení, čímž zvyšují dostupnost heminu pro růst bakterií (Jia, 2019).

Porphyromonas gingivalis je hlavním patogenem chronické parodontitidy. Bakterie může ničit periodontální tkáň vylučováním toxických faktorů, jako je LPS, gingipainy a pili, a tyto důležité faktory virulence mohou aktivovat širokou škálu hostitelských imunitních buněk v periodontálních tkáních, což vyvolává lokální imunitní odpověď a umožňuje obranným buňkám uvolňovat zánětlivé mediátory a vedoucí k sekundárnímu poškození parodontální tkáň.

3.4 Faktory virulence *Actinomyces actinomycetemcomitans*

Actinomyces actinomycetemcomitans je jednou z hlavních příčin onemocnění parodontu u mladistvých a dospívajících. Parodontopatogen *Actinomyces actinomycetemcomitans* je gramnegativní bakterie, která kolonizuje dutinu ústní a napadá epiteliální tkáň mechanismy proapoptické virulence a stimuluje expresi prozánětlivých cytokinů. Patologie a etiologie parodontálního onemocnění prokázaly několik faktorů virulence, jako je lipopolysacharid (LPS), fimbrie a enzymy, které mohou vyvolat zánět v tkáních parodontu (Benso, 2016).

Stejně jako ostatní gramnegativní druhy je povrch *A. actinomycetemcomitans* pokryt lipopolysacharidem (LSP). Lipopolysacharid zahrnuje skupinu strukturně příbuzných molekul, ve kterých nejvariabilnější částí je O-specifický polysacharidový řetězec (O-antigen), tvořený oligosacharidovými opakujícími se jednotkami. O-antigen určuje sérotyp kmene. Kmeny *A. actinomycetemcomitans* lze rozdělit do sedmi sérotypů od a do g a nesérotypovatelné, kterým chybí O-antigen. Struktury jádrového oligosacharidu a lipidu A v LPS mají nižší stupeň strukturální volnosti než O-antigenní polysacharidy.

První buňky, se kterými se setkává bakteriální LPS v dutině ústní jsou epiteliální buňky. Lidské epiteliální buňky reagují na LPS expresí IL-15 (interleukin-15), což vede ke zvýšené produkci IFN- γ (interferon- γ), proliferaci T-buněk a způsobuje rozšíření mezibuněčných prostorů v primárních tkáňových kulturách. Kromě toho LPS má přímý účinek na fibroblasty. Kolagen je přijímán a tráven gingiválními fibroblasty ve vyvážených podmínkách zdravé dásně. Lipopolysacharid je schopen zvyšovat fagocytózu kolagenu fibroblasty, což může vést k nerovnováze v regeneraci dásní. Kromě změn buněčných funkcí LPS stimuluje produkci

IL-6 (interleukin-6) a IL-8 (interleukin-8), tkáňového aktivátoru plazminogenu (t-PA) a inhibitoru aktivátoru plazminogenu 2 (PAI-2) lidskými fibroblasty dásní (Belibasakis, 2019).

Leukotoxin (LtxA) je bílkovinný exotoxin, který je popsán jako „klíčový“ faktor virulence díky svým imunopresivním aktivitám a úzkému spojení s onemocněním. Toxin po uvolnění interaguje se specifickými hostitelskými buňkami a vytváří póry v membránách těchto cílových buněk ohromující jejich schopností udržovat osmotickou homeostázu, což vede k buněčné smrti. Leukotoxin aktivuje degranulaci neutrofilů, což způsobuje masivní uvolňování lysozomálních enzymů, síťových struktur a matrixových metaloproteináz (MMP) a indukuje apoptózu v lymfocytech (Krueger, 2020).

Cytolethal distending toxin (CDT) je dalším důležitým faktorem virulence *A. actinomycetemcomitans*. Patogenní účinky CDT souvisí s jeho schopností způsobit poškození DNA, zastavit buněčný cyklus, a nakonec vyvolat apoptózu intoxikovaných buněk. Tento toxin obsahuje tři podjednotky: podjednotka B (cdtB) je aktivní toxická podjednotka; podjednotky cdtA a cdtC jsou vazebné podjednotky k cílovým buňkám; zatímco cdtC podporuje dodání podjednotky B do buněk. Škodlivé účinky CDT na buňky imunitního systému naznačují narušení místní imunity, které může ohrozit schopnost parodontu rozpoznat a eliminovat bakteriální výzvu, ať už jde o *A. aktinomycetemcomitans* nebo jiné mikrobiální složky komunity biofilmů (Gholizadeh, 2017).

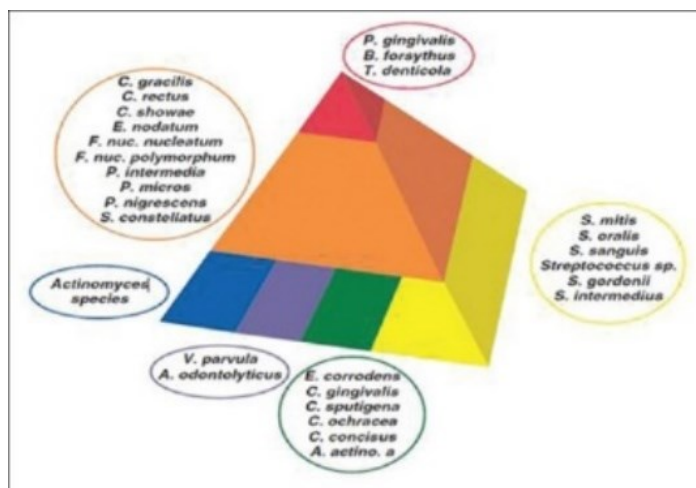
Actinomyces actinomycetemcomitans je bakterie s řadou různých potenciálních charakteristik virulence, včetně mechanismů imunitního úniku, z nichž každá může hrát klíčovou roli v rozvoji periodontálního onemocnění. Rozmanitost virulentních vlastností této bakterie přispívá k patogenitě tohoto druhu, zejména s ohledem na časně a rychle progresivní formy periodontálního onemocnění.

4 Diagnostika

Parodontitida je mikrobiálně řízené pomalu progresivní a destruktivní onemocnění parodontu. Při chronické parodontitidě v dutině ústní se obvykle nachází velké množství zubního plaku a kamene, které odpovídá stupni destrukce tkání parodontu. Na druhé straně, agresivní periodontitida se vyznačuje rychlou progresí onemocnění a absencí jakéhokoli systémového postižení.

Etiologie parodontitidy je polymikrobiální povahy. Diagnóza parodontitidy je obvykle založena na klinickém hodnocení, včetně sondování hloubky kapsy, krvácení při sondování, úrovně klinického přilnutí, periodontálního indexu a gingiválního indexu a radiografických vyšetření. Tato metoda má však omezení v tom, že některé parametry odrážejí pouze minulé důkazy zánětlivých změn a neukazují, že by tato zánětlivá změna v budoucnu progradovala nebo ustoupila. Zhoršení nebo zlepšení stavu parodontu je doprovázeno posunem v bakteriálním složení subgingiválního plaku, proto jako diagnostické markery se používá řada předpokládaných bakteriálních patogenů.

Bylo provedeno mnoho studií s cílem vyhodnotit složení subgingiválního biofilmu a identifikovat klíčové parodontální patogeny jak kultivačními, tak molekulárními metodami. V dutině ústní bylo identifikováno více než 700 různých druhů, ale z těchto druhů je pouze malý počet periodontálních patogenů, jako je bakterie druhů *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* a *Treponema denticola*. Tato skupina bakterií, charakterizovaná jako „červený komplex“, je spojena s destrukcí periodontální tkáně. Agresivní parodontitida je často spojena s *Actinomyces actinomycetemcomitans*. Zejména lokalizovaná agresivní parodontitida je charakterizována specifickou infekcí *A. actinomycetemcomitans*, zatímco chronická parodontitida je spíše smíšená bakteriální infekce, která není spojena s žádným konkrétním mikroorganismem (Riep, 2009).



Obrázek 7 — Diagram ukazující vztah mezi subgingiválními druhy. Základna pyramidy se skládá z druhů, které kolonizují povrch zubů a množí se v rané fázi parodontitidy (Mohanty, 2019)

4.1 Diagnostika červeného komplexu

Bakterie *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* a *Tannerella forsythia* vytvářejí „červený komplex“, který je spojen s progresí chronické parodontitidy. Bakterie patřící do červeného komplexu byly ve vysokém počtu nalezeny i v místech s hlubšími kapsami nebo pokročilejšími lézemi. Ve 4 až 6 mm kapsách byla *T. denticola* detekována na povrchové vrstvě plaku, buňky *P. gingivalis* byly detekovány ve vrstvě pod ním. V hlubších kapsách tyto druhy koexistovaly ve velkých počtech. Bylo prokázáno, že tato trojice produkuje proteolytické enzymy. Ty se prokazují pomocí enzymových testů, což je test „BANA“ a test peptidázy SK013. Pro detekci bakterií se také používají jiné metody jako jsou: kultivační technika, mikroskopické hodnocení, imunologické metody a metody založené na hybridizaci DNA. Ale některé z výše uvedených metod jsou semikvantitativní, drahé a časově náročné. V současné době je multiplexní polymerázová řetězová reakce (PCR) nejvíce využívaná, protože má schopnost detekovat několik cílových sekvencí DNA současně a disponuje vysoce výkonnou kvantifikací s menším množstvím vzorku a vstupního materiálu (Mohanty, 2019).

4.1.1 Kultivační technika

Vzorky subgingiválního plaku pro mikrobiologické vyšetření se odebírají pomocí sterilních papírových špiček. Pro kultivaci vzorků se používají další anaerobní kultivační media:

1. Schaedlerův agar se 100 mg/l kanamycinu, 7,5 mg/l vankomycinu a 5 % ovčí krve
2. Columbia Colistin a nalidixová kyselina. Agar s 5 % ovčí krve, 10 mg/l kolistinu a 10 mg/l kyseliny nalidixové
3. Neselektivní médium pro anaeroby, vhodné také pro růst *T. forsythia*. Toto médium obsahuje krevní agar s heminem a vitamínem K a je doplněn kvasnicovým extraktem, pyruvátem sodným a N-acetylmuramovou kyselinou.

Vzorky bakterií se nanáší na kultivační media a jsou inkubovány za anaerobních podmínek při 37 °C po dobu až 10 dnů. Po inkubaci jsou anaerobní bakterie identifikovány na základě indolového testu, Gramova barvení, popisu morfologie kolonií a testu na katalázu (Kotsilkov, 2015).

Treponema denticola je anaerobní bakterie, kterou po kultivaci lze diagnostikovat na základě morfologie jejích kolonií. Kolonie jsou bílé, mají kulatý tvar a je viditelná hemolýza na krevním agaru. Dále se identifikuje pomocí pozitivního indolového testu a negativního testu na katalázu. *T. denticola* je gramnegativní bakterie, po provedení Gramova barvení jsou bakterie červené. *Tannerella forsythia* je anaerobní gramnegativní bakterie, která po kultivaci má bledě růžové kolonie, test na indol je negativní. *Porphyromonas gingivalis* identifikujeme po kultivaci na základě pozitivního testu na indol a negativního testu na katalázu. Je to gramnegativní bakterie, proto po provedení Gramova barvení můžeme pozorovat červeně zbarvené bakterie. Kolonie jsou černé, hladké a lesklé, na krevním agaru vykazují β -hemolýzu.

Je důležité říct, že kultivace bakterií červeného komplexu je velmi obtížná, časově náročná, a ne vždy účinná. V moderních diagnostických metodách pro detekci bakterií červeného komplexu se nejčastěji používá metoda PCR.

4.1.2 Diagnostika pomocí PCR testu

Nejčastěji se při diagnostice bakterií červeného komplexu používá test PCR. Princip polymerázové řetězcové reakce (PCR) je založen na využití DNA polymerázy. DNA polymeráza replikuje určité sekvence DNA *in vitro*. Replikovaná DNA může být genomová DNA nebo komplementární DNA, která je získána z extraktu messengerové RNA

(mRNA). Metoda PCR umožňuje získat velké množství specifické sekvence DNA ze vzorku DNA. Tato amplifikace je založena na replikaci templátu dvouvláknové DNA. Reakce PCR je rozdělena do tří fází: denaturační, hybridizační fáze s primery a elongační fáze. Produkty po každé fázi syntézy slouží jako templát pro následující fáze. Tím postupem je dosaženo exponenciální amplifikace vzorku. Pro provedení PCR se používá reakční směs. Reakční směs obsahuje extrakt DNA (templátová DNA), *Taq* polymerázu, primery a čtyři deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP) v přebytku roztoku pufru. Zkumavky se vzorkem a reakční směsí se umístí do termocykleru, kde se provádí tři teplotní cykly, které se opakují a každý z nich probíhá několik desítek sekund.

Denaturace je oddělení dvou řetězců DNA a probíhá za zvýšené teploty kolem 94°C, která se nazývá denaturační teplota. Během této reakce je dvouvláknová DNA denaturována na jednovláknovou DNA. Druhá fáze je hybridizace. Tato reakce probíhá při teplotě v rozmezí kolem 40°C až 70°C. Hybridizace je charakterizovaná obnovou vodíkových vazeb a vazbou primeru na komplementární oblasti DNA. Fáze elongace probíhá při teplotě kolem 72°C a je charakterizovaná syntézou komplementárního řetězce. *Taq* polymeráza se váže na aktivní místa jednořetězcové DNA. Reakce je katalyzována pomocí dNTP, které jsou přítomné v reakční směsi.

Oligonukleotidy je nezbytné pro amplifikaci DNA. Oligonukleotidy plní funkci primeru a jsou nezbytné pro provedení PCR. Primery se navazují na konci amplifikované oblasti DNA. Jsou syntetizované chemicky a dělají replikaci DNA selektivnější. Ještě jedna nezbytná věc pro provedení PCR je DNA polymeráza, která zajišťuje replikaci. Pro reakce se používá DNA polymeráza (*Taq* polymeráza), která je purifikovaná nebo klonovaná z bakterie *Thermus aquaticus* (Kadri, 2020).

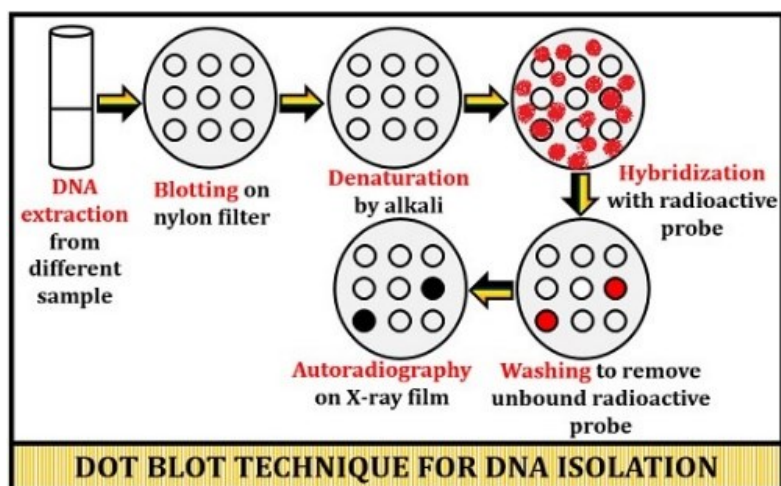
Odebírání vzorků pro diagnostiku se provádí pomocí sterilních papírových špiček z kořenových kanálků. Tyto vzorky pak musí být umístěny do zkumavek, které obsahují pufr Tris-EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) a skladovaný pro následující PCR test nebo vzorek by měl být zpracován okamžitě.

Odečítání výsledků se provádí elektroforézou v 1 % agarózovém gelu. Produktem je jeden nebo více fragmentů DNA. Po elektroforetickém dělení probíhá vizualizace výsledků barvením a ultrafialovým prosvícením (280–320 nm) (Tiwari, 2020).

4.1.3 Metoda dot-blot hybridizace

Dot-blot hybridizace je technika hybridizace nukleové kyseliny při které se komplementární jednovláknové sekvence DNA nebo RNA hybridizují s jednovláknovými sekvencemi DNA nebo RNA testovaných vzorků za vhodných podmínek teploty a koncentrace soli. Metoda je založena na shodnosti mezi řetězci nukleové kyseliny: DNA:DNA, DNA:RNA nebo RNA:RNA. Princip testu spočívá v tom, že sonda, kterou je DNA nebo RNA, je „označena“ reportérovou molekulou. Označená sonda se pak hybridizuje s nukleovou kyselinou, která je izolovaná z testovaného vzorku. A následně vzniká dvouřetězcová hybridní molekula. Vzniklá molekula se poté detekuje pomocí vhodné metody, která závisí na použité reportérové molekule. DNA sondy mohou být značeny pomocí různých metod, například pomocí polymerázové řetězové reakce. RNA sondy jsou značeny pomocí *in vitro* transkripce (Bhat, 2020).

Pro provedení dot-blot hybridizace připravené a denaturované vzorky s amplifikovanou DNA se nanášejí na nylonové membrány. Příprava vzorků se provádí stejně jako při provedení PCR testu. Denaturovaný produkt PCR se nanášejí na membrány a fixuje se UV zářením. Hybridizace se provádí za teploty 55 °C a pak následuje promývání vzorků pufrům, který obsahuje 0,15 M NaCl a 0,015 M citrátu sodného (Riep, 2009).



Obrázek 8 — Identifikace DNA metodou dot-blotting
Zdroj: <https://biologyreader.com/dot-blot-technique.html>
(04.05.2022)

4.1.4 Diagnostika pomocí testu BANA

Treponema denticola, *Porphyromonas gingivalis* a *Tannerella forsythia* jsou gramnegativní anaerobní bakterie, které *in vivo* produkují enzym schopný hydrolyzovat syntetický trypsinový substrát N-benzoyl-DL-arginin-2naftylamid (BANA). V testu BANA se jako substrát používá chromofor, který se zbarví modře při koncentraci alespoň 10^4 buněk *T. denticola*, *P. gingivalis* a/nebo *T. forsythia*.

Princip testu spočívá v tom, že matrice obsahující činidla jsou nalepeny na plastové karty. Spodní matrice je naimpregnovaná BANA. Vzorky subgingiválního plaku se aplikují na spodní matrice. Horní matrice je reagenční a obsahuje chromogenní diazo činidlo (fast black K). Peptidáza, kterou obsahují anaerobní bakterie červeného komplexu, může hydrolyzovat peptidový analog BANA. Horní reagenční matrice, která reaguje s bakteriálním enzymem BANA, reaguje s fast black K za vzniku modrého zbarvení vzorku. Modrá barva pozitivní nebo slabě pozitivní reakce se objevuje v horní matrici a je trvalá. Krev a sliny nehydrolyzují BANA a nereagují s testem, ale krev ve vzorku zabraňuje vzniku modré barvy a ztěžuje čtení výsledku (Dhalla, 2015).



Obrázek 9 — BANA reagenční proužek se vzorkem subgingiválního plaku (Dhalla, 2015)



Obrázek 10 — Inkubace reagenčního proužku po dobu 15 minut při teplotě $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Dhalla, 2015)



Obrázek 11 — Čtení výsledků pomocí diagramu (Dhalla, 2015)

4.2 Diagnostika bakterie *Actinomyces actinomycetemcomitans*

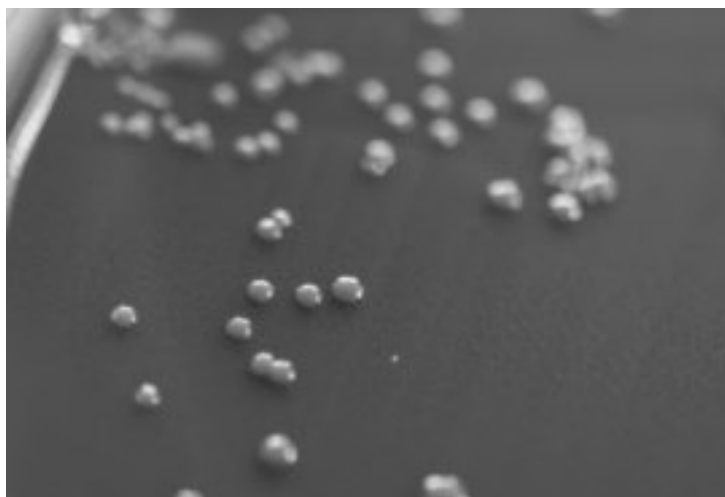
Agresivní parodontitida je rychle postupující onemocnění, které je úzce spjato s bakterií *Actinomyces actinomycetemcomitans* a je typické pro mladé lidi a dospívající na rozdíl od chronické parodontitidy. Počáteční stadium agresivní parodontitidy může vznikat v lokalizované formě, ale postupem času neléčená parodontitida může přecházet do generalizovaných forem. Onemocnění postihuje systémově zdravé děti a dospívající, které často mají nízké hladiny supragingiválního plaku a zánětu, ale hluboké periodontální kapsy a těžkou ztrátu kostní hmoty. Diagnostika agresivní parodontitidy se stanovuje na základě anamnézy, klinického vyšetření a rentgenového vyšetření. Nevýhodou těchto metod je, že tento diagnostický přístup se zaměřuje jenom na historii nemoci a nemůže změřit stav onemocnění a přesně diagnostikovat budoucí ztrátu periodontální tkáně. Určení diagnózy je často těžké a nečasné, ale současné metody hodnocení mohou detekovat onemocnění rychleji a spolehlivěji, když je ztráta tkáně ještě minimální a neviditelná (Albandar, 2014).

4.2.1 Kultivační technika

Vhodná místa pro odběr vzorku bakterie *A. actinomycetemcomitans* jsou periodontální kapsy, sliznice a sliny. Odběr vzorků z periodontálních kapes se provádí pomocí sterilních papírových špiček. Vzorek se odebírá ze sliznic pomocí sterilních vatových tamponů, pro odběr slin se používají žvýkáci parafinové kousky. Pro přepravu vzorků, které jsou odebrané z kapes se obvykle používá médium VMGAI (viability-maintaining microbiostatic medium, anaerobically prepared). Vzorky odebrané pomocí vatových tampónů lze transportovat ve fyziologickém roztoku nebo v TE-pufu (Tris/EDTA pufu). Sliny mohou být transportovány ve zkumavkách bez přísad. Pokud vzorek není zpracován po odběru, může být zmražen nebo skladován při pokojové teplotě ve slinném konzervačním pufu pro uchování struktury DNA.

Pro kultivaci se obvykle používá selektivní médium TSBV (tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin). Ale jenom kvalitativní analýza a detekce bakterie *A. actinomycetemcomitans* v klinických vzorcích poskytuje omezené informace o progresi onemocnění a je nedostatečnou pro plánování léčby. Pro tyto účely je důležitější množství bakterií v postižených oblastech. Celkovou koncentraci bakterií lze spočítat při používání metody paralelní kultivace na 5 % krevních agarových plotnách a vypočítat podíl bakterie *A. actinomycetemcomitans* ve vzorku.

Bakterie *A. actinomycetemcomitans* je možné detekovat po jednom nebo dvou dnech, když se na selektivním agaru objeví perzistentní kolonie s hrubou texturou. Bakterie vykazuje pozitivní reakce na katalázu a negativní na β -galaktosidázu. Také bakterie je snadno identifikována pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Nørskov-Lauritsen, 2019).



Obrázek 12 — Kolonie s drsnou texturou kmene *A. actinomycetemcomitans* na čokoládovém agaru. Průměr kolonií nedosáhl 2 mm po 3 dnech inkubace v 5 % CO₂ (Nørskov-Lauritsen, 2019)

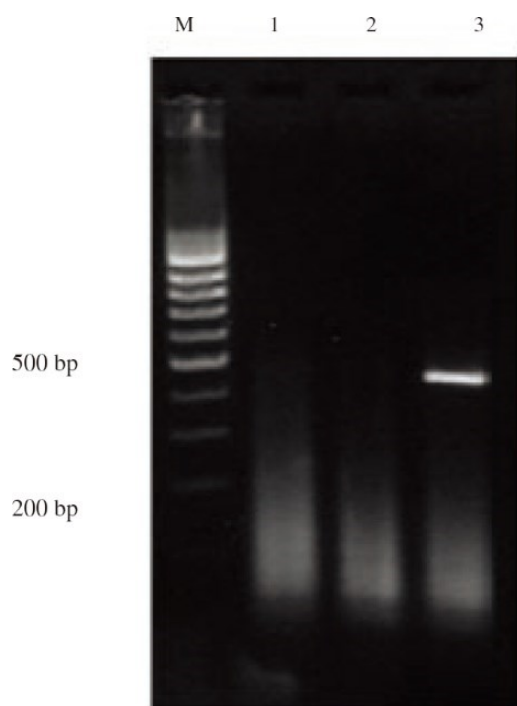
4.2.2 MALDI-TOF

MALDI-TOF je analytická metoda. Princip metody spočívá v tom, že částice jsou ionizované a separované podle jejich poměru hmotnosti k náboji. Pak tyto částice jsou měřeny stanovením doby, kterou ionty potřebují, aby dojit k detektoru. Tato technologie umožňuje identifikaci grampozitivních, gramnegativních, aerobních a anaerobních bakterií. Metoda je také přesnější než tradiční metody pro identifikaci mikroorganismů. Výjimkou jsou druhy nezařazené do databáze a druhy, které jsou si dle své podstaty podobné. Testování vzorků je možné provádět z primární kultury. Příprava vzorku je poměrně jednoduchá. Tato technika testování bakterií pomáhá zkrátit dobu identifikace u většiny bakterií alespoň o jeden den (Feucherolles, 2019).

4.2.3 Diagnostika pomocí PCR testu

Pro identifikaci a charakterizaci bakterie *A. actinomycetemcomitans* v klinických vzorcích se často používá metoda polymerázové řetězcové reakce (PCR) nebo kvantitativní PCR (qPCR). Pomocí real-time PCR neboli kvantitativní PCR (qPCR) přístroj ukazuje prahovou hodnotu cyklování (Cycle Threshold CT), která pomáhá spočítat koncentraci cílové bakterie ve vzorku. Pro zjištění přibližné hodnoty celkového počtu bakterií pomocí qPCR se obvykle používá reakce, která je zaměřená na gen 16S rRNA (Ramez, 2018).

Odebírání vzorku se provádí pomocí papírových špiček z periodontálních kapes. Špičky se umístěny v kapsách na dobu kolem 60 s. PCR se provádí tak, že templátová DNA je přidána do PCR směsi pro provedení reakce. Tepelné zpracování vzorku probíhá několik cyklů po následujících krocích: denaturace, hybridizace a elongace. Reakce se provádí v termocyklkeru. Pak amplifikované vzorky se podrobují elektroforéze na 1,5 % agarózovém gelu po dobu 1 hodiny a vizualizuje se pod ultrafialovým světlem. Kvantitativní PCR se provádí jako klasická PCR, ale pro tuto reakci se používá speciální cykler. Princip reakce je založen na exponenciálním zvýšení počátečního množství DNA během cyklů amplifikace. Během průběhu reakce probíhá monitorování v reálném čase pomocí fluorescenčního substrátu. Fluorescenční substrát se navažuje na DNA. Množství původní cílové sekvence je možné kvantifikovat, když fluorescenční signál dosáhne prahové hodnoty (Kadri, 2020).



Obrázek 13 — Elektroforéza na agarózovém gelu amplifikovaných produktů. Dráha M je marker velikosti DNA. Dráha 1 je negativní kontrola. Dráha 2 je negativní vzorek nevykazující žádnou infekci. Dráha 3 ukazuje 500 bp. *A. aktinomycetemcomitans* (Ramez, 2018)

5 Terapie

Léčba parodontitidy má za cíl zabránění další progresi onemocnění, snížení rizika ztráty zubů, minimalizování příznaků onemocnění a případně obnovení ztracené parodontální tkáně a poskytování pacientovi informace o udržení zdravého parodontu. Terapeutická léčba zahrnuje techniky úpravy chování nemocného, jako jsou: individuálně přizpůsobené pokyny pro ústní hygienu, program odvykání kouření, úprava výživy a výběr vhodné diety, odstraňování plaku a zubního kamene, lokální a systémová farmakoterapie a různé druhy chirurgických zákroků. Všechny výše uvedené metody jsou účinné jenom v tandemu a prakticky všechny mechanické metody léčby jsou vždy doprovázeny antimikrobiální terapií a podání ATB (Graziani, 2017).

5.1 Terapie při chronické parodontitidě

Chronická parodontitida postihuje struktury zubů. Pokud parodontitida nebude diagnostikována a léčena včas, může vest ke ztrátě zubů a zhoršení celkového stavu pacienta, protože je spojeno se systémovými onemocněními. Existuje několik rizikových faktorů, které snižují odolnost vůči onemocnění. Tyto faktory zahrnuje špatnou ústní hygienu, diabetes mellitus a další systémová onemocnění spojené s imunologickou dysfunkcí, kouřením tabáku, věku, pohlaví, genetickou predispozice, socioekonomickým stavem, obezitou a stresem. Cílem terapií je odstranění zánětu potlačením patogenní flóry v parodontálních tkáních a dodržování ústní hygieny ze strany pacienta.

Klasická parodontologická terapie zahrnuje odstranění zubního kamene a leštění kořenů zubů. Tyto metody jsou efektivní pro počáteční léčbu chronické parodontitidy. Ale mají omezení, protože nemohou úplně zničit subgingivální patogeny a zastavit progresivní ztrátu zubů. A proto spolu s klasickou terapií se používají modernější terapeutické přístupy jako jsou použití systémových antibiotik a kompletní dezinfekce dutiny ústní. Po ukončení terapie pacient musí dodržovat podpůrnou péči, která zahrnuje pravidelné plánované kontrolní návštěvy u lékaře a samostatnou pravidelnou hygienu (Osorio, 2012).

5.1.1 Mechanická terapie

Hlavními úkoly parodontologické terapie jsou kontrola a odstranění patogenních bakterií spojených s onemocněním. Toho je možné dosáhnout částečně nebo úplně pomocí nechirurgické parodontální terapie. Základním krokem terapie jsou klinické a radiografické vyšetření. Poté se sestavuje diagram se záznamem periodontálních indexů, který posuzuje

závažnost a rozsah onemocnění. Po vyhodnocení stavu parodontu začíná nechirurgická parodontologická léčba. Tato léčba zahrnuje odstranění zubního kamene a leštění kořenů, předpis vhodné ústní vody, zubní pasty a lokální podání léků v místě infekce. Pravidelná kontrola během nechirurgické periodontální terapie je velmi důležitá. Postižené oblasti, které nereagují na léčbu musí být ošetřeny chirurgickou parodontologickou léčbou (Mehrotra, 2022).



Obrázek 14 — Dezinfekce ústní dutiny: odstranění zubního kamene a leštění kořenů (Osorio, 2012)

5.1.2 Podání antibiotika při léčbě chronické parodontitidy

Jenom nechirurgická terapie při chronické parodontitidě je nedostatečná, protože patogenní bakterie je obtížné odstranit jenom mechanickými metodami. Prvním faktorem obtížnosti odstranění patogenních bakterií je schopnost pronikat do epitelu parodontálních kapes, což chrání bakterie před eliminací. Druhým faktorem je neúčinnost mechanických metod při odstraňování bakterií z hlubokých kapes, dentinových tubulů, furkací a dalších oblastí, které jsou obtížně přístupné. Tyto faktory jsou důvodem zařazení systémových antibiotik do léčby parodontitidy.

K terapii se používá široká škála systémových antibiotik. Obecně se používají amoxicilin, metronidazol, azithromycin, tetracyklin a doxycyklin. Tyto antibiotika jsou schopné účinně inhibovat parodontální patogeny, pokud se vyskytují jako solitérní. Je nutné mít na paměti, že patogenní subgingivální bakterie se vyskytují v podobě biofilmu. Proto antibiotika by měla být používána pouze po narušení biofilmu pomocí odstranění zubního kamene a leštění kořenů.

Farmakokinetické a antimikrobiální vlastnosti nejčastěji používaných léků jsou uvedeny v Tabulka 1. Informace o dávkování jsou uvedeny v Tabulka 2. Zkratkou CGF se označuje gingivální crevikulární tekutina. MIC₉₀ je minimální inhibiční koncentrace antimikrobiální látky, která je potřebná pro inhibici 90% bakterie daného druhu.

Tabulka 1 Charakteristika antibiotik používaných k léčbě chronické parodontitidy (Walters, 2015)

| ATB | P. rozp. v séru (h) | Účinnost | Úroveň GCF (µg/ml) | MIC ₉₀ (µg/ml) <i>P.gingivalis</i> | MIC ₉₀ (µg/ml) <i>T.forsythia</i> | MIC ₉₀ (µg/ml) <i>P.intermedia</i> | MIC ₉₀ (µg/ml) <i>A. actinomycetemcomitans</i> |
|--------------|---------------------|------------------------------------|--------------------|---|--|---|---|
| Metronidazol | 6–12 | baktericidní | 8–10 | <0,016 | 0,005 | 0,032–0,25 | 64–94 |
| Azithromycin | 40–68 | bakteriostatický nebo baktericidní | 3–10 | 0,094–0,5 | 0,5–1 | 0,25–0,4 | 0,875–4 |
| Tetracyklin | 6–8 | bakteriostatický | 5–10 | 0,023–0,025 | 0,19 | 2–4 | 0,2–1,5 |
| Doxycylin | 12–22 | bakteriostatický | 2–8 | 0,047 | 0,38 | 0,05 | 1 |
| Amoxicillin | 1–2 | baktericidní | 3–4 | <0,016 | 0,38 | 0,25–1,5 | 0,4–1 |

Poznámka: P. rozp. v séru – poločas rozpadu v séru

Tabulka 2 Reprezentativní antibiotická terapie pro použití v léčbě chronické parodontitidy (Walters, 2015)

| ATB | Předpis | Vedlejší účinek léku |
|---------------------------|--|---|
| Amoxicilin + Metronidazol | 500 mg třikrát denně po dobu 8 dnů 250 mg třikrát denně po dobu 8 dnů | Hypersenzitivita na amoxicilin, nauzea, průjem, zvracení, změněné chuťové vjemy, antabusový účinek |
| Metronidazol | 500 mg třikrát denně po dobu 7 dnů | Nevolnost, zvracení, změněné chuťové vjemy, antabusový účinek |
| Azithromycin | 500 mg jedenkrát denně po dobu 3 dnů | Průjem, nevolnost, zvracení, bolesti břicha, cholestatická žloutenka, zvýšené riziko závažné srdeční arytmie, inhibice baktericidních činidel, pokud se používají v kombinaci |
| Doxycylin | počáteční dávka 200 mg, pak 100 mg jedenkrát denně po dobu 21 dnů | Fotosenzitivita, nevolnost, průjem, zvracení a bolesti břicha, inhibice baktericidních činidel při použití v kombinaci |

Azithromycin a doxycyklin mají dlouhý poločas rozpadu, a proto se podávají v jedné denní dávce. Azithromycin a tetracyklin jsou aktivně absorbovány uvnitř epitelálních buněk dutiny ústní. Amoxicilin a metronidazol pronikají do buněk pasivní difúzí. Tyto schopnosti ATB mohou být užitečné pro zničení patogenních bakterií v parodontálních kapsách (Walters, 2015).

5.1.3 Hygiena ústní dutiny

Nejdůležitějším faktorem pro uzdravení parodontu je dodržování pravidel ústní hygieny ze strany pacienta. Ústní hygiena hraje zásadní roli v dlouhodobém udržení zdraví parodontu. Měla by být provedena demonstrace technik čištění zubů. Tyto techniky se ukazují jak na modelech, tak i v ústech pacienta s použitím mezizubního kartáčku. Vliv na léčbu také vykazuje program odvykání od kouření.

Pacienti, kteří dodržují všechna hygienická pravidla a pravidelně dochází na kontrolní návštěvy u lékaře, mají míru ztráty zubů dvakrát nižší. Hodnocení kvality ústní hygieny a motivace se provádí při každé návštěvě. Interval mezi návštěvami se stanovuje individuálně na základě rizikových faktorů, rychlosti progresu a závažnosti onemocnění (Shaddox, 2010).

5.2 Terapie při agresivní parodontitidě

Nehledě na to, že chronická a agresivní parodontitida je etymologicky odlišné onemocnění, terapie je do značné míry podobná. Cílem terapie je zachování co největšího počtu zubů na co nejdelší dobu. Léčba se začíná mechanickými manipulacemi v kombinaci s antibiotiky. ATB hrají důležitou roli v léčbě a kontrole stavu agresivní parodontitidy. Po dosažení uspokojivého stavu jsou nutné následné kontrolní návštěvy a regulace chování pacienta, aby minimalizovaly rizikové faktory pro recidivu. Do rizikových faktorů, které ovlivňují progresi onemocnění jsou zařazeny nedostatek pravidelné ústní hygieny, kouření a krvácení dásně a stres (Teughels, 2014).

5.2.1 Mechanická terapie

Cílem nechirurgické parodontologické léčby je snížení zánětu a zmenšení hloubky parodontálních kapes. V prvním kroku se provádí odstranění zubního kamene a leštění kořenů manuálními nebo ultrazvukovými nástroji. Mechanickým ošetřením se odstraňuje větší množství subgingiválního plaku. Ale jenom mechanická manipulace je nedostatečná, protože patogenní bakterie se mohou nacházet v obtížně přístupných místech.

Jednou z dalších možností je jednokroková totální perorální dezinfekce, která zahrnuje kompletní ústní hygienu. Provádí se odstranění zubního kamene a leštění kořenů, čištění jazyka 1% roztokem chlorhexidinu po dobu 1 minuty, výplach úst 0,2% roztokem chlorhexidinu po dobu 2 minut a mytí parodontálních kapes 1% roztokem chlorhexidinu.

Úspěch parodontologické léčby závisí na odstranění plaku a patogenů, které se nachází v plaku. Podání ATB přímo ovlivňuje úspěšnost léčby. Léčba zahrnuje mechanické i chemoterapeutické přístupy, aby byl zničen mikrobiální biofilm, který je hlavním etiologickým agens parodontálních infekcí (Roshna, 2012).

5.2.2 Antimikrobiální terapie

Mechanická manipulace vždy předchází antimikrobiální léčbě agresivní parodontitidy, aby bylo možné odstranit většinu patogenních bakterií. Protože nedostatečná koncentrace antimikrobiálních látek může vést ke vzniku rezistence na ATB.

Skupina tetracyklinových antimikrobiálních látek je považována za první volbu, protože je účinná pro eliminaci bakterie *A. actinomycetemcomitans*. Doxycyklin patří do tetracyklinové skupiny a je vhodný pro parodontologickou terapii. Podání se provádí v malých dávkách jedenkrát denně. Metronidazol se používá v kombinaci s amixicilinem třikrát denně po dobu 7 dnů. Tato kombinace je velmi účinná při potlačování aktivity *A. actinomycetemcomitans*.

Lokální aplikace antibiotik také může být použita po dokončení základní terapie. Pro lokální aplikaci mohou být použity další ATB: metronidazol, chlorhexidin, minocyklin, doxycyklin a tetracyklin. Aby léčivo bylo účinné musí splňovat další kritéria: musí dosáhnout cílového místa účinku, zůstat v účinné koncentraci a přetrvávat určitou dobu (Lektemur Alpan, 2019).

5.2.3 Chirurgická terapie

Chirurgická léčba může být využita pro zbývající parodontální kapsy po mechanické a antimikrobiální léčbě agresivní parodontitidy. Chirurgická metoda obnovy kostí a poškozených tkání zahrnuje kostní plastiku zaměřenou na regeneraci tkání pomocí membrán, použití biologických modifikátorů a také kombinaci těchto metod (Kamil, 2015).

5.2.4 Podpůrná terapie

Agresivní parodontitida může způsobit recidivy. Proto po základní léčbě by se měli provádět pravidelné kontroly ústní dutiny pacienta.

Kontrola postižených oblastí dutiny ústní musí obsahovat kontrolu množství plaku a zubního kamene, rentgenové snímky postižených zubů, mikrobiální kontrola na přítomnost bakterie *A. actinomycetemcomitans* a v některých případech opakované podání lokálních nebo systémových antibiotik (Lektemur Alpan, 2019).

6 Závěr

Tato práce se zaměřuje na přehled hlavních patogenních bakterií parodontu, které vyvolávají chronickou a agresivní parodontitidu. Patogenní bakterie, které se vyskytují v ústní dutině pacientů s chronickou parodontitidou, se nazývají bakterie červeného komplexu. Jsou to bakterie *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* a *Porphyromonas gingivalis*. Jedná se o gramnegativní, nepohyblivé, anaerobní bakterie, které se kultivují poměrně náročně v laboratorních podmínkách. V současné době se k diagnostice těchto bakterií nejčastěji používá metoda PCR. Umožňuje rychle rozpoznat patogenní bakterie v ústní dutině, napomáhá stanovit přesnou diagnózu a kontrolovat průběh a účinnost léčby.

Agresivní parodontitida je spojena s bakterií druhu *Actinomyces actinomycetemcomitans*. Toto onemocnění se vyznačuje rychlým vývojem a je více charakteristické pro mladé lidi. Bakterie *Actinomyces actinomycetemcomitans* způsobující toto onemocnění je gramnegativní, anaerobní kokobacil. Pro diagnostiku onemocnění a identifikaci bakterií se opět používá metody PCR a kvantitativní PCR.

PCR je rychlá diagnostická metoda, která nevyžaduje kultivaci. V tom spočívá její velká výhoda, protože všechny čtyři bakterie potřebují specifické podmínky pro optimální růst a kultivaci.

Průběh léčby u chronické a agresivní parodontitidy je do jisté míry podobný. V obou případech může terapie probíhat pouze v kombinaci metod: mechanické ošetření ústní dutiny, antibiotická léčba a úprava chování pacienta. Antibiotická léčba je v obou případech předepsána až po mechanickém ošetření dutiny ústní z toho důvodu, že bakterie v ústní dutině žijí v podobě biofilmu. Při nedokonalém mechanickém ošetření může být koncentrace antibiotik nedostatečná, aby mohla zničit patogenní bakterie, což může způsobit rezistenci bakterií k ATB.

Důležitou složkou při prevenci, léčbě a následnému udržení ústní dutiny ve zdravém stavu je dodržování hygienických pravidel a zdravého životního stylu.

7 Reference

1. ALBANDAR, Jasim M., 2014. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontology 2000* [online]. **65**(1), 13-26. ISSN 09066713. Dostupné z: doi:10.1111/prd.12014
2. ASAI, Tomohiro, Kazuko OKAMOTO-SHIBAYAMA, Yuichiro KIKUCHI a Kazuyuki ISHIHARA, 2018. Characterization of a novel potential peptide import system in *Treponema denticola*. *Microbial Pathogenesis* [online]. **123**, 467-472 [cit. 2021-01-03]. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2018.07.045
3. BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA, 2017. *Memorix histologie*. 2. vydání. Praha: Triton. ISBN 978-80-7553-249-7.
4. BARER, Garri, 2008. *Терапевтическая стоматология: Болезни пародонта*. 1. Moskva: ГЭОТАР-Медиа. ISBN ISBN 978-5-9704-0621-2.
5. BASCONES-MARTINEZ, Antonio, Elena CRIADO-CAMARA, Cristina BASCONES-ILUNDAIN, Santiago ARIAS a Jaime BASCONES-ILUNDAI, 2011. Etiology of Gingivitis. PANAGAKOS, Fotinos, ed., Fotinos PANAGAKOS. *Gingival Diseases - Their Aetiology, Prevention and Treatment* [online]. The Faculty of Dentistry Complutense University. Madrid: InTech, s. 55 66. ISBN 978-953-307-376-7. Dostupné z: doi:10.5772/24831
6. BELIBASAKIS, Georgios, Terhi MAULA, Kai BAO, Mark LINDHOLM, Nagihan BOSTANCI, Jan OSCARSSON, Riikka IHALIN a Anders JOHANSSON, 2019. Virulence and Pathogenicity Properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens* [online]. **8**(4). ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens8040222
7. BENSO, Bruna, 2016. Virulence factors associated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and their role in promoting periodontal diseases. *Virulence* [online]. **8**(2), 111-114. ISSN 2150-5594. Dostupné z: doi:10.1080/21505594.2016.1235128
8. BHAT, Alangar a Govind RAO, 2020. Dot-Blot Hybridization Technique. BHAT, Alangar a Govind RAO. *Characterization of Plant Viruses* [online]. 1. New York, NY: Springer US, s. 303-321. Springer Protocols Handbooks. ISBN 978-1-0716-0333-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-0716-0334-5_34
9. BLOCH, Susanne, Markus TOMEK, Valentin FRIEDRICH, Paul MESSNER a Christina SCHÄFFER, 2019. Nonulosonic acids contribute to the pathogenicity of the oral bacterium *Tannerella forsythia*. *Interface Focus* [online]. **9**(2). ISSN 2042-8898. Dostupné z: doi:10.1098/rsfs.2018.0064
10. CARVALHO, Cássio, Luciana SARAIVA, Flávio BAUER, 2018. Orthodontic treatment in patients with aggressive periodontitis. *American Journal of Orthodontics*

- and Dentofacial Orthopedics* [online]. **153**(4), 550-557. ISSN 08895406. Dostupné z: doi:10.1016/j.ajodo.2017.08.018
11. CORTELLINI, Pierpaolo a Nabil BISSADA, 2018. Mucogingival conditions in the natural dentition: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *Journal of Clinical Periodontology* [online]. **45**, 190-198. ISSN 03036979. Dostupné z: doi:10.1111/jcpe.12948
 12. DETIENVILLE, Roger, 2005. *Léčba závažných parodontitid*. 1. Praha: Quintessenz. ISBN 80-903181-6-9.
 13. DHALLA, Nipun, Sudhir PATIL, KrishnaKumar CHAUBEY a InderpreetSingh NARULA, 2015. The detection of BANA micro-organisms in adult periodontitis before and after scaling and root planing by BANA-Enzymatic TM test kit: An in vivo study. *Journal of Indian Society of Periodontology* [online]. **19**(4), 401-405. ISSN 0972-124X. Dostupné z: doi:10.4103/0972-124X.154167
 14. DOSTÁLOVÁ, Tatjana, Michaela BEZNOŠKOVÁ SEYDLOVÁ a Marie BARTOŇOVÁ, 2010. *Dentistry and oral diseases: for medical students*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3005-9.
 15. FAN, Jingyuan a Jack CATON, 2018. Occlusal trauma and excessive occlusal forces: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *Journal of Periodontology* [online]. **89**, 214-222. ISSN 00223492. Dostupné z: doi:10.1002/JPER.16-0581
 16. FEUCHEROLLES, Maureen, Sven POPPERT, Jürg UTZINGER a Sören BECKER, 2019. MALDI-TOF mass spectrometry as a diagnostic tool in human and veterinary helminthology: a systematic review. *Parasites & Vectors* [online]. **12**(1), 245. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-019-3493-9
 17. GHOLIZADEH, Pourya, Ali PORMOHAMMAD, Hosein ESLAMI, Behrooz SHOKOUHI, Vahid FAKHRZADEH a Hossein KAFIL, 2017. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial Pathogenesis* [online]. **113**, 303-311. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2017.11.001
 18. GODOVIKOVA, Valentina, M. GOETTING-MINESKY, John TIMM, J. FENNO a Ann STOCK, 2019. Immunotopological Analysis of the *Treponema denticola* Major Surface Protein (Msp). *Journal of Bacteriology* [online]. **201**(2), 00528-18. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00528-18
 19. GRAZIANI, Filippo, Dimitra KARAPETSA, Bettina ALONSO a David HERRERA, 2017. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease?. *Periodontology 2000* [online]. **75**(1), 152-188. ISSN 09066713. Dostupné z: doi:10.1111/prd.12201
 20. HERRERA, David, Belén RETAMAL-VALDES, Bettina ALONSO a Magda FERES, 2018. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal

- diseases) and endo-periodontal lesions. *Journal of Periodontology* [online]. **89**, 85-102. ISSN 00223492. Dostupné z: doi:10.1002/JPER.16-0642
21. HOW, Kah, Keang SONG a Kok CHAN, 2016. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology* [online]. **7**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2016.00053
 22. JEPSEN, Søren, 2018. Proceedings of the World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology* [online]. **2018**, 3-10 [cit. 2020-12-25]. Dostupné z: https://www.sepa.es/web_update/wp-content/uploads/2019/10/Paper03_SystemicPerioCond-Final.pdf
 23. JIA, Lu, Nannan HAN, Juan DU, Lijia GUO, Zhenhua LUO a Yi LIU, 2019. Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **9** [cit. 2021-06-02]. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2019.00262
 24. JOCHEBED, Rene, 2020. *Isolation, Transportation and Culture Methods of Tannerella forsythia - A Review* [online]. [cit. 2021-01-04]. ISSN 2455-2631. Dostupné z: <https://www.ijedr.org/papers/IJEDR2001037.pdf>
 25. *Journal of Proteomics* [online], 2020. ISSN 18743919.
 26. KADRI, Karim, 2020. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. L. NAGPAL, Madan, Oana-Maria BOLDURA, Cornel BALȚă a Shymaa ENANY, ed., Madan L. NAGPAL, Oana-Maria BOLDURA, Cornel BALȚă, Shymaa ENANY. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* [online]. 1. London: IntechOpen. ISBN 978-1-78984-089-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.86491
 27. KAMIL, Wisam, Lina AL BAYATI, Akbar HUSSIN a Haszelini HASSAN, 2015. Reconstruction of advanced bone defect associated with severely compromised maxillary anterior teeth in aggressive periodontitis: a case report. *Journal of Medical Case Reports* [online]. **9**(1). ISSN 1752-1947. Dostupné z: doi:10.1186/s13256-015-0677-6
 28. KHALAF, Hazem, Eleonor PALM a Torbjörn BENGTTSSON, 2017. Cellular Response Mechanisms in Porphyromonas gingivalis Infection. ARJUNAN, Pachiappan, ed., Pachiappan ARJUNAN. *Periodontitis - A Useful Reference* [online]. InTech. ISBN 978-953-51-3605-7. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.69019
 29. KOTSILKOV, Kamen, Chrisitina POPOVA a Lyudmila BOYANOVA, 2015. Comparison of culture method and real-time PCR for detection of putative periodontopathogenic bacteria in deep periodontal pockets. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* [online]. **20**(5), 996-1002. Dostupné z: doi:10.1080/13102818.2015.1058188

30. KRUEGER, Eric a Angela BROWN, 2020. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: From mechanism to targeted anti-toxin therapeutics. *Molecular Oral Microbiology* [online]. **35**(3), 85-105. ISSN 2041-1006. Dostupné z: doi:10.1111/omi.12284
31. KSIAZEK, Mirosław, Danuta MIZGALSKA, Sigrum EICK, Ida THØGERSEN, Jan ENGHILD a Jan POTEMPA, 2015. KLIKK proteases of *Tannerella forsythia*: putative virulence factors with a unique domain structure. *Frontiers in Microbiology* [online]. **6**. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.00312
32. LEKTEMUR ALPAN, Aysan, 2019. Aggressive Periodontitis. MANAKIL, Jane, ed., Jane MANAKIL. *Periodontology and Dental Implantology* [online]. 1. London: IntechOpen. ISBN 978-1-78984-931-8. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.76878
33. MAHALAKSHMI, Krishnan, Padma KRISHNAN a S.C. CHANDRASEKARAN, 2018. Detection of *Tannerella forsythia* bspA and prtH genotypes among periodontitis patients and healthy subjects—A case—Control study. *Archives of Oral Biology* [online]. **96**, 178-181. ISSN 00039969. Dostupné z: doi:10.1016/j.archoralbio.2018.09.012
34. MAJUMDER, Poulami, Suraj PANDA, Sujay GHOSH a Subrata DEY, 2019. Interleukin gene polymorphisms in chronic periodontitis: A case-control study in the Indian population. *Archives of Oral Biology* [online]. **101**, 156-164. ISSN 00039969. Dostupné z: doi:10.1016/j.archoralbio.2019.03.015
35. MALINOWSKI, Bartosz, Anna WęSIERSKA, Klaudia ZALEWSKA, 2019. The role of *Tannerella forsythia* and *Porphyromonas gingivalis* in pathogenesis of esophageal cancer. *Infectious Agents and Cancer* [online]. **14**(1). ISSN 1750-9378. Dostupné z: doi:10.1186/s13027-019-0220-2
36. MEHROTRA, Neha a Saurabh SINGH, 2022. Periodontitis. *StatPearls* [online]. 1-12 [cit. 2022-06-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541126/>
37. MOHANTY, Rinkee, Swati Joshi ASOPA, MDerick JOSEPH, Bhupender SINGH, Jagadish Prasad RAJGURU, K SAIDATH a Uma SHARMA, 2019. Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora. In: *Journal of Family Medicine and Primary Care* [online]. Bhubaneswar: J Family Med Prim Care. ISSN 2249-4863. Dostupné z: doi:10.4103/jfmpe.jfmpe_759_19
38. MOROZUMI, Toshiya a Yoshiaki NOMURA, 2016. Salivary pathogen and serum antibody to assess the progression of chronic periodontitis: a 24-mo prospective multicenter cohort study. *Journal of Periodontal Research* [online]. **51**(6), 768-778. ISSN 00223484. Dostupné z: doi:10.1111/jre.12353
39. MURAKAMI, Shinya, Brian MEALEY, Angelo MARIOTTI a Iain CHAPPLE, 2018. Dental plaque-induced gingival conditions. *Journal of Clinical Periodontology* [online]. **45**(1727), 17-27. ISSN 03036979. Dostupné z: doi:10.1111/jcpe.12937

40. MYSAK, Jaroslav, Stepan PODZIMEK, Pavla SOMMEROVA, Yelena LYUYA-MI, Jirina BARTOVA, Tatjana JANATOVA, Jarmila PROCHAZKOVA a Jana DUSKOVA, 2014. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research* [online]. **2014**, 1-8 [cit. 2021-06-02]. ISSN 2314-8861. Dostupné z: doi:10.1155/2014/476068
41. NEVILLE, Brad, Douglas DAMM, Carl ALLEN a Angela CHI, 2019. Periodontal Pathology. *Color Atlas of Oral and Maxillofacial Diseases* [online]. Elsevier, s. 93-107. ISBN 9780323552257. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-55225-7.00004-X
42. NG, Hong, Nada SLAKESKI, Catherine BUTLER, 2019. The Role of *Treponema denticola* Motility in Synergistic Biofilm Formation With *Porphyromonas gingivalis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. **9**. ISSN 2235-2988. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2019.00432
43. NØRSKOV-LAURITSEN, Niels, Rolf CLAESSEN, Anne BIRKEHOLM JENSEN, Carola ÅBERG a Dorte HAUBEK, 2019. *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*: Clinical Significance of a Pathobiont Subjected to Ample Changes in Classification and Nomenclature. *Pathogens* [online]. **8**(4). ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens8040243
44. OKTAWATI, Sri, Heri SISWANTO, Andi MARDIANA, Ingrid NEORMANSYAH a Irmah BASIR, 2020. Endodontic–periodontic lesion management: A systematic review. *Medicina Clínica Práctica* [online]. **3**. ISSN 26039249. Dostupné z: doi:10.1016/j.mcpsp.2020.100098
45. OSORIO, Rendon a Willer LEANDRO, 2012. Clinical treatment of a patient with generalized advanced chronic periodontitis at the School of Dentistry of Universidad de Antioquia. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia* [online]. (24), 151-167 [cit. 2022-06-02]. ISSN 0121-246X. Dostupné z: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-246X2012000200012&lng=en&nrm=iso
46. PANDIT, Nympha, Shalini GUGNANI, Divya SUSHIL a Deepika BALI, 2016. *Treponema denticola*: A teammate in periodontal progression. *Journal of the International Clinical Dental* [online]. **2016**, 58-62. Dostupné z: doi:10.4103 / 2231-0754.176257
47. RAMEZ, Maryam, FaramarzMasjedian JAZI, Hamed TAVAKOLI, Abazar POURNAJAF, Gholamreza IRAJIAN, MeysamHasannejad BIBALAN, Behzad EMADI a Behrooz YASINI, 2018. A comparison of culture and PCR methods for identification of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Journal of Acute Disease* [online]. **7**(3), 126-129. ISSN 2221-6189. Dostupné z: doi:10.4103/2221-6189.236827
48. REED, David a Thomas DIEKWISCH, 2015. Morphogenesis and Wound Healing in the Periodontium. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*

[online]. Elsevier, s. 445-458. ISBN 9780123971579. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00039-4

49. REIMER, Lorenz, Joaquim SARDÀ CARBASSE, Julia KOBLITZ, Christian EBELING, Adam PODSTAWKA a Jörg OVERMANN, 2022. Bac Dive in 2022: the knowledge base for standardized bacterial and archaeal data. In: *Nucleic Acids Research* [online]. London: Queen Mary University of London, D741-D746 [cit. 2022-06-05]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkab961
50. RIEP, Birgit, Lilian EDESI-NEUß, Friderike CLAESSEN, 2009. Are Putative Periodontal Pathogens Reliable Diagnostic Markers?. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **47**(6), 1705-1711. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01387-08
51. ROSHNA, Thattankandi a K. NANDAKUMAR, 2012. Generalized Aggressive Periodontitis and Its Treatment Options: Case Reports and Review of the Literature. *Case Reports in Medicine* [online]. **2012**, 1-17. ISSN 1687-9627. Dostupné z: doi:10.1155/2012/535321
52. RUSYANTI, Yanti, Sunardhi WIDYAPUTRA a Ani MASKOEN, 2019. Periodontal tissue destruction in aggressive periodontitis: Determination of gene or environmental factors. *The Saudi Dental Journal* [online]. **31**(2), 290-299. ISSN 10139052. Dostupné z: doi:10.1016/j.sdentj.2018.12.003
53. RYŠKOVÁ, Olga, 2004. *Mikrobiologie pro studující zubního lékařství*. 1. vyd. V Praze: Univerzita Karlova. ISBN 80-246-0834-0.
54. ŠEDÝ, Jiří a René FOLTÁN, 2009. *Klinická anatomie zubů a čelistí*. 1. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-312-7.
55. SHADDOX, Luciana a Clay WALKE, 2010. Treating chronic periodontitis: current status, challenges, and future directions. *Clin Cosmet Investig Dent* [online]. **2010**(2), 79-91 [cit. 2022-06-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3645457/>
56. SHARMA, Ashu, 2010. Virulence mechanisms of *Tannerella forsythia*. *Periodontology 2000* [online]. **54**(1), 106-116. ISSN 09066713. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0757.2009.00332.x
57. SIDDIQUI, Adel, Sajith VELLAPPALLY a Sheikh MUCKARRUM, 2020. Bactericidal and clinical efficacy of photochemotherapy in acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. **29**. ISSN 15721000. Dostupné z: doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101668
58. STEPANOVA, Tatiana, 2016. МИКРОБИОМ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ ЧЕЛОВЕКА. In: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25212> [online]. Chelyabinsk: Chelyabinsk State University [cit. 2020-11-28]. Dostupné z: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25212> (28.11.2020)

59. TANNO-NAKANISHI, Mariko, Yuichiro KIKUCHI, Eitoyo KOKUBU, Satoru YAMADA a Kazuyuki ISHIHARA, 2018. *Treponema denticola* transcriptional profiles in serum-restricted conditions. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **365**(16). ISSN 1574-6968. Dostupné z: doi:10.1093/femsle/fny171
60. TEUGHEL, Wim, Rutger DHONDT, Christel DEKEYSER a Marc QUIRYNEN, 2014. Treatment of aggressive periodontitis. *Periodontology 2000* [online]. **65**(1), 107-133. ISSN 09066713. Dostupné z: doi:10.1111/prd.12020
61. TIWARI, Sonia, Sudhanshu SAXENA, Aarti KUMARI, Silpi CHATTERJEE, Adreet HAZRA a AlokRatan CHOUDHARY, 2020. Detection of Red complex bacteria, *P. gingivalis*, *T. denticola* and *T. forsythia* in infected root canals and their association with clinical signs and symptoms. *Journal of Family Medicine and Primary Care* [online]. **9**(4), 1915–1920. ISSN 2249-4863. Dostupné z: doi:10.4103/jfmprc.jfmprc_1177_19
62. TOMITA, Sachiyo a Atsushi SAITO, 2017. Periodontal Abscess: a Review and the Role of Antimicrobial Therapy. *Current Oral Health Reports* [online]. **4**(4), 294-300. ISSN 2196-3002. Dostupné z: doi:10.1007/s40496-017-0157-8
63. UITTO, Veli-Jukka, Neil RAWLINGS a Guy SALVESEN, 2013. *Handbook of Proteolytic Enzymes* [online]. Elsevier. ISBN 9780123822192. Dostupné také z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123822192007080>
64. VALM, Alex M., 2019. The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *Journal of Molecular Biology* [online]. **431**(16), 2957-2969. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmb.2019.05.016
65. VOTAVA, Miroslav, Zdeněk BROUKAL a Jiří VANĚK, 2007. *Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře*. 1. Brno: Neptun. ISBN 978-80-86850-03-0.
66. WALTERS, John a Pin-Chuang LAI, 2015. Should Antibiotics Be Prescribed to Treat Chronic Periodontitis?. *Dental Clinics of North America* [online]. **59**(4), 919-933. ISSN 00118532. Dostupné z: doi:10.1016/j.cden.2015.06.011
67. WANG, Rachel, Yuen-Shan HO, Wai LEUNG, Tetsuya GOTO a Raymond CHANG, 2019. Systemic inflammation linking chronic periodontitis to cognitive decline. *Brain, Behavior, and Immunity* [online]. **81**, 63-73. ISSN 08891591. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbi.2019.07.002
68. ZHOU, Xuedong, 2015. Subgingival Microbes. ZHOU, Xuedong a Yuqing LI. *Atlas of Oral Microbiology* [online]. 1. Zhejiang University: Elsevier, s. 67-93. ISBN 9780128022344. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802234-4.00004-5
69. ZIA, Afaf, Syed MUKHTAR-UN-NISAR ANDRABI, Shagufta QADRI a Afshan BEY, 2015. Necrotizing periodontitis in a heavy smoker and tobacco chewer – A case

report. *Singapore Dental Journal* [online]. **36**, 35-38. ISSN 03775291. Dostupné z:
doi:10.1016/j.sdj.2015.07.001