



BAKTERIOLOŠKA ANALIZA SUBGINGIVALNIH ZOBNIH OBLOG BOLNIKOV S KRONIČNIM PARODONTITISOM V SLOVENIJI

Bacteriological analysis of subgingival plaque from patients with chronic periodontitis in Slovenia

A. Sotošek, P. Videmšek, K. Seme, R. Gašperšič

Izvleček

Namen: V nalogi smo se namenili dopolniti postopke, ki so potrebni za uspešno kultivacijo parodontopatogenih bakterij iz zobnih oblog pri slovenskih bolnikih s kroničnim parodontitisom, ter oceniti njihovo pogostost pojavljanja in količino.

Materiali in metode: Pri 30 bolnikih s kroničnim parodontitisom v zmerni ali napredovali stopnji smo iz štirih obzobnih žepov s papirnatimi šilci odvzeli vzorce subgingivalnih oblog ter jih nanесли na neselektivna in selektivna bakteriološka gojišča. Bakterije smo identificirali glede na specifično morfologijo kolonij, barvanje po Gramu, produkcijo katalaze in z masno spektrometrijo. Izračunali smo pogostost pojavljanja in količino ter razmerja v količini posameznih bakterij. **Rezultati:** V subgingivalnih oblogah smo našli vseh devet vrst parodontopatogenih bakterij, ki se jih lahko identificira s to metodo. Najpogosteje smo v oblogah našli bakterije *P. gingivalis* (93 %), *P. intermedia/nigrescens* in *T. forsythia* (90 %), *F. nucleatum* in *P. micra* (80 %). *A. actinomycetemcomitans* smo našli pri več kot polovici bolnikov (57 %). V zobnih oblogah je bilo največ bakterije *Pg*, bakterije *Aa* je bilo v zobnih oblogah malo. **Zaključki:** Pogostost parodontopatogenih bakterij v subgingivalnih oblogah slovenskih bolnikov je visoka, predvsem presenečata sočasno visoki prevalenci *Pg* in *Aa*. V nadaljnjih raziskavah bo treba izolirane bakterije natančneje opredeliti ter osvetliti pomen opaženih razmerij pri razvoju in uspešnosti zdravljenja parodontalne bolezni.

Ključne besede:
bakteriološka
kultivacija,
subgingivalne
zobne obloge,
kronični
parodontitis,
*Porphyromonas
gingivalis*,
*Aggregatibacter
actinomycetem-
comitans*

Abstract

Aim: The aim of the study was to optimize the procedures for successful cultivation of periodontopathogenic bacteria from subgingival plaque, and to evaluate the prevalence and quantity of individual pathogens in Slovenian patients with chronic periodontitis. **Materials and methods:** In 30 patients with moderate or advanced periodontitis, subgingival plaque samples were collected with paper points and cultured on non-selective and selective media. The bacteria were identified according to specific colony morphology, Gram stain and catalase production, and by means of mass spectrometry. The prevalence, quantity and ratios were calculated for each bacterial species. **Results:** All nine species of periodontopathogenic bacteria identifiable by this method were detected in the samples. The most frequently identified species were *Porphyromonas gingivalis* (93%), *Prevotella intermedia/nigrescens* (90%), *Tannerella forsythia* (90%), *Fusobacterium nucleatum* (80%) and *Parvimonas micra* (80%). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was detected in 57% of samples. *P. gingivalis* was the most abundant species, while *A. actinomycetemcomitans* was found in small quantities only. **Conclusions:** Periodontal pathogens, in particular *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*, are highly prevalent in Slovenian patients with periodontitis. Further research is needed to additionally define the characteristics of isolated bacteria and elucidate the significance of the observed ratios for the development of periodontitis and its treatment outcome.

Key words:
bacteriological
cultivation,
subgingival
plaque,
chronic
periodontitis,
*Porphyromonas
gingivalis*,
*Aggregatibacter
actinomycetem-
comitans*



Uvod

Površino zoba, žleb dlesni in obzobni žep človeka lahko naseljuje več kot 700 vrst bakterij, ki so različno močno povezane z nastankom vnetja dlesni in razgradnje obzobnih tkiv. Etiološka vloga bakterije pri razgradnji obzobnih tkiv je potrjena, če so izpolnjena vsa merila, ki jih je opredelil Socransky (1970). V skladu s temi merili so lahko iste vrste bakterij prisotne v zobnih oblogah ljudi z zdravimi obzobnimi tkivi in s parodontalno boleznijo, parodontopatogena bakterija pa je pri osebah s parodontalno boleznijo prisotna pogosteje in v večji količini kot pri zdravih osebah. Z isto obliko parodontalne bolezni so lahko povezane različne vrste bakterij. Etiopatogenetsko vlogo preučevane bakterije pri razvoju parodontalne bolezni potrjuje uspešna ozdravitev v primeru zmanjšane količine bakterije v zobnih oblogah ali njene odstranitve in izključuje ozdravitev ob ohranjeni visoki količini bakterije. Etiopatogenetsko vlogo bakterije pri razvoju parodontalne bolezni nadalje potrjuje gostiteljev imunski odziv, ki kaže, da bakterija uspešno prodre v obzobna tkiva. Zadnji pogoj za potrditev patogenosti bakterije je prisotnost virulentnih dejavnikov, ki jih lahko izražajo samo določeni sevi posamezne vrste bakterij. To utemeljuje natančno analizo prisotnosti in regulacije virulentnih dejavnikov različnih bakterijskih izolatov, kar po drugi strani pojasnjuje prisotnost nepatogenih sevov iste vrste bakterij pri ljudeh z zdravimi obzobnimi tkivi (Socransky, 1970).

Upoštevač navedena merila so pri razvoju parodontitisa raziskovalci potrdili vzročno vlogo bakterij *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) in *Tannerella forsythia* (Tf). Čeprav ne izpolnjujejo vseh meril, uvrščamo v skupino z mogočo etiološko vlogo pri razvoju parodontitisa tudi bakterije *Campylobacter rectus* (Cr), *Eikenella corrodens* (Ec), enterične paličaste bakterije, *Eubacterium nodatum*, *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Prevotella intermedia/nigrescens* (Pi/n), *Parvimonas micra* (Pm), *Streptococcus intermedius*, *Pseudomonas sp.*, *Selenomonas sp.*, *Staphylococcus sp.* in *Treponema denticola* (van Winkelhoff, 2003).

Potrditev etiološke vloge teh bakterij pri razvoju parodontitisa upravičuje uporabo mikrobioloških diagnostičnih postopkov, s katerimi se ugotavlja

njihovo prisotnost in količino v zobnih oblogah. To še posebej velja za bolnike, pri katerih uspešnost standardnega mehanskega zdravljenja ni predvidljiva (npr. bolniki z agresivnim parodontitisom) ali pa ni učinkovita (npr. bolniki z refraktarnimi oblikami parodontitisa). Za razumevanje patogene vloge posameznih bakterij je pomembno natančno poznavanje pogostosti prisotnosti in količine posameznih bakterij ter razmerij med njimi pri osebah z zdravimi obzobnimi tkivi ter osebah z različnimi stopnjami in oblikami bolezni obzobnih tkiv (van Winkelhoff, 2003; Herrera in sod., 2012).

Dosedanje raziskave, ki so poskušale povezati prisotnost določene bakterije z obliko, stopnjo in razširjenostjo parodontalne bolezni, so pokazale velike razlike glede pogostosti in količine bakterij med posamezniki in opazovanimi populacijami (Rylev in Kilian, 2008). Tako je denimo v subgingivalnih zobnih oblogah bolnikov s kroničnim parodontitisom v Španiji pogosteje kot pri bolnikih na Nizozemskem prisoten Pg, pri bolnikih na Nizozemskem pa Aa in Pm (Sanz in sod., 2000). Tudi serotipi Aa, ki se pojavljajo pri bolnikih s kroničnim parodontitisom, se na različnih zemljepisnih območjih razlikujejo (Kilian in sod., 2006).

Iz zgoraj navedenih raziskav je bilo mogoče zaključiti, da se pogostost prisotnosti posameznih bakterij v zobnih oblogah med posamezniki iz istega okolja in med različnimi zemljepisnimi območji zelo razlikuje. Ni pa znano, ali so opažene razlike posledica dejanskih razlik v stopnji in razširjenosti bolezni, uporabe različnih načinov jemanja vzorcev ali pa različnih mikrobioloških metod. Zato so utemeljene natančne primerjalne raziskave sestave bakterijskih zobnih oblog med različnimi populacijami ob jasno določenih vključitvenih pogojih in z enako metodologijo, da bi ugotovili, ali razlike med populacijami na različnih zemljepisnih območjih dejansko obstajajo ali so le navidezne.

Namen te raziskave je bil optimizirati razmere za klasično bakteriološko analizo ter ugotoviti pogostost prisotnosti anaerobnih bakterij in bakterije Aa v zobnih oblogah, njihovo količino in razmerja med njimi pri bolnikih s kroničnim parodontitisom v Sloveniji.

Materiali in metode

V presečno raziskavo smo vključili 30 odraslih oseb z generaliziranim kroničnim parodontitisom



zmerne ali napredovane stopnje, ki so bili napoteni na Center za ustne bolezni in parodontopatije UKC v obdobju med 23. 5. 2012 in 15. 5. 2013. Pri izbiri bolnikov smo upoštevali naslednja merila: bolniki so morali imeti več kot 16 zob, izključili pa smo vse bolnike, ki so bili v zadnjem letu parodontalno zdravljeni, bolnike, ki so sistemsko prejeli antibiotike v zadnjih 4 tednih, in nosečnice. Vključili smo bolnike, stare od 18 do 60 let, z vsaj enim mestom v vsakem čeljustnem kvadrantu z globino sondiranja 5 mm ali več in izgubo kliničnega prirastišča 3 mm ali več.

Pri vsakem preiskovancu smo izvedli rutinski klinični pregled, pri katerem smo pri vsakem zobu na šestih mestih ocenjevali prisotnost ali odsotnost bakterijskih zobnih oblog z dihotomnim indeksom plaka, prisotnost ali odsotnost krvavitve ob sondiranju, globino sondiranja in umik dlesni. Vse meritve smo opravili z manualno Williamsovo sondo (PCP 11, Hu-Friedy, ZDA). Iz vsote globine sondiranja in umika dlesni smo izračunali izgubo kliničnega prirastišča.

Pri vsakem preiskovancu smo na osnovi kliničnega pregleda izbrali štiri odzemna mesta, in sicer v vsakem čeljustnem kvadrantu eno mesto z največjo izgubo kliničnega prirastišča in z globokim obzobnim žepom. Na teh mestih smo najprej odstranili vidne zobne obloge ter mesto osušili s staničevinastimi svaljki in stisnjenim zrakom. V vsak izbrani obzobni žep smo zaporedoma vstavili dva sterilna papirnata šilca premera 0,30 mm (Maillefer, Ballaigues, Švica), ki smo ju odstranili po 10 sekundah. Šilca smo dali v stekleničko z 1,5 ml RTF (K_2HPO_4 0,45 g/l, KH_2PO_4 0,45 g/l, NaCl 0,90 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 90 g/l, $MgSO_4$ 0,18 g/l, EDTA 0,38 g/l, Na_2CO_3 0,40 g/l, dithiothreitol 0,20 g/l). Po odvzemu smo vzorec hranili na sobni temperaturi in ga v roku 24 ur prenesli v laboratorij.

Vzorec smo najprej 10-kratno serijsko redčili v raztopini PBS in 100 ml vsake razredčine nanесли na neselektivno gojišče s krvnim agarjem (Oxoid No. 2; Oxoid, Basingstoke, VB), z dodatkom 5 % konjske krvi, hemina (5 mg/l) in menadiona (1 mg/l). Na teh gojiščih smo po enem in dveh tednih anaerobne kulture (80 % N_2 , 10 % H_2 , 10 % CO_2) pri temperaturi 37 °C identificirali in prešteli kolonije anaerobnih bakterij. Po enem tednu smo prešteli število kolonij *Ec*, *Pm*, *Fb*, *Pi*,

Cr, *Co*. Po dveh tednih smo prešteli kolonije *Tf* in izračunali število kolonij *Pg*.

Kolonije *Pg* so po enem tednu kulture umazane zelene barve, šele po dveh tednih postanejo črne. Kolonije *Pi* so črne že po prvem tednu kulture. Število *Pg* smo dobili tako, da smo prešteli vse črne kolonije po dveh tednih (*Pg* in *Pi*) ter nato odšteli število črnih kolonij, ki smo jih prešteli po enem tednu (*Pi*). Vzorec smo nanесли tudi na gojišče Dentaid-1 (BHI agar 52 g/l, ekstrakt kvasovk 5 g/l, natrijev fumarat 1,5 g/l, natrijev format 1 g/l z dodatkom vankomicina 0,009 g/l in cikloheksimid 0,29 g/l), ki je namenjeno za izolacijo in oceno količine *Aa*, ki smo ga odšteli po od treh do petih dneh inkubacije pri 37 °C s 5 % CO_2 , in na gojišče po McConkeyju za ugotavljanje prisotnosti enteričnih bakterij, ki smo ga odšteli po enem do dveh dneh aerobne inkubacije pri 37 °C.

Kolonije bakterij smo identificirali z ocenjevanjem morfologije posameznih bakterijskih kolonij, celične morfologije (barvanje po Gramu), aerotolerance, tvorbe katalaze in z masno spektrometrijo (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics, Nemčija).

Prisotnost in število kolonij parodontalnih patogenov *Pg*, *Pi*, *Tf*, *Pm*, *Cr*, *Fb* in *Ec* smo ocenjevali na anaerobnem neselektivnem gojišču. Število kolonij *Aa* smo ocenjevali na gojišču Dentaid-1. Število bakterijskih kolonij na gojišču smo ocenjevali na gojiščih, na katerih je bilo število vseh kolonij med 30 in 300, nato smo glede na meritve in razredčitev vzorca izračunali število kolonij v 1 ml vzorca (CFU/ml). Prešteli smo tudi število vseh kolonij na gojišču in izračunali deleže števila posameznih kolonij glede na celokupno število anaerobnih bakterij.

Numerične rezultate smo predstavili s srednjo vrednostjo (mediano) in obsegom (min–maks). Za računanje smo uporabili računalniški program SigmaStat, verzijo 3.5 (Systat Software, Inc., 2006, Nemčija).

Rezultati

Med 30 bolniki s kroničnim parodontitisom je bila več kot polovica žensk (56 %). Povprečna starost je bila 46 ± 11 let. Med bolniki so prevladovali nekadilci (60 %). Bivših kadilcev je bila slaba tretjina (27 %). Najmanj je bilo med bolniki kadilcev

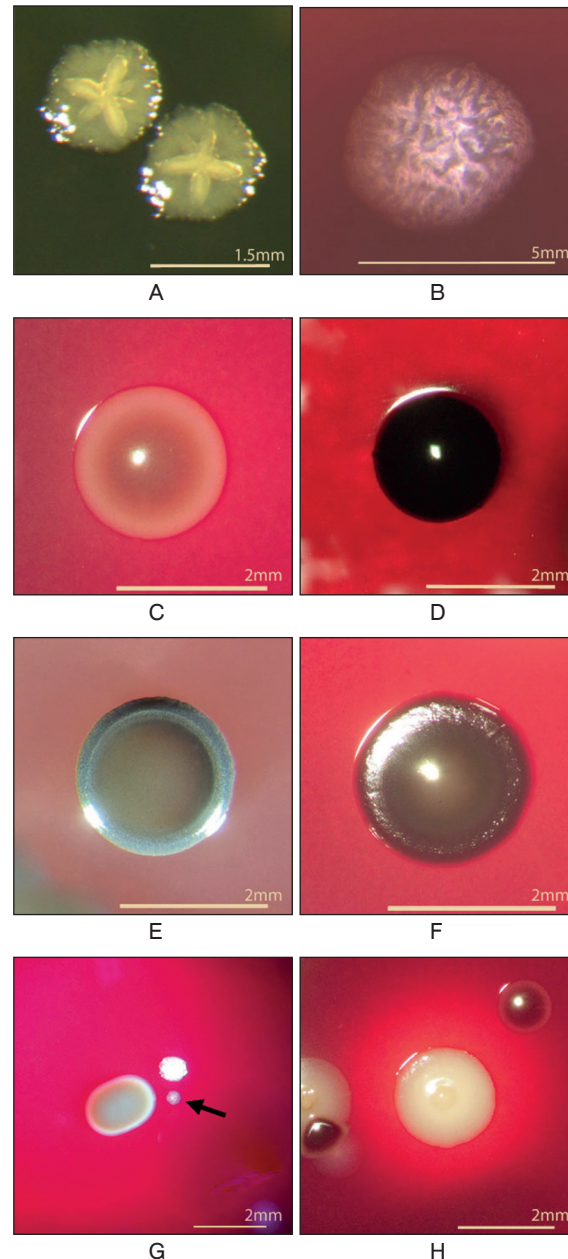
(13 %), od katerih jih je 75 % pokadilo 1–10 cigaret na dan, četrtnina pa je pokadila več kot 10 cigaret na dan. Bolniki so imeli povprečno 27 ± 2 zob. 40 % oseb je imelo zmeren (izguba kliničnega prirastišča 3–4 mm) in 60 % oseb napredovali parodontitis (izguba kliničnega prirastišča 5 mm ali več).

Povprečno število merilnih mest z globino sondiranja, večjo od 5 mm, je bilo 24 ± 25 . Povprečna globina sondiranja vseh merilnih mest vseh bolnikov je bila 3,7 mm in povprečna izguba kliničnega prirastišča 4,2 mm. Povprečen delež mest s zobnim plakom je bil 30 ± 16 % in delež mest, ki so krvavela ob sondiranju, 63 ± 14 %. Povprečna globina sondiranja na mestih jemanja vzorcev plaka je bila $6,2 \pm 1,7$ mm in izguba kliničnega prirastišča $7,1 \pm 1,8$ mm.

V zobnih oblogah bolnikov s parodontitisom smo našli devet parodontopatogenih bakterij (Slika 1). *Aa* smo našli pri 17 bolnikih (57 %), *Pg* pri 28 bolnikih (93 %), *Pi* in *Tf* pri 27 bolnikih (90 %), *Ec* pri 5 bolnikih (17 %), *Fb* in *Pm* pri 24 bolnikih (80 %), *Cr* pri 11 bolnikih (37 %) ter *Co* pri 8 bolnikih (27 %). Enteričnih bakterij nismo našli.

V zobnih oblogah bolnikov je bila mediana vrednost log CFU vseh bakterij, ki so zrastle na anaerobnem gojišču, 7,3, vrednosti pa so bile v obsegu med 5,93 (min) in 9,15 (maks). Največ je bilo v zobnih oblogah bakterije *Pg* (mediana log CFU/ml: 6,37, obseg log CFU/ml: 0,00–8,82), najmanj pa bakterij *Ec*, (mediana log CFU/ml: 0,00, obseg log CFU/ml: 0,00–6,42), *Cr* (mediana log CFU/ml: 0,00, obseg log CFU/ml: 0,00–7,66) in *Co* (mediana log CFU/ml: 0,00, obseg log CFU/ml: 0,00–5,81). Razmeroma malo je bilo v zobnih oblogah tudi bakterije *Aa* (mediana log CFU/ml: 2,43, obseg log CFU/ml: 0,00–4,90). Količina drugih parodontopatogenih bakterij (*Pi*, *Tf*, *Pm*, *Fn*) je bila zmerena (Preglednica 1).

V zobnih oblogah bolnikov je največji delež vseh anaerobov zavzemal *Pg* (mediana: 7,93 %, obseg: 0,00–47,0 %), najmanjše deleže pa *Aa* (mediana: 0,00 %, obseg: 0,00–0,37 %), *Cr* (mediana: 0,00 %, obseg: 0,00–19,7 %), *Co* (mediana: 0,00 %, obseg: 0,00–1,18 %) in *Ec* (mediana: 0,00 %, obseg: 0,00–2,35 %). Razmeroma majhen delež bakterij je zavzemal tudi *Fb* (mediana: 1,05 %, obseg: 0,00–2,35 %). Deleži drugih bakterij (*Pi*, *Tf*, *Pm*) so bili zmerni (Preglednica 1).



Slika 1: **A** – kolonija bakterij *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* na gojišču Dentaid po petih dneh kultivacije. **B** – kolonija bakterij *Fusobacterium nucleatum* na krvnem agarju po enem tednu kultivacije. **C** – kolonija bakterij *Porphyromonas gingivalis* na krvnem agarju po 1 in 2 (**D**) tednih kultivacije. **E** – kolonija bakterij *Prevotella intermedia* na krvnem agarju po 1 in 2 (**F**) tednih kultivacije. **G** – s puščico označena kolonija bakterij *Tannerella forsythia* na krvnem agarju po dveh tednih kultivacije. **H** – kolonija bakterij *Parvimonas micra* na krvnem agarju po enem tednu kultivacije. Slikano s stereomikroskopom.



Preglednica 1: Število in delež parodontalno patogenih bakterij v vzorcih subgingivalnih oblog bolnikov s parodontalno boleznijo. Vrednosti so predstavljene kot povprečne vrednosti 30 bolnikov z obsegi

Bakterija	Deleži (%)	log CFU/ml
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0,00 (0,00–0,37)	2,43 (0,00–4,90)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	7,93 (0,00–47,0)	6,37 (0,00–8,82)
<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	2,25 (0,00–26,8)	5,82 (0,00–6,69)
<i>Tanarella forsythia</i>	2,84 (0–16,1)	5,82 (0,00–7,08)
<i>Eikenella corrodens</i>	0,00 (0,00–2,35)	0,00 (0,00–6,42)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,05 (0,00–39,0)	5,60 (0,00–6,66)
<i>Parvimonas micra</i>	3,75 (0–13,8)	6,03 (0,00–7,25)
<i>Campylobacter rectus</i>	0,00 (0,00–19,7)	0,00 (0,00–7,66)
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0,00 (0–1,18)	0,00 (0,00–5,81)
TC	7,30 (5,93–9,15)	7,30 (5,93–9,15)

*CFU – število bakterijskih kolonij na 1 ml vzorca, TC – skupno število bakterijskih anaerobnih kolonij v vzorcu (angl. *Total Count*)

Razprava

Prvi namen naše raziskave je bil izpopolniti laboratorijske razmere, ki omogočajo kultivacijo parodontopatogenih bakterij. Pred izvedbo naše raziskave v nobenem slovenskem mikrobiološkem laboratoriju niso uporabljali te metode, zato so bili podatki o sestavi zobnih oblog bolnikov s kroničnim parodontitisom v Sloveniji le delno poznani in slabo primerljivi s podatki drugih raziskav.

V našem prostoru je veljalo mnenje, da je metoda za ocenjevanje prisotnosti parodontopatogenih bakterij premalo natančna in preveč tehnično zahtevna ter da je za tak namen uporaba metode mikro-IDent[®] primernejša (Sodja, 2006). Zaradi prilagoditve protokolov, nove laboratorijske opreme in optimizacije bakterioloških gojišč ter novih možnosti natančne identifikacije bakterij z metodo masne spektrometrije, ki postopek identifikacije bistveno skrajša, natančnost pa v primerjavi z biokemičnimi testi poveča, je klasična bakteriološka diagnostika spet dobila večji pomen. Največja pomanjkljivost metode pri identifikaciji parodontalnih patogenov, predvsem ob epidemioloških analizah prisotnosti teh bakterij, je razmeroma visok prag detekcije, vseeno pa ima metoda, kot kaže dolgoletna praksa uporabe v nekaterih laboratorijih za oralno mikrobiologijo (Boutaga in sod., 2007), kot pomoč pri kliničnemu delu mnogo večjo uporabnost kot metode, ki temeljijo na PCR. Menimo, da je metoda kultivacije, dopolnjena z masno spektrometrijo, optimalna za ugotavljanje prisotnosti, količine in razmerij med subgingivalnimi parodontalnimi patogeni, za sledenje sprememb v količini bakterij ob samem poteku zdravljenja ter za

ugotavljanje občutljivosti izolatov na antibiotike v primerih refraktornih oblik bolezni. Ob uporabi masne spektrometrije je mogoče zanesljivo ločiti tudi vrsti *P. intermedia* in *P. nigrescens* ter vrste kapnocitofag, ki jih zaradi podobnih fenotipskih značilnosti z biokemičnimi testi ni mogoče razlikovati. Zaradi boljše primerljivosti naših rezultatov z drugimi raziskavami (Sanz in sod., 2000), v katerih vrst prevotel niso mogli zanesljivo ločiti, smo obe bakterijski vrsti združili v eno skupino in jo označili *Pi/Pn*.

Pri slovenskih bolnikih s kroničnim parodontitisom smo našli vseh devet parodontopatogenih bakterij, katerih prisotnost se navadno ugotavlja z metodo kultivacije. Pri skoraj vseh bolnikih je bila v zobnih oblogah prisotna bakterija *Pg* (93 %), po pogostosti pojavljanja so ji sledile *Pi/Pn* in *Tf* (90 %). Večinoma smo pri bolnikih našli tudi *Fb* in *Pm* (80 %). Bakteriji *Co* (27 %) in *Cr* (37 %) sta bili prisotni izrazito manj pogosto. Več kot polovica bolnikov je v zobnih oblogah imela bakterijo *Aa* (57 %). Pogostost prisotnosti teh bakterij je kljub dejstvu, da smo v raziskavo vključili bolnike z napredovalo stopnjo parodontalne bolezni, presenetljiva. Najbolj presenečata izrazito visoki prevalenci *Pg* in *Aa*, česar pri bolnikih s kroničnim parodontitisom v drugih opazovanih populacijah, pri katerih je bila bodisi visoka le prevalenca *Pg* bodisi prevalenca *Aa*, niso našli (Sanz in sod., 2000; Herrera in sod., 2008). Preseneča tudi visoka prevalenca *Tf*, ki jo lahko razložimo s sokultivacijo s *Fb*, saj se je tudi ta pojavljala pri visokem odstotku naših bolnikov. Količinsko največ je bilo v zobnih oblogah bakterije *Pg*, najmanj pa *Ec*, *Cr* in *Co*. Tudi število kolonij in delež bakterije *Aa* sta bila majhna, kar se ujema z rezultati drugih raziskav (Lakio in sod., 2002).





V nekaterih dosedanjih raziskavah v oralni mikrobiologiji v Sloveniji so raziskovalci z uporabo drugih mikrobioloških metod že ugotavljali prisotnosti parodontopatogenih bakterij v zobnih oblogah bolnikov s parodontalno boleznijo. Ti rezultati se z našimi rezultati le delno ujemajo. Bogatajeva in sod. (1995) so z metodo hibridizacije DNK ugotavljali prisotnost *Pg* in *Pi* v vzorcih subgingivalnih oblog 44 bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 1 in 10 naključno izbranih oseb brez te bolezni. Ugotovili so, da je pogostost pojavljanja bakterij *Pi* (64 %) in *Pg* (68 %) v subgingivalnih oblogah pri metabolno slabo urejenih bolnikih večja kot pri sistemsko zdravih osebah s parodontalno boleznijo (*Pi* 40 % in *Pg* 50 %). S semikvantitativno analizo so ugotovili, da se v globljih žepih pojavlja večja količina obeh bakterij, kar kaže na to, da je količina bakterij pokazatelj stopnje prizadetosti obzobnih tkiv.

Glede na podoben prag detekcije bi razlike v pogostosti pojavljanja bakterij *Pg* in *Pi*, ki so jih našli manj pogosto kot v naši raziskavi, verjetno lahko pripisali drugačnemu načinu vzorčenja, saj so vzorce jemali le iz dveh najglobljih obzobnih žepov, česar pa zaradi pomanjkanja podatkov o specifičnosti uporabljene metode hibridizacije DNK ni mogoče zagotovo trditi (Bogataj in sod., 1995). Jurič in sod. (2002) so v raziskavi pri 18 osebah s 30 zobnimi vsadki primerjali učinek ročne in električne zobne ščetke na sestavo subgingivalnih zobnih oblog ter na stanje tkiv ob zobnih vsadkih in kot metodo za detekcijo parodontopatogenih bakterij uporabili mikroskopiranje v temnem polju. Bakterije so morfološko razdelili v dve skupini, prvo, potencialno nepatogeno skupino (koki in negibljivi bacili), in drugo, potencialno patogeno skupino (gibljivi bacili, spirohete in drugo). Ugotovili so pogostejšo prisotnost bakterij patogene skupine pri osebah, ki so dve leti uporabljale ročno zobno ščetko, kot pri osebah, ki so uporabljale električno zobno ščetko (Jurič in sod., 2002). Žal natančnejše analize sestave zobnih oblog niso izvedli, kar bi bilo smiselno izvesti v prihodnjih raziskavah.

Kočar in sod. (2010) so z metodo večkratnega PCR (Micro-IDent[®]) opredelili subgingivalno floro ob zobeh in zobnih vsadkih delno brezzobih oseb z zdravljenim kroničnim parodontitisom. To metodo so uporabili za detekcijo bakterij *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Tf* in *Td*. Ugotovili so, da so parodontopatogene bakterije pogostejše ob zobeh s povečano globino sondiranja (*Aa*: 40 %, *Pg*: 93 %, *Pi*: 0 %, *Tf*: 86 %, *Td*: 66 %) kot ob zobeh z manjšo globino sondiranja (*Aa*: 21 %, *Pg*: 21 %, *Td*: 21 %, *Pi*: 0 %, *Tf*: 31 %). Pri brezzobih osebah z

zobnimi vsadki parodontopatogenih bakterij niso našli. Sklepali so, da je okužba tkiv ob zobnem vsadku s parodontopatogenimi bakterijami odvisna od prisotnosti teh bakterij v obzobnih žepih (Kočar in sod., 2010). Presenetljivo je, da se kljub precej nižjemu pragu detekcije ugotovljena pogostost prisotnosti parodontalnih patogenov ob zobeh s povečano globino sondiranja dobro ujema z našimi rezultati, z izjemo pogostosti bakterije *Pi*, ki se pri njihovih bolnikih ni pojavljala, in *Td*, ki je z našo metodo nismo mogli identificirati. Zanimivo je, da so bile parodontopatogene bakterije v obzobnih žepih domnevno v majhnih količinah prisotne kljub zdravljenju parodontalne bolezni, kar potrjuje domnevo, da je prisotnost majhnih količin parodontopatogenih bakterij kompatibilna z zdravjem obzobnih tkiv, in pri podobnih raziskavah utemeljuje uporabo kvantitativnih metod, kakršna je bila uporabljena v naši raziskavi.

Petelin in sod. (2014) so z metodo mikro-IDent[®] opredelili mikrobiološki status 28 bolnikov z nezdravljenim kroničnim parodontitisom in primerjali vpliv različnih načinov zdravljenja (luščenje in glajenje, uporaba ultrazvočnega čiščenja oblog in fotodinamično zdravljenje) na spremembe kliničnih parametrov in na prisotnost parodontopatogenih bakterij *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Tf* in *Td*. Njihovi rezultati so pokazali, da se pri bolnikih s kroničnim parodontitisom pred zdravljenjem *Aa* pojavlja v 30 %, *Pg* v 70 %, *Pi* v 46 %, *Td* v 10 % in *Tf* v 100 % primerov. Ti rezultati se le delno ujemajo z našimi rezultati ter rezultati Kočarja in sod. (2010), v primerjavi z našimi rezultati predvsem presenečajo nizki deleži oseb, pri katerih so našli bakteriji *Aa* in *Pi*, v primerjavi z rezultati Kočarja in sod. pa nizki deleži *Td* (Kočar in sod., 2010). Po 6 mesecih so ugotovili zmanjšanje pogostosti pojavljanja *Pg*, *Pi* in *Aa* v obzobnih žepih, ne glede na način zdravljenja. Predvidevamo, da se je količina parodontopatogenih bakterij zmanjšala tudi v primerih, ko zdravljenje določene vrste bakterij ni popolnoma odstranilo, kar bi bilo mogoče ugotoviti s kvantitativno metodo, kakršno smo uporabili v naši raziskavi.

Schara in sod. (2013) so pri skupini 21 bolnikov s kroničnim parodontitisom, ki so imeli diabetes tipa 1, s testom mikro-IDent[®] ocenjevali prisotnost parodontopatogenih bakterij *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Tf* in *Td* v subgingivalnih zobnih oblogah. *Tf* so v zobnih oblogah našli v 48 %, *Td* v 31 %, *Pg* v 26 %, *Pi* v 9 % in *Aa* v 7 % primerov (Schara in sod., 2013). Glede na naše rezultate in rezultate Bogatajeve in sod. (1995) presenečajo nizki deleži oseb, pri





katerih so našli opazovane bakterije, kar govori v prid hipotezi, da so pri osebah z diabetesom tipa 1 patofiziološki mehanizmi razgradnje obzobnih tkiv zaradi sprememb vnetnoimunskega odziva drugačni kot pri sistemsko zdravih osebah. Del razlik v pogostosti pojavljanja parodontopatogenov bi verjetno lahko pripisali tudi različnemu vzorčenju, saj so vzorce jemali le iz dveh obzobnih žepov, podatkov o tem, ali so bili bolniki v zadnjem obdobju tudi parodontološko zdravljeni, pa niso navedli. Odkrili so, da obstaja povezava med koncentracijo glukoze v plazmi in prisotnostjo bakterij *Tf* in *Td*, medtem ko povezave med koncentracijo glukoze v plazmi in prisotnostjo *Pg*, *Pi* in *Aa* ni bilo (Schara in sod., 2013). Predvidevamo, da bi tudi v tej raziskavi z ugotavljanjem količine parodontopatogenih bakterij in razmerij med njimi lahko našli še druge povezave.

Rezultate naše raziskave smo primerjali tudi z rezultati drugih laboratorijev, predvsem referenčnega laboratorija Stomatološke fakultete Univerze Complutense v Madridu, s katerimi smo pred izvedbo raziskave uskladili protokole ter dokazali visoko stopnjo ujemanja pri identifikaciji in kvantifikaciji parodontalnih patogenov. Podobno so uskladitev z referenčnim laboratorijem opravili tudi laboratoriji stomatoloških fakultet v Groningenu na Nizozemskem, Bogoti v Kolumbiji in Santiagu v Čilu, zato so mogoče neposredne primerjave teh rezultatov. V raziskavah, v katerih so v teh državah opredelili subgingivalno floro bolnikov s parodontitisom, so to opredelili pri podobnem številu bolnikov s podobno stopnjo parodontalne bolezni (Sanz in sod., 2000; Herrera in sod., 2008), kot smo to naredili v naši raziskavi. Za razliko od referenčnega laboratorija smo identifikacijo bakterijskih kolonij dopolnili z metodologijo masne spektrometrije (MALDI-TOF), saj so biokemični testi, ki so jih namesto tega opravili v drugih laboratorijih, bolj zamudni in manj natančni, ter tako povečali zanesljivost identifikacije bakterijskih vrst.

Pri bolnikih s kroničnim parodontitisom v Španiji (Sanz in sod., 2000) se je pogosteje kot pri nas v subgingivalnih oblogah pojavljala bakterija *Fb* (100 %), manj pogosto kot pri nas *Pg* (65 %), mnogo manj pogosto pa *Aa* (3,2 %). Pri Nizozemcih (Sanz in sod., 2000) so se v primerjavi z nami pogosteje pojavljale bakterije *Pm* (97 %), *Fb* (100 %) in *Cr* (57 %), podobno kot pri nas pa *Aa* (57 %). Velja poudariti, da v Španiji pri bolnikih s kroničnim parodontitisom niso našli bakterij *Ec* in *Co*. V skupnem številu vseh bakterijskih kolonij, ki

so zrasle na anaerobnem gojišču, skorajda ni bilo razlik, kar pa ne velja za deleže posameznih bakterij, kot so *Aa*, *Pg*, *Tf*, *Pi*, *Fn* in *Cr*, ki so bili pri španskih bolnikih višji kot pri slovenskih (*Aa*: 0,5 % vs. 0,04 %, *Pg*: 21,6 % vs. 12,30 %, *Tf*: 7,23 % vs. 3,67 %, *Pi*: 7,4 % vs. 4,9 %, *Fn*: 6,9 % vs. 3,25 %, *Cr*: 2,2 % vs. 1,54 %).

Ker so bili rezultati omenjenih raziskav predstavljeni s povprečnimi vrednostmi in standardnimi deviacijami, smo za boljšo primerjavo izračunali povprečne vrednosti naših rezultatov, kar v rezultatih ni predstavljeno. Pri bolnikih s kroničnim parodontitisom v Čilu (Herrera in sod., 2008) so se v primerjavi z našimi pogosteje pojavljali enterokoki (17,6 %) in *Ec* (34,3 %). Velja poudariti, da pri naših bolnikih s kroničnim parodontitisom enterokokov nismo našli, podobno kot jih niso našli tudi pri bolnikih s kroničnim parodontitisom v Španiji in na Nizozemskem. Deleži bakterij *Aa* (2,86 %), *Pi* (15,23 %), *Ec* (10,14 %), *Pm* (10,83 %), *Co* (4,62 %), *Pg* (34,01 %) in *Tf* (6,43 %) so bili višji od deležev, ki smo jih našli pri preučevanju slovenske populacije, povprečni delež bakterije *Fb* pa je bil pri njih manjši kot pri nas (2,76 %).

Za razliko od nas v Čilu niso našli *Cr*. V Kolumbiji (Herrera in sod., 2008) so pogosteje našli parodontopatogene bakterije *Fb* (82,9 %), *Ec* (27,5 %) in enterokoke (36,6 %). Deleži *Aa* (0,22 %), *Pi* (6,71 %), *Ec* (1,77 %), *Fb* (5,08 %), *Co* (2,00 %) in *Tf* (4,39 %) so bili višji od deležev, ki smo jih našli pri bolnikih slovenske populacije. Delež bakterij *Pg* in *Pm* je v primerjavi s Kolumbijo pri nas večji. Bakterije *Cr* v Kolumbiji niso identificirali. Če torej primerjamo Slovence s Čilenci in Kolumbijci, ugotovimo, da smo si podobni glede pojavnosti *Pg*, bakterija *Aa* pa je pri nas bistveno pogostejša. Velja omeniti še izrazite razlike pri pojavljanju *Tf* (Čile: 16,2 %, Kolumbija: 39,0 %) in *Pm* (Čile: 29,7 %, Kolumbija: 2,4 %), ki so v Sloveniji bistveno pogostejše (*Aa*: 57 %, *Pg*: 93 %, *Pi* in *Tf*: 90 %, *Pm* in *Fb*: 80 %, *Cr*: 37 %, *Co*: 27 %) (Herrera in sod., 2008).

Glede na usklajenost protokolov razloga za odstopanja v pojavnosti in količini parodontalnih patogenov med omenjenimi državami ne gre pripisovati metodološkim razlikam med posameznimi laboratoriji. Mogoče jih je razložiti z genskimi dejavniki (Loos in sod., 2005; Rylev in Kilian, 2008), razlikami v oralnohigienskih navadah, ravni zobozdravstvene oskrbe, izpostavljanju tobačnim izdelkom, različni uporabi antibiotikov in različnemu vnetnoimunskemu odzivu gostitelja (Mager in sod., 2003; Van der Velden in sod., 2003).



Natančno sestavo mikroflore določene populacije je treba poznati, da se lahko izbere optimalen način zdravljenja z antibiotiki, ki se sicer predpisuje izkustveno. V populacijah, kjer prevladuje *Pg*, se za izkustveno uporabo svetujeta antibiotika metronidazol (Van Winkelhoff, 2003) ali azitromicin (Herrera in sod., 2012), v populacijah, kjer prevladuje *Aa*, pa kombinacijsko zdravljenje z amoksicilinom in metranidazolom (Van Winkelhoff, 2003). Nepravilno predpisovanje antibiotikov je lahko problematično, saj prispeva k razvoju odpornosti bakterij proti antibiotikom, kar opažajo predvsem v Španiji in Kolumbiji (Herrera in sod., 2008).

Odpornost proti antibiotikom pri nekaterih parodontopatogenih bakterijah so že raziskali Veloo in sodelavci (2012). V presečni študiji so ugotavljali odpornost petih oralnih patogenov proti šestim v parodontologiji pogosto uporabljenim antibiotikom. Odpornost proti amoksicilinu so ugotovili pri približno 1 % izolatov *Pi* in *Fb*, pri vseh teh izolatih so ugotovili produkcijo beta laktamaze. Podoben delež izolatov *Aa* se je izkazal odporen proti amoksicilinu, vendar pri teh niso ugotovili produkcije beta laktamaze. Po primerjavi s podobnimi raziskavami po Evropi so ugotovili, da se odpornost parodontopatogenih bakterij proti antibiotikom razlikuje glede na zemljepisno območje. V primerjavi s Kolumbijo je parodontopatogenih bakterij, ki so odporne proti antibiotikom, v evropskih državah manj. Glede na ugotovljene podatke raziskovalci priporočajo, da se s podobnimi obdobjimi raziskavami vsakih nekaj let oceni trende razvoja odpornosti pri parodontopatogenih bakterijah, terapevtske protokole pa optimizira z izdelavo mikrobioloških profilov, kar smo izvedli v naši raziskavi.

Neposredna primerjava naših rezultatov z rezultati raziskav drugih laboratorijev, ki so pri kultivaciji uporabili drugačne protokole, pa ni mogoča, saj ni jasno, ali so opažene razlike posledica dejanskih razlik v pogostosti parodontopatogenih bakterij ali metodološke neuskkljenosti (Sanz in sod., 2000).

Protokoli v drugih laboratorijih so se pomembno razlikovali glede načina odvzema vzorcev (npr. samo iz enega obzobnega žepa) in uporabe bakterijskih gojišč (s triptakinazo obogaten sojin agar, krvni agar Brucella, triptakinazni krvni agar). Razlike so bile tudi v času transporta vzorca, ki je variiral od 10 minut do 24 ur.

V raziskavi v Grčiji so se pri 10 bolnikih z refraktornim parodontitisom, starih od 25 do 30 let, pogosteje kot

pri nas pojavljale bakterije *Pg* (100 %), *Pi* (100 %), *Tf* (100 %), *Pm* (100 %), *Fb* (100 %) in *Cr* (100 %), redkeje pa *Aa* (20 %) (Kamma in sod., 1994). Tako visoki odstotki so verjetno posledica specifičnega vzorca bolnikov s parodontalno boleznijo, ki jih ni bilo mogoče uspešno pozdraviti s konvencionalno mehansko terapijo, in so pričakovani.

V raziskavi na Norveškem, ki je bila izvedena pri 18 bolnikih s kroničnim parodontitisom, starih od 18 do 61 let, pa so pogosteje kot v Sloveniji našli le bakterijo *Fb* (100 %), redkeje pa prisotne bakterije *Aa* (33 %), *Pg* (87 %) in *Pi* (78 %) (Ali in sod., 1994). V raziskavi na Švedskem so na vzorcu 61 bolnikov s kroničnim parodontitisom, starih od 19 do 79 let, ki še niso bili parodontalno zdravljeni, v zobnih oblogah redkeje našli bakterije *Aa* (40–47 %), *Pg* (51–41 %) in *Pi* (59 %) (Slots, 1986). V Švici so pri 30 bolnikih z generaliziranim kroničnim parodontitisom, starih od 35 do 40 let, ki prav tako še niso bili parodontalno zdravljeni, ugotovili pogosteje prisotne bakterije *Aa* (63 %), *Pi* (97 %), *Ec* (40 %) in *Pm* (80 %), medtem ko so bile bakterije *Pg* (67 %) in *Tf* (60 %) prisotne manj pogosto (McNabb in sod., 1992).

Ne glede na metodološke razlike lahko zaključimo, da so nezdravljeni slovenski bolniki s kroničnim parodontitisom glede pogostosti parodontalnih patogenov posebnost, saj imajo v zobnih oblogah pogosto prisotni tako bakterijo *Pg* kot bakterijo *Aa*, česar v drugih populacijah niso ugotovili. V tem pogledu je naša populacija glede pogostosti pojavljanja *Pg*, *Pi/Pn*, *Tf*, *Pm* in *Fb* še najbolj podobna populaciji grških bolnikov z refraktorno obliko bolezni, glede pogostosti pojavljanja *Aa* skupaj s *Pg* pa bolnikom iz Švice (Kamma in sod., 1994). Natančni razlogi za tako pogosto skupno pojavljanje obeh najpomembnejših parodontalnih patogenov niso poznani in jih bo treba dognati v nadaljnjih raziskavah.

Zaključki

V nalogi smo izpopolnili postopke za kultivacijo parodontopatogenih bakterij ter ocenili prisotnost, količino in razmerja med temi bakterijami v subgingivalnih zobnih oblogah bolnikov s kroničnim parodontitisom. Najpomembnejši zaključki naše naloge so:

1. V zobnih oblogah bolnikov s kroničnim parodontitisom zmerne in napredovale stopnje se s klasično bakteriološko diagnostiko lahko dokaže prisotnost bakterij *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Tanne-*



rella forsythia, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* in *Capnocytophaga ohracea*.

- Skoraj pri vseh bolnikih s kroničnim parodontitisom so prisotne bakterije *Porphyromonas gingivalis* (93%), *Prevotella intermedia/nigrescens* in *Tannerella forsythia* (90 %), pri veliki večini pa tudi *Fusobacterium nucleatum* in *Parvimonas micra* (80 %). Bakterijo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ima več kot polovica preiskovancev (57 %). *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* in *Capnocytophaga ohracea* se pojavljajo pri manjšem odstotku bolnikov.
- Med vsemi anaerobi je bilo v zobnih oblogah bakterije največ bakterije *Porphyromonas gingivalis*, najmanj pa bakterij *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* in *Capnocytophaga ohracea*. Delež in količina bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* v zobnih oblogah sta bila prav tako majhna.

Reference

- Ali RW, Bakken V, Nilsen R, Skaug N. Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. *J Periodontol* 1994; 65: 1046–52.
- Bogataj L, Pečnik SL, Medvešček M, Skalerič U. Bakterije v zobnih oblogah pri preiskovancih s sladkorno boleznijo. *Zobozdrav Vestn* 1995; 50: 145–8.
- Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2007; 78: 79–86.
- Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, Sanz M, Botero JE, León R. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol*. 2008; 35: 106–13.
- Herrera D, Matesanz P, Bascones-Martínez A, Sanz M. Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. *J Evid Based Dent Pract* 2012; 12: 50–60.
- Kamma JJ, Nakou M, Manti FA. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *J Periodontol* 1994; 65: 1073–8.
- Kočar M, Seme K, Hren NI. Characterization of the normal bacterial flora in peri-implant sulci of partially and completely edentulous patients. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010; 25: 690–8.
- Jurič R, Simončič B, Sotošek B, Kansky A, Seme K. Sonic vs. manual toothbrush: The effect on periimplant tissues and microflora. *J Dent Res* 2002; 81: 100.
- Kilian M, Frandsen EV, Haubek D, Poulsen K. The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. *Periodontol* 2000 2006; 42: 158–79.
- Lakio L, Kuula H, Dogan B, Asikainen S. Actinobacillus actinomycetemcomitans proportion of subgingival bacterial flora in relation to its clonal type. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 212–7.
- Loos BG, John RP, Laine ML. Mager in sod., 2003. Identification of genetic risk factors for periodontitis and possible mechanisms of action. *J Clin Periodontol* 2005; 32(Suppl 6): 159–79.
- Mager DL, Haffajee AD, Socransky SS. Effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 1031–7.
- McNabb H, Mombelli A, Gmür R, Mathey-Dinç S, Lang NP. Periodontal pathogens in the shallow pockets of immigrants from developing countries. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 267–72.
- Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol* 2008; 35 (Suppl 8): 346–61.
- Petelin M, Perkič K, Seme K, Gašpirc B. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. *Lasers Med Sci* 2014, sprejeto v tisk.
- Sanz M, van Winkelhoff AJ, Herrera D, Dellemijn-Kippuw N, Simón R, Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 383–92.
- Schara R, Skalerič E, Seme K, Skalerič U. Prevalence of periodontal pathogens and metabolic control of type 1 diabetes patients. *J Int Acad Periodontol* 2013; 15: 29–34.
- Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 912–7.
- Socransky SS. Relationship of bacteria to the etiology of periodontal disease. *J Dent Res* 1970; 49: 203–22.
- Sodja E. Primerjava klasične bakteriološke diagnostike in molekularne metode za dokazovanje parodontopatogenih bakterij v vzorcih parodontalnih žepov [diplomsko delo]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2006.
- Van der Velden U, Varoufaki A, Hutter JW, Xu L, Timmerman MF, Van Winkelhoff AJ, Loos BG. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 603–10.
- Van Winkelhoff AJ. Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics. *Int J Dent Hyg* 2003; 1: 131–7.
- Veloo AC, Seme K, Raangs E, Rurenga P, Singadji Z, Wekema-Mulder G, van Winkelhoff AJ. Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40: 450–4.

Anja Sotošek in Petja Videmšek, študentki 6. letnika dentalne medicine; prof. dr. Katja Seme, Inštitut za mikrobiologijo z imunologijo; doc. dr. Rok Gašperšič, Katedra za ustne bolezni in parodontologijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

