

Lek.dent Marcin Lenkowski

**ZASTOSOWANIE IZOTERMALNEJ AMPLIFIKACJI KWASÓW
NUKLEINOWYCH (LAMP) DO IDENTYFIKACJI BAKTERII W
AGRESYWNYM I PRZEWLEKŁYM ZAPALENIU PRZYŻĘBIA**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n.med. Surdacka Anna

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Kaczmarek Mariusz, prof.UMP



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

**Praca finansowana z grantu naukowego „Młodzi Naukowcy”
nr WL-II/ 786/16 oraz środków statutowych Kliniki Stomatologii
Zachowawczej i Endodoncji UMP.**

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	3
SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
WSTĘP	9
1. ZAPALENIE PRZYŻĘBIA.....	9
<i>1.1. Podział i etiologia.....</i>	<i>9</i>
<i>1.2. Czynniki Bakteryjne</i>	<i>12</i>
1.2.1. P. gingivalis.....	13
1.2.2. T. forsythia	15
1.2.3. F.nucleatum	16
1.2.4. A.actinomycetemcomitans	16
1.2.5. Inne patogeny	17
1.3.1. Diagnostyka periodontopatogenów	17
1.3.2. Metody mikrobiologiczne.....	17
1.3.3. PCR (Reakcja Polimerazy Łańcuchowej)	18
1.3.4. Real-Time PCR (Reakcja PCR w czasie rzeczywistym)	19
1.3.5. Multipleksowy Real-Time PCR.....	21
1.3.6. Systemy diagnostyczne do analizy periodontopatogenów.....	21
1.3.7. LAMP - Loop Mediated Isothermal Amplification	23
1.3.8. Modyfikacje metody LAMP	25
1.3.9. Wady metody LAMP	26
1.3.10. Detekcja periodontopatogenów metodą LAMP.....	26
1.3.11. Wizualna detekcja produktów LAMP	28
1.3.12. Multipleksowy/panelowy test LAMP	29
CEL PRACY	31
MATERIAŁ I METODY	32
<i>3.1. Selekcja Pacjentów</i>	<i>32</i>
<i>3.2. Wskaźniki chorób przyzębia.....</i>	<i>34</i>
3.2.1. Wskaźnik dziąsłowy (GI)	34
3.2.2. Głębokość kieszonek (PD)	34
3.2.3. Kliniczna utrata przyczepu łącznotkankowego (CAL)	35

3.3. Izolacja bakteryjnego DNA.....	35
3.3.1. Akwizycja płynu dziąsłowego	35
3.3.2. Izolacja bakteryjnego DNA w soli fizjologicznej	37
3.3.3. Izolacja bakteryjnego DNA z próbek zabezpieczonych buforem Difast	38
3.4. Detekcja badanych periodontopatogenów.....	39
3.4.1. LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).....	39
3.4.2. PCR - Łańcuchowa reakcja polimerazy	43
3.4.3. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)	49
3.5. Liczba kopii bakteryjnego DNA.....	51
3.6. Analiza Statystyczna	52
WYNIKI	54
4.1. Wyniki badań klinicznych	54
4.2. Wyniki badań molekularnych w zależności od badanych zmiennych klinicznych	56
4.2.1. Zależności pomiędzy wykrywalnością obecności <i>P.gingivalis</i> za pomocą testów LAMP, Real Time PCR, PCR a badanymi zmiennymi.	56
<i>P.gingivalis</i> ; LAMP (bufor TE)	56
<i>P.gingivalis</i> LAMP (bufor Difast).....	58
<i>P.gingivalis</i> PCR (bufor TE)	59
<i>P.gingivalis</i> ; PCR (bufor "Difast")	61
<i>P.gingivalis</i> ; Real-Time PCR (bufor TE).....	61
<i>P.gingivalis</i> ; Real-Time PCR (bufor "Difast").....	62
4.2.2. Zależności pomiędzy wykrywalnością obecności <i>A.actinomycetemcommitans</i> wykrytej za pomocą wykrytych testów LAMP, Real-Time PCR, PCR, a badanymi zmiennymi.	63
<i>A.actinomycetemcommitans</i> ; LAMP (bufor TE)	63
<i>A.actinomycetemcommitans</i> ; LAMP (bufor "Difast").....	65
<i>A.actinomycetemcommitans</i> ; PCR (bufor TE)	65
<i>A.actinomycetemcommitans</i> ; PCR (bufor "Difast")	67
<i>A.actinomycetemcommitans</i> ; Real-Time PCR (bufor TE).....	68
<i>A.actinomycetemcommitans</i> ; Real time PCR (bufor Difast).....	68

4.2.3. Zależności pomiędzy wykrywalnością obecności <i>F.nucleatum</i> za pomocą testów LAMP, Real-Time PCR, PCR a badanymi zmiennymi.	70
<i>F. Nucleatum</i> ; LAMP (bufor TE)	70
<i>F. Nucleatum</i> ; LAMP (bufor „Difast”)	71
<i>F. Nucleatum</i> ; PCR (bufor TE)	72
<i>F. Nucleatum</i> ; PCR (bufor „Difast”)	72
<i>F. Nucleatum</i> ; Real Time PCR (bufor TE)	73
<i>F. Nucleatum</i> ; Real-Time PCR (bufor “Difast”)	73
4.2.4. Zależności pomiędzy wykrywalnością obecności <i>T. forsythia</i> za pomocą testów	73
LAMP, Real-Time PCR, PCR, a badanymi zmiennymi.....	73
<i>T. forsythia</i> ; LAMP (bufor TE)	73
<i>T. forsythia</i> ; LAMP (bufor „Difast”)	73
<i>T. forsythia</i> ; PCR (bufor TE)	74
<i>T. forsythia</i> ; PCR (bufor „Difast”)	74
<i>T. forsythia</i> ; Real-Time PCR (bufor TE)	76
<i>T. forsythia</i> ; Real Time PCR (bufor „Difast”)	76
4.3. Kwantyfikacja periopatogenów	77
4.4. Czułość oraz Swoistość Testów wykorzystanych w badaniu	80
4.4.1. Porównanie detekcji <i>P.gingivalis</i> z wykorzystaniem metody LAMP (Bufor TE) oraz PCR <i>P.gingivalis</i> (Bufor TE) w grupie chorych (badana).	81
4.4.2. Porównanie detekcji <i>T.Forsythia</i> z wykorzystaniem metody LAMP (Bufor TE) oraz Real-Time PCR <i>T.Forsythia</i> (Bufor TE) (Bufor TE) w grupie chorych (badana).	83
4.4.3. Porównanie detekcji <i>F. Nucleatum</i> (bufor DiFast) z wykorzystaniem metody LAMP (Bufor TE) oraz metody Real-Time <i>F.Nucleatum</i> PCR (Bufor „Difast”) (Bufor TE) w grupie chorych (badana).	85
4.5. Krzywe wzorcowe	88
4.6. Liczba kopii bakteryjnego DNA	93
DYSKUSJA	97
WNIOSKI.....	112
BIBLIOGRAFIA	113

STRESZCZENIE	131
SUMMARY	132
SPIS TABEL	133
SPIS RYCIN	135

SPIS STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AIDS - <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> - zespół nabytego niedoboru odporności	HSV - <i>herpes simplex virus</i> - wirusy opryszczki pospolitej
AGE - <i>Advanced glycation end products</i> - produkty końcowych zaawansowanej glikacji	LAMP - <i>Loop-mediated isothermal amplification</i> - Izotermina amplifikacja kwasów nukleinowych
BOP - <i>bleeding on probing</i> - krwawienie podczas sondowania	LBP - <i>Loop Backward Primer</i> - zapętłający primer wsteczny
CAL - <i>clinical attachment loss</i> - kliniczna utrata przyczepu łącznotkankowego	LFP - <i>Loop forward primer</i> - zapętłający primer przedni
CDT - <i>cytolethal-distending toxin</i> - genotoksyna CDT	LPS - <i>Lipopolysaccharide</i> - lipopolisacharyd
COX-2 - <i>cyclooxygenase-2</i> -cyklooksygenaza typu 2	LRR - <i>leucine rich repeats</i> - powtórzenia bogate w leucynę
DNA - <i>deoxyribonucleic acid</i> - kwas dezoksyrybonukleinowy	MMP - <i>Matrix metalloproteinases</i> – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej
EDTA - <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> - kwas wersenowy	NASBA - <i>Nucleic Acid Sequences Based Amplification</i> - Amplifikacja oparta na sekwencjach kwasów nukleinowych
Etbr - <i>Ethidium bromide</i> - Bromek etydydny	PCR - <i>polymerase chain reaction</i> - Reakcja łańcuchowa polimerazy
GspSSD polymerase - polimeraza GspSSD	PCR-RFLP - <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> - reakcja PCR połączona z analizą restrykcyjną produktów amplifikacji
HAD - <i>Helicase Displacement Amplification</i> - amplifikacja poprzez przemieszczenie helikazy	PD - <i>Probing Depth</i> - (głębokość sondowania kieszonkowego)
HBV - <i>hepatitis B</i> - Wirus zapalenia wątroby typu B	PI - <i>plaque index</i> - wskaźnik płytki nazębnej
HNB - <i>hydroxynaphthol blue</i> - błękit hydroksynaftolowy	PMN - <i>Polymorphonuclear leukocytes</i> - granulocyty obojętnochłonne

RANKL - <i>Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand</i> - ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κ B)	SARS-CoV-2 - <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> - zespół ostrej niewydolności oddechowej-2
RPA - <i>Recombinase Polymerase Amplification</i> - Amplifikacja polimerazy rekombinazy	SDA - <i>Strand Displacement Amplification</i> - Amplifikacja przemieszczenia nici
RT-PCR <i>reverse-transcription polymerase chain reaction</i> - Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją	SYBR Green I - zieleń SYBR I
rRNA - <i>Ribosomal RNA</i> - rybosomalny, rybosomowy RNA	TLR2 - <i>Toll-like receptor-2</i> - receptory toll podobne
RNA - <i>ribonucleic acid</i> - Kwas rybonukleinowy	QPCR - <i>Quantitative PCR</i> - reakcji ilościowa PCR w czasie rzeczywistym
	VZV - <i>Varicella zoster virus</i> - wirus ospy wietrznej
	WGA - <i>Whole Genome Amplification</i> - Amlifikacja całego genomu

WSTĘP

1. Zapalenie przyzębia

1.1. Podział i etiologia

Zapalenie przyzębia jest przewlekłym stanem zapalnym tkanek przyzębia, prowadzącym do uszkodzenia aparatu podtrzymującego zęby, którego konsekwencją może być częściowa lub całkowita utrata zębów. Najczęściej rozpoznanie choroby opiera się na badaniu klinicznym i radiologicznym i zasadniczo zależne od wartości następujących parametrów: wskaźnika/-ów płytki nazębnej wskaźnika/-ów krwawienia, utraty przyczepu klinicznego, głębokości kieszonki przyzębnej (głębokość sondowania kieszonkowego) (PD), ruchomości zębów, zaawansowania odsłonięcia furkacji, a także, jak już wspomniano, od oceny radiologicznej architektury kości. Wskaźniki te nie pokazują jednak aktualnego stanu choroby oraz nie dostarczają informacji o aktywności ani ryzyku rozwoju choroby [15,16]. Choroby przyzębia dotyczą około 20-50% populacji na całym świecie [131]. U nastolatków zamieszkujących kraje rozwijające się, obserwuje się częstsze występowanie kamienia nazębnego oraz spontaniczne krwawienie podczas sondowania [131]. W krajach rozwijających się, odsetek adolescentów z depozytami kamienia nazębnego obejmuje od 35% do 70%, podczas gdy w krajach rozwiniętych, waha się od 4% do 34%. Podobnie w krajach rozwijających się, odnotowano wyższy odsetek osób dorosłych, u których stwierdzono złogi kamienia nazębnego, 36-63%, w porównaniu do populacji dorosłych w krajach uprzemysłowionych, gdzie odsetek ten zawiera się pomiędzy 14 a 47%. Z drugiej strony, w krajach rozwiniętych wykazano wyższy odsetek osób z kieszeniami przyzębnymi o głębokości 4–5 mm (36-63%). Obecność kieszeni około zębowych o głębokości 6 mm lub większej, stwierdzono u osób starszych (65-74 lata), zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się [13]. Podczas ostatniego zjazdu Europerio 9, który odbył się w Amsterdamie w dniach 20-23 czerwca 2018 roku, ustalony został konsensus, w którym przyjęto nową klasyfikację chorób przyzębia. Wcześniejszy podział zapalenia przyzębia na agresywny i przewlekły, został zgrupowany jako pojedyncza jednostka chorobowa. Nowa klasyfikacja podkreśla system etapowy, który składa się z kryteriów, takich jak stopień zaawansowania choroby oraz złożoność leczenia. Etap pierwszy, to początkowe

zapalenie przyzębia, drugi - umiarkowane zapalenie oraz trzeci i czwarty etap to ciężkie zapalenie przyzębia, z możliwością utraty zębów. Ponadto, klasyfikacja ta uwzględnia trzy stopnie zaawansowania choroby oraz jej umiejscowienie, które podzielono na miejscowe i uogólnione, dotyczące tylko zębów trzonowych i siekaczy, a także ryzyko szybkiej progresji choroby oraz przewidywanie reakcji na leczenie. Wyróżnia się również stopnie charakteryzujące się odrębnym tempem progresji:

stopień A - wykazuje wolne tempo progresji,

stopień B - charakteryzuje się średnim tempem progresji,

stopień C - wskazuje na szybkie tempo progresji,

Wyodrębniono również martwicze choroby przyzębia, które podzielono na martwicze zapalenie dziąseł oraz martwicze zapalenie przyzębia. Dodatkowo uwzględniono martwicze zapalenie jamy ustnej oraz zapalenie przyzębia jako objaw chorób ogólnoustrojowych [14].

Rozwojowi zapalenia przyzębia sprzyja stan zapalny towarzyszący różnym ogólnoustrojowym problemom zdrowotnym. Czynniki modulującymi sprzyjającymi chorobom przyzębia, są między innymi: cukrzyca, zespół nabytego niedoboru odporności (AIDS; *ang.* Acquired Immune Deficiency Syndrome), stres i otyłość. Liczne badania potwierdziły, iż nadmierny poziom glukozy, jak również nagromadzenie produktów końcowych zaawansowanej glikacji (AGE; *ang.* advanced glycation end-products), zapoczątkowują kaskadę prozapalną w tkance okalającej zęby, potencjalnie wpływającą na utratę przyczepu łącznotkankowego [2].

Ważnym behawioralnym czynnikiem ryzyka zapalenia przyzębia jest palenie tytoniu. Nikotyna powoduje znaczne zwężenie mikronaczyń krwionośnych, maskując w ten sposób kliniczne objawy krwawienia, które są niewidoczne podczas sondowania, pomimo postępującego stanu zapalnego. Takie długotrwałe niedokrwienie aparatu przyzębia, może sprzyjać zaawansowaniu stanu zapalnego [3]. Ponadto, nadmierna konsumpcja środków farmakologicznych wywierająca wpływ na układ hormonalny, może powodować zaburzenia produkcji śliny, prowadząc do przerostu dziąseł i tworzenia kieszonek rzekomych, uniemożliwiając efektywne usuwanie płytki nazębnej. Niedobory witaminowe związane z niedożywieniem, takie jak: niewystarczające stężenie witaminy C, mogą prowadzić do zakłóceń produkcji kolagenu i osłabienia układu naczyń włosowatych, co z kolei prowadzi do zwiększonej skłonności do krwawienia [4]. Również, stanom hematologicznym - w szczególności nowotworom krwi, takim jak

białaczka lub stanom przednowotworowym np. mielodysplazji, towarzyszy zapalenie dziąseł przy braku nadmiernego gromadzenia się płytki nazębnej. Objawy takie jak obrzęk, kolor purpury, krwawienie bądź bladość dziąseł (naciekanie komórek białaczkowych), są nieadekwatne do poziomu nagromadzenia biofilmu płytki nazębnej, małopłytkowości i/lub niedoborów czynnika krzepnięcia [5]. Jako kolejny potencjalny czynnik utraty przyczepu łącznotkankowego, wskazuje się wady okluzyjne. Jednakże związek pomiędzy wadami zgryzu a zapaleniem przyzębia, zaobserwowano jedynie w modelu zwierzęcym i jak dotąd nie uzyskano wystarczająco przekonujących dowodów na podobne zjawisko występujące u ludzi. Jakkolwiek, niektóre badania wskazują, iż możliwe jest uzyskanie regeneracji poziomu przyczepu przyzębia, po uwzględnieniu korekty zgryzu jako elementu leczenia przyzębia [6,7]. Dodatkowo, do rozprzestrzeniania się stanu zapalnego przyzębia, może przyczyniać się podatność genetyczna oraz lokalne czynniki jatrogenne i urazy mechaniczne takie jak: jatrogenne owrządzenie dziąseł, samookaleczenia, oparzenia chemiczne (toksyczne), czy obrażenia termiczne. Ważnymi czynnikami wpływającymi na podatność na zapalenie przyzębia, są składowe układu odpornościowego. Mediatory immunoregulacyjne takie jak: cytokiny, chemokiny, receptory obecne na powierzchni błony komórkowej oraz białka rozpoznające antygen, są uznawane za kluczowe elementy uczestniczące w procesach prowadzących do zapalenia przyzębia. Wskazano, że interleukiny (m.in. IL-1 α , IL-1 β , IL-6 i IL-10), receptory powierzchniowe (m.in. Fc γ R), cyklooksygenaza typu 2 (COX-2) i metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP), pełnią kluczową rolę w rekrutacji komórek nacieku zapalnego, stymulacji osteoklastów oraz w różnicowaniu i aktywacji limfocytów B [8]. Zmiany polimorficzne w obrębie genów kodujących wymienione molekuly, mogą odpowiadać za zwiększone ryzyko rozwoju choroby (9). Obecnie prowadzone są intensywne badania asocjacyjne genów, wykorzystujące m.in. metodę łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR; *ang.* polymerase chain reaction), prowadzące do określenia częstości występowania określonych alleli i genotypów, których celem jest wyjaśnienie związku między polimorfizmami występującymi w genach kodujących wybrane cytokiny lub inne mediatory zapalne, a rozwojem zapalenia przyzębia [10,11]. W wyniku przeprowadzonej metaanalizy obejmującej 71531 uczestników (32011 pacjentów z chorobą przyzębia i 39520 kontroli), dotyczącej różnych klasyfikacji choroby, w której uwzględniono 25 polimorfizmów występujących w genach kodujących interleukiny (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 i IL-18), 3 polimorfizmy

w genach kodujących receptory komórkowe Fcγ (FCGR2A, FCGR3A i FCGR3B) oraz 5 polimorfizmów w genach mediatorów zapalnych (COX-2, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-8 i MMP-9), Silva i wsp. wykazali, iż polimorfizmy obecne w genach dla IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-10, MMP-3 (w postaci przewlekłej) i MMP-9 (w postaci przewlekłej), były istotnie związane z ryzykiem rozwoju choroby, podczas gdy polimorfizmy w genach kodujących IL-4, IL-18, receptory FcγR, COX-2, MMP-2, MMP-3 (w postaci agresywnej) oraz MMP-8 i MMP-9 (w postaci agresywnej), nie miały istotnego wpływu na rozwój zapalenia przyzębia [12].

1.2. Czynniki Bakteryjne

Obok czynników środowiskowych, genetycznych i podatności organizmu gospodarza, główną przyczynę inicjacji i postępu zapalenia przyzębia stanowią drobnoustroje [1]. W stanie fizjologicznym przyzębia, liczba bakterii wewnątrz jamy ustnej wynosi średnio 1×10^9 , podobnie liczba bakterii naddziąsłowych wynosi 1×10^9 , podczas gdy w stanie zapalnym przyzębia ilości te przekraczają liczbę 1×10^{87} [10].

W jamie ustnej występuje ponad 700 różnych gatunków bakterii. Ocena składu biofilmu poddziąsłowego metodami mikrobiologicznymi i molekularnymi ujawniła, że w tej licznej grupie istnieje kilka gatunków drobnoustrojów, które dzięki swojej patogenności i nabytej zdolności komunikowania się w złożonej społeczności, powodują znaczną destrukcję przyzębia [17,18,19]. W 1998 r. Socransky i wsp. po zbadaniu zachowania się różnych bakterii obecnych w jamie ustnej, w oparciu o ich patogenność i zdolności kolonizacyjne w środowisku poddziąsłowym, stworzyli klasyfikację obejmującą kilka podklas patogenów. Każdej z podklas nadali inny kod barwny. Jeden z ważniejszych kompleksów, zwany „czerwonym”, składał się z 3 ściśle spokrewnionych gatunków: *T. forsythia*, *P. gingivalis* i *T. denticola*. Bakterie te są silnie powiązane z głębokością kieszonek i krwawieniem podczas sondowania. Kolejnym kompleksem, jest kompleks pomarańczowy, obejmujący podgatunki *F. nucleatum / periodonticum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. micros*, *C. rectus*, *C. gracilis*, *C. showae*, *E. nodatum* i *S. constellatus*. Uważa się, że szczepy wymienione wyżej poprzedzają kolonizację przez gatunki „czerwonego kompleksu”. „Żółty kompleks” natomiast, składał się z 6 gatunków *Streptococcus*: *Streptococcus sp.*, *S. sanguis*, *S. oralis*, *S. medius*, *S. gordonii*, *S. mitis*, a „zielony kompleks” obejmował *C. ochracea*, *C. gingivalis.*, *C. sputigena*, *E. corrodens* i

A.actinomycetemcomitans serotyp a piąty „kompleks purpurowy” składał się z *V.parvula* i *A.odontolyticus*. *A.actinomycetemcomitans* serotyp b, *S.noxia* i *A.naeslundii* *genospecies* 2 (*A. Viscosus*) nie znalazły się w żadnej z powyższych grup ani w grupie ordynacyjnej. Badacze postulowali, iż początkowi kolonizatorzy, choć zwykle niepatogeni należący do kompleksów żółtych, niebieskich, zielonych i fioletowych, inicjują tworzenie biofilmu. Wykazali również, że gatunki niewykazujące bezpośredniego oddziaływania patogennego, stwarzają warunki sprzyjające adhezji drobnoustrojów z kompleksu pomarańczowego, na przykład *P. intermedia*, o której wiadomo, że bierze udział w progresywnym pogorszeniu stanu przyzębia (20). To z kolei może kreować idealne warunki ekologiczne dla gatunków, takich jak *P.gingivalis*, *T.denticola* i *T.forsythia*, wchodzących w skład kompleksu czerwonego, o których wiadomo, że są głównymi sprawcami przewlekłych chorób przyzębia, które przyczyniają się do pogłębienia kieszonek przyzębnych i spontanicznego krwawienia tkanek przyzębia [21,22]. Wyjątkowe zainteresowanie związane z bakteriami *P.gingivalis*, *T. forsythia*, *T.denticola* i *A.actinomycetemcomitans* związane jest z ich szczególnymi cechami manifestującymi się w trakcie progresji choroby przyzębia oraz częstością ich występowania w przebiegu choroby. Jak stwierdzono, kluczem do sukcesu w procesie zasiedlania środowiska jamy ustnej przez te gatunki jest ich bliski związek i możliwość komunikacji. Opisano unikalny aparat komunikacji międzykomórkowej, znany jako „Quorum sensing”, wyczuwanie kworum, sygnalizator zagęszczenia [23,24]. Aparat ten wykorzystuje sygnały chemiczne określane jako autoindukatory, umożliwiające regulację ekspresji genów odpowiedzialną za oporność bakterii na antybiotyki. Fenomen ten wiąże się również ze zdolnością do zahamowania wzrostu gatunków bakterii konkurencyjnych, a jak odkryli Frias i wsp. umożliwia intymną interakcję na poziomie sygnałów pochodzących od drobnoustrojów, takich jak *P.gingivalis*, *P.intermedia* i *F.nucleatum*, zwiększających ich szanse na przeżycie [25]. Interakcje zachodzące pomiędzy różnymi gatunkami i ich dojrzewanie w obrębie biofilmu prowadzi do wzrostu ilości bakterii Gram-ujemnych i beztlenowych, czego wynikiem jest rozwój i postęp stanu zapalnego aparatu przyzębia [26].

1.2.1. P. gingivalis

P.gingivalis jest podstawowym czynnikiem etiologicznym ludzkiego brzeżnego zapalenia przyzębia. Bakteria ta wytwarza liczne czynniki patogenne, w tym

egzotoksynę, endotoksynę (LPS), fimbrie, hemaglutyniny oraz enzymy, które indukują lokalną przewlekłą reakcję zapalną gospodarza, prowadząc w ten sposób do destrukcji przyzębia. Ten gram-ujemny gatunek rozwija się w warunkach beztlenowych, wytwarzając swoją energię w procesie fermentacji aminokwasów, jednakże wymaga hematyny i witaminy K, jako kluczowych składników przetrwania. Ponieważ różne gatunki bakterii posiadają zdolności uniknięcia nadzoru układu odpornościowego swojego gospodarza, inwazyjny mechanizm tego patogenu obejmuje internalizację komórek i tkanek przez wiązanie się z integryną B1 do jej głównego włókna, co w następstwie prowadzi do destabilizacji cytoszkieletu [27]. *P.gingivalis* wykazuje również zdolność do unikania odpowiedzi immunologicznej poprzez penetrację makrofagów i przeżycie w tych komórkach, dzięki aktywnemu wydzielaniu enzymu hydrolizującego ATP i hamowaniu apoptozy makrofagów [28,29]. Dodatkowo, bakterie te unikają zniszczenia przez neutrofile (PMN; ang. Polymorphonuclear leukocytes) poprzez różne czynniki wydzielające [30]. Dla przykładu, Fosfataza serynowa wydzielana przez *P.gingivalis*, modyfikuje odpowiedzi zapalne poprzez powstrzymanie wytwarzania IL-8 przez komórki nabłonka dziąseł poprzez defosforylację seryny S536 podjednostki p65 NF-κB. Proces ten, unieszkodliwia rekrutację PMNów, co w konsekwencji umożliwia *P.gingivalis* na kolonizację kieszonek przyzębnych [30].

Ważnym aspektem jest również zjadliwość niektórych szczepów *P.gingivalis*, które mogą różnić się między poszczególnymi osobami lub nawet w różnych partiach przyzębia u tej samej osoby. Na przykład rodzaje fimbrii, które są krytycznymi determinantami zjadliwości, różnią się w stanach fizjologicznych i patologicznych. U zdrowych osób dorosłych najczęstszym obserwowanym genotypem fimA jest typ I (66,7%), natomiast w grupie chorych z zapaleniem przyzębia, najczęściej wykrywanym jest typ II (43,6%) oraz typ IV (30,9%) [26,27]. W celu pozyskania składników odżywczych, *P.gingivalis* wydziela czynniki wirulencji, tzw. gingipainy, czyli proteazy cysteinowe (rodzina C25), które rozszczepiają wiązania peptydowe Arg-Xaa lub Lys-Xaa. Poprzez degradację tego typu wiązań obecnych w strukturach cytokin, immunoglobulin, składowych dopełniacza czy receptorów komórkowych, patogen może w sposób aktywny unikać działania układu odpornościowego żywiciela [31]. Mechanizm ten wykorzystywany jest przez *P.gingivalis* w celu hamowania aktywności peptydów śluzówkowych, co sprzyja supresji odpowiedzi zapalnej mediowanej przez ludzkie fibroblasty dziąsłowe. Dodatkowo, gingipainy desensytyzują patogenne bakterie na stres oksydacyjny oraz aktywność fagocytarną neutrofilów [31,32].

1.2.2. *T. forsythia*

Patogenami, które również mają istotny udział w procesie destrukcji przyzębia są *T.forsythia* i *T.denticola* [20]. Bakterie te, podobnie jak *P.gingivalis*, włączono do „czerwonego kompleksu”. *T.forsythia* jest Gram-ujemną beztlenową wrzecionowatą bakterią, która wraz z innymi patogenami, wchodzi w skład biofilmu bakteryjnego w miejscach, gdzie postępuje zapalenie przyzębia [33]. Badania wskazują, że szczep ten ma zdolność do współistnienia w komensalnej harmonii z gospodarzem, aczkolwiek jego zakaźny potencjał może prowadzić do zachwiania lokalnej homeostazy i przyczynia się do rozwoju choroby. Zaburzenie stanu równowagi może być wywołane, między innymi, poprzez aktywność proteazy cysteinowej kodowanej przez gen prtH [34]. Do tej pory zidentyfikowano kilka czynników wirulencji *T.forsythia*, są to między innymi: proteaza podobna do trypsyny (Saito, Ishihara, Kato i Okuda, 1997), sialidaza, wydzielana w formie rozpuszczalnej oraz związana z powierzchnią komórki (Braham i Moncla, 1992; Ishikura, Arakawa, Nakajima, Tsuchida i Ishikawa, 2003), alfa-D-glukozydaza i N-acetylo-beta-glukozaminidaza-D-glukozydaza (Hughes, Malki, Loo, Tanner i Ganeshkumar, 2003), hemaglutynina (Murakami, Higuchi, Nakamura, Yoshimura, i Oppenheim, 2002), składniki bakteryjnej warstwy S oraz krystaliczna warstwa powierzchniowa (S-), umożliwiająca przyleganie do komórek nabłonkowych dziąseł i ich zasiedlanie. Ze względu na obecność lipolisacharydu (LPS), warstwa ta ma negatywny wpływ na wydzielanie cytokin prozapalnych oraz hamuje aktywację elementów składowych wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [35]. Ponadto, białko BspA, należące do rodziny białek zawierających powtórzenia bogate w leucynę (LRR; ang. leucine rich repeats), stymuluje syntezę cytokin prozapalnych przez monocyty na szlaku zależnym od TLR2 (Hajishengallis i wsp. 2002) oraz pobudza ekspresję chemokin typu CXCL5 w mysich komórkach preosteoblastycznych (Ruddy, Shen, Smith, Sharma i Gaffen, 2004). Zwiększona obecność prozapalnych mediatorów wpływa na rekrutację neutrofilii, co w konsekwencji może wywoływać lokalny stan zapalny i powodować destrukcję tkanek.

Opisana została interakcja między *P.gingivalis* i *T.forsythia*. Wykazano, iż pęcherzyki błony zewnętrznej *P.gingivalis* ułatwiają adhezję i umożliwiają wnikanie do komórek nabłonkowych bakteriom *T.forsythia*. Przy użyciu mysiego modelu *in-vivo* wykazano wyższe prawdopodobieństwo utworzenia ropnia w trakcie jednoczesnego zakażenia *P.gingivalis* i *T.forsythia*. Dodatkowo, ekstrakt uzyskany z bakterii *T.forsythia* dodany

do hodowli wzmacniał potencjał wzrostu *P.gingivalis*. Synergia obserwowana pomiędzy tymi dwoma patogenami zwiększa ryzyko pogorszenia się stanu zapalnego przyzębia [36].

1.2.3. F.nucleatum

Innym patogenem zaangażowanym w różne procesy rozkładu przyzębia i progresji choroby są gram-ujemne gatunki *Fusobacterium*, zwłaszcza jądro *Fusobacterium*. Patogeny z tej grupy, poprzez białka RAdD i Fap2 obecne na powierzchni zewnętrznej, rozwinęły potencjał do agregacji z wczesnymi i późnymi kolonizatorami. Białka te wykorzystywane są przez bakterie jako czynniki wirulencji, odpowiednio dla przylegania do patogenów Gram-dodatnich i *P.gingivalis*, jak również powodują śmierć ludzkich limfocytów [37]. *F.nucleatum* jest gatunkiem beztlenowym, jednakże bakteria ta rozwinęła cechy umożliwiające jej adaptację do środowiska bogatego w tlen, dzięki czemu wspierają wzrost innych bakterii beztlenowych, w tym *P.gingivalis* [38,39].

1.2.4. A.actinomycetemcomitans

Chociaż bakterie „czerwonego kompleksu” dominują w kieszonce przyzębnej, inny patogen, *A.actinomycetemcomitans*, bakteria Gram-ujemna, a zwłaszcza serotypy A, B i C, są znane z odgrywania znaczącej roli w przewlekłych i agresywnych postaciach chorób przyzębia. Interakcja jego czynników wirulencji z fibroblastami i komórkami nabłonkowymi gospodarza, może prowadzić do ciężkiej reakcji zapalnej [40,41]. Głównym składnikiem wirulentnym tego patogenu indukującym stan zapalny jest leukotoksyna. Substancja ta aktywuje i nasila resorpcję kości przez kaspazę-1 syntezowaną przez monocyty i makrofagi [42]. Dodatkowym czynnikiem odgrywającym istotną rolę w patogenezie *A.actinomycetemcomitans* są cytoletalne toksyny rozciągające, tzw. toksyny CDT (CDT; *ang.* cytolethal-distending toxins). Toksyny te poprzez indukcję ekspresji białka RANKL, generują produkcję osteoklastów oraz wywierają negatywny wpływ na fibroblasty i limfocyty T, prowadząc do postępu choroby przyzębia [43,44]

1.2.5. Inne patogeny

Wśród wielu innych bakterii zaangażowanych w progresję i rozwój zapalenia przyzębia znajdują się *P.intermedia*, *C.rectus*, *P.micros* i gatunki *Spirochetes* [45]. Wskazano również, że różne wirusy, np. wirus opryszczki, są aktywnie zaangażowane w proces agresywnego zapalenia przyzębia [46]. Dodatkowo, wiele różnych grzybów, w tym *C.albicans*, zostało wyizolowanych u osób z pierwotnymi i nabytymi niedoborami odporności, odgrywającymi rolę w destrukcyjnym procesie utraty przyzębia we współpracy z innymi periodontopatogenami [47,48].

1.3.1. Diagnostyka periodontopatogenów

W toku ewolucji mikroorganizmy rozwinęły wiele sposobów, dzięki którym mogą przyczyniać się do utraty przyczepu łącznotkankowego przyzębia [49]. Opisano kilka metod umożliwiających, w warunkach klinicznych, określenie dotychczasowego stanu przyzębia. Obejmują one ustalenie głębokości kieszonki przyzębnej (PD; *ang* periodontal depth). przy użyciu sondy periodontologicznej, oszacowanie obecności spontanicznego krwawienia (BOP; *ang* bleeding on probing) oraz określenie ilości płytki nazębnej (PI; *ang* plaque index). Pomocniczą metodą diagnostyczną jest sondowanie kości, a także analiza radiograficzna [15], jednakże diagnoza kliniczna charakteryzuje się pewnymi ograniczeniami i nie pozwala w pełni na określenie podstawowej przyczyny rozwijającego się procesu chorobowego, jego patogenezę lub rokowania. Dlatego też możliwość szybkiej analizy molekularnej przeprowadzanej w warunkach ambulatoryjnych w celu jakościowego i ilościowego określenia składu i rodzajów patogenów przyzębia, odgrywa zasadniczą rolę w planowaniu szczegółowych procedur terapeutycznych, mających za zadanie ustabilizowanie postępu choroby [50].

1.3.2. Metody mikrobiologiczne

Przez wiele lat metody mikrobiologiczne, tzw. posiewowe, uznawano jako złoty standard diagnostyczny. Różne metody hodowli umożliwiły badaczom identyfikację ponad 700 różnych gatunków bakterii. Zaletą owej metody jest możliwość oceny żywych mikrobów, rozpoznanie żywych komórek bakteryjnych, a także ilościowe oznaczenie komórek w próbce. [52]. Ponadto, przy odpowiednich mediach, możliwe jest uzyskanie wysokiej

czułości. Chociaż tradycyjne metody mikrobiologiczne mają swoje oczywiste zalety, posiadają również kilka ograniczeń. Większość patogenów obecnych w głębokich kieszonkach przyzębia jest beztlenowa i wymaga specyficznych warunków wzrostu. Taki rodzaj metabolizmu utrudnia hodowlę, powoduje problemy z pobieraniem i transportem próbek, co w konsekwencji może prowadzić do błędnych wyników i wniosków diagnostycznych. Trudności obejmują również: utrzymanie żywotności bakterii, długi czas oczekiwania na diagnozę, niezdolność do rozróżnienia między blisko spokrewnionymi taksonami oraz niskie wartości wykrywania 10^3 - 10^4 bakterii. Metody hodowlane umożliwiają identyfikację większości patogenów zasiedlających jamę ustną, ale nie dają możliwości identyfikacji *T.forsythia*. W porównaniu do technik mikrobiologicznych, techniki molekularne pozwalają na bardzo szczegółową detekcję zróżnicowanych taksonów poprzez amplifikację fragmentów DNA specyficznych dla konkretnych patogenów [51,52,53].

Rosnące zapotrzebowanie na precyzję, szybkie wykrywanie i oznaczanie ilościowe patogenów przyzębia wymagało zaangażowania nowoczesnych metod analitycznych, takich jak cytofluorymetria przepływowa, hybrydyzacja DNA-DNA, testy immunochemiczne lub metody enzymatyczne. Niestety, ich niedostatecznie zadowalająca specyficzność i czułość, a także czas i koszty wykonania skłoniły badaczy do poszukiwania nowych sposobów detekcji [54,55]. Aby poprawić precyzję i znacznie skrócić czas identyfikacji patogenów, zaprojektowano testy bazujące na technikach molekularnych, umożliwiające identyfikację jeszcze bardziej zróżnicowanych taksonów, poprzez specyficzną amplifikację DNA oraz identyfikację różnych wymagających gatunków, aktywnie uczestniczących w rozpadzie przyzębia, których hodowla jest znacznie utrudniona bądź niemożliwa [56].

1.3.3. PCR (Reakcja Polimerazy Łańcuchowej)

Wraz z pojawieniem się technik molekularnych, opracowano reakcję łańcuchową polimerazy (PCR), stosowaną jako narzędzie diagnostyczne do precyzyjnego, czułego i szybkiego oznaczenia wielu patogenów przyzębia, takich jak: *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *T.forsythensis* i *T.denticola* [59,60].

PCR jest czułą metodą wykrywania drobnoustrojów, jednakże jej skuteczność może być ograniczana poprzez podatność na błędy spowodowane obecnością inhibitorów polimerazy DNA obecnej w próbkach klinicznych. Substancje takie jak hemoglobina,

heparyna i EDTA obecne podczas pobierania materiału do badań, a także alkohole, detergenty i sole wykorzystywane w procesie izolacji DNA, mogą obniżać efektywność reakcji, a nawet ją hamować. Ponadto nieodpowiednie przechowywanie próbek czy zbyt częste ich zamrażanie i rozmrażanie, również mogą znacząco zmienić potencjał diagnostyczny tej metody. Istotnym ograniczeniem ambulatoryjnego wykorzystania techniki PCR jest konieczność posiadania wysoce specjalistycznego sprzętu, który poza wysokimi kosztami, wymaga profesjonalnej obsługi, co dyskwalifikuje jego użytkowanie poza dobrze kontrolowanymi warunkami laboratoryjnymi [61,62].

W celu przeprowadzenia oceny obecności patogenów bakteryjnych w próbkach materiału klinicznego metodą PCR, najczęściej wykorzystuje się, tzw. rybotypowanie. W tym celu stosuje się sekwencje genów kodujących małe (16S) i duże (23S i 5S) podjednostki bakteryjnych rybosomów. Najpowszechniej wykorzystuje się sekwencję odpowiadającą za syntezę rybosomalnego genu 16 rRNA. Jest to wysoce konserwatywna sekwencja pozwalająca na konstrukcję uniwersalnych starterów dla bardzo zróżnicowanej grupy patogenów [131]

Jednakże uważa się, że sekwencja ta ma ograniczoną wartość przy identyfikacji gatunków, ze względu na słabą rozdzielczość i niską skuteczność dokładnego rozróżnienia blisko spokrewnionych gatunków [57]. Z tego powodu, inne wysoce konserwatywne regiony, stają się bardzo interesujące w celu dokładnego przeprowadzenia badań taksonomicznych prokariotów [58].

1.3.4. Real-Time PCR (Reakcja PCR w czasie rzeczywistym)

Od 1983 roku, kiedy to Kary Mullis opracował łańcuchową reakcję polimerazy, technika ta ulegała licznym modyfikacjom, umożliwiając rozszerzenie jej możliwości. PCR połączono m.in. z reakcją odwrotnej transkrypcji fragmentu RNA-RT-PCR (RT, ang. reverse transcription); PCR-RFLP (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism) - reakcja PCR połączona z analizą restrykcyjną produktów amplifikacji. Wprowadzenie reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. real-time PCR) inaczej tzw. reakcji ilościowej (qPCR; ang. quantitative PCR), wykorzystującej barwniki fluorescencyjne, umożliwiło pełne monitorowanie reakcji i analizę ilościową produktów amplifikacji [59]. Wyjątkowość tego analitycznego podejścia polega na chemii reakcji. Metoda Real-time PCR może być przeprowadzona poprzez wykorzystanie niespecyficznych barwników

oraz specyficznych sond. Dostępne są barwniki wiążące DNA, takie jak EtBr lub SYBR Green I oraz sondy do hydrolizy, sondy hybrydujące, latarnie molekularne, sondy do rozświetlania kwasu nukleinowego peptydów, sondy do starterów wschodu i skorpionia. Dla przykładu, podczas niespecyficznego reakcji amplifikacji z wykorzystaniem barwnika Sybr Green I, barwnik wiąże się z mniejszym rowkiem dwuniciowego kwasu dezoksyrybonukleinowego (dsDNA), umożliwiając 1000-krotnie większą fluorescencję niż w sytuacji, w której dsDNA występuje w wolnej jego formie. Rosnąca ilość dsDNA obecna w próbówce reakcyjnej, prowadzi do większej ilości związanych barwników oraz wzrostu sygnału fluorescencyjnego z SYBR Green I. Zaletą owej metody jest stosunkowo niski koszt oraz łatwość użycia. Jednakże, zastosowanie metody, w której dsDNA wiąże się z niespecyficznymi barwnikami, może znacznie zaburzyć swoistość testu [64]. Niespecyficzne produkty odzwierciedlone są na krzywej dysocjacji amplifikowanego produktu jako niespecyficzne piki. Niezmiernie ważne jest precyzyjne zaprojektowanie podkładu, w celu uniknięcia uzyskania niespecyficznych produktów końcowych. Problem specyficzności testu został potencjalnie zredukowany poprzez wykorzystanie sondy hydrolitycznej, Taq-man, specyficznej dla danej sekwencji, poprzez podwójne znakowanie fluoroforem oligonukleotydy DN [63]. Metoda ta wykorzystuje 2 fluorofory znane jako wygaszacz oraz reporter. Wygaszacz i reporter znajdują się w bliskiej odległości na tych samych krótkich oligonukleotydach. Wygaszacz, posiada zdolność absorpcji sygnału z reportera podczas amplifikacji. Podczas wzmożonej aktywności polimerazy 5'-nukleazy DNA, dochodzi do rozerwania oligonukleotydu, a reporter i wygaszacz oddzielają się, umożliwiając uwolnienie sygnału fluorescencyjnego reportera. Precyzja sond hydrolitycznych jest bardzo zbliżona do SYBR Green I, aczkolwiek sonda Taq Man daje w wyniku zwiększoną fluorescencję, która jest wprost proporcjonalna do sekwencji docelowej, w efekcie prowadząc do wysoce specyficznego produktu, z powodu dokładnej hybrydyzacji między sondą a sekwencją docelową [63,64].

W większości przypadków badania molekularne przyzębia skupiają się na wykrywaniu pojedynczych bakterii, jednakże grupa badawcza z Hiszpanii przeprowadziła wielowymiarową analizę analityczną patogenów przyzębia. Wykorzystując specyficzne sondy typu TaqMan, przeprowadzono reakcję qPCR wobec bakterii *A.actinomycetemcomitans* (Aa), *F.nucleatum* (Fn), *P.micra* (Pm), *P.gingivalis* (Pg), *P.intermedia* (Pi), *T.forsythia* (Tf), and *T.denticola* (Td) [65].

Analiza statystyczna przeprowadzona za pomocą krzywej ROC, wskazującej czułość i swoistość modelu skupiającego osiem bakterii, wykazała wartość powyżej 75% AUC=0,760. Analiza oraz wewnętrzna weryfikacja modeli patogennych bakterii, umożliwiły identyfikację różnych stanów zapalenia przyzębia oraz ujawniły możliwość występowania skupisk utworzonych przez gatunki bakterii o różnej roli etiopatogennej [65].

1.3.5. Multipleksowy Real-Time PCR

Kolejnym innowacyjnym podejściem, było utworzenie przez grupę Lochmana szybkiej multi-pleksowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym, której głównym celem było 10 gatunków bakterii związanych z próchnicą (kompleks „próchnicowy”), patogenów z kompleksów czerwonych i pomarańczowych oraz *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [66]. Celem tego badania było opracowanie ilościowego narzędzia do specyficznej oraz czulej analizy mikrobiologicznej próbek biofilmu poddziąsłowego i płytki nazębnej pobieranych zarówno od dorosłych, jak i dzieci (2-6 lat). Efektywność amplifikacji oraz granica wykrywalności (LOD; ang Limit of detection), zostały określone przy użyciu zoptymalizowanego stężenia oligonukleotydów i profilu amplifikacji oraz z wykorzystaniem mieszaniny plazmidów zawierających matryce bakteryjnego DNA wszystkich czterech grup bakterii. Skuteczność amplifikacji R2 mieściła się w zakresie od 0,93 do 1,16, gwarantując wysoką spójność i powtarzalność testu. [66]. Wartość całkowitej zawartości bakterii (TB) dla bakterii próchnicowych i patogenów z kompleksu czerwonego, wykorzystano w testach multipleksowych w celu wyeliminowania różnic w ilościach spowodowanych pobraniem próbek. W wyniku przeprowadzonej analizy zaobserwowano różnicę istotną statystycznie między kompozycjami drobnoustrojów wykrytych w grupie kontrolnej oraz w próbkach z próchnicą oraz chorobą przyzębia ($p < 0,05$) [66].

1.3.6. Systemy diagnostyczne do analizy periodontopatogenów

Bardzo istotnym parametrem analitycznym jest czas detekcji patogenu. W związku z tym, z klinicznego punktu widzenia, jego maksymalne skrócenie jest wysoce pożądane. Aby ułatwić skrupulatne wykrywanie patogenów przyzębia, powstało wiele testów umożliwiających lekarzom diagnostykę w gabinecie stomatologicznym. Jedną z takich

propozycji jest system DiamondProbe/Perio 2000, składający się z sondy określającej w obrębie bruzdy dziąsłowej stężenie wielu form siarczków (HS, H₂S i CH₃SH), co pozwala na wykrycie gatunków beztlenowych bakterii Gram-ujemnych [67]. Kolejnym testem jest Evalusite. Jest to enzymatyczny test immunologiczny (ELISA) opracowany do wykrywania specyficznych antygenów patogenów poddziąsłowych, takich jak *P.gingivalis*, *P.intermedia* oraz *A.actinomycescomitans*. Podstawową zaletą tej metody jest możliwość jednoczesnego badania wielu próbek. Wykazano, że wykrywalność patogenów przyzębia była bardziej prawdopodobna, gdy próbki pobierano z głębszych kieszonek. Główną wadą tego testu jest subiektywny punkt końcowy kalorymetrii oraz niska czułość na poziomie 28% dla *A.actinomycescomitans* i 52% dla *P.gingivalis*. Jakkolwiek, swoistość testu sięgała 98% dla obu powyższych patogenów [67].

Bardziej przyjazne dla użytkownika systemy, takie jak PerioScan, Oral-B Laboratories, DentoCheck, PerioCheck, wykorzystują syntetyczny substrat hydrolizowany przez peptydazy bakterii *P.gingivalis*, *T.forsythia* i *T.denticola*, tzw. BANA (Na-benzoilo-DL-arginino-2-naftyloamid), umożliwiając wizualizację kolorymetryczną odczytywanego wyniku. Czułość tego markera sięga 99%, a jego swoistość osiąga wartość 55%. Niestety, jeżeli badany organizm nie syntetyzuje enzymu podobnego do trypsyny, taki patogen nie zostanie wykryty. Podobnie jak w przypadku testu Evalusite, skuteczność wykrywania w systemie PerioScan polega na ocenie kalorymetrycznego punktu końcowego, co czyni ten test dość subiektywnym [67].

Testy takie jak Micro-IDent® i micro-IDent®plus wraz z PerioBac Test, DMDx-PathoTek, IAI PadoTest 4.5 pozwalają na jakościowe i ilościowe wykrywanie od 5 do 9 różnych periopatogenów oraz grupowanie ich w specyficzne kompleksy Socransky'ego za pomocą sond DNA wykorzystujących reakcję PCR [68].

Ponadto test diagnostyczny PET (MipPharma, Niemcy) wykrywa wiele fragmentów DNA 9 różnych patogenów za pomocą testu Real-Time PCR. Jednakże test wykorzystujący reakcję Real-Time PCR wymaga specjalistycznego sprzętu w warunkach laboratoryjnych. Fakt ten sprawia, iż ambulatoryjne określenie metody leczenia jest utrudnione, a przez to nieatrakcyjne [67].

W ostatnim czasie zespół naukowców z Austrii, wybrał mieszaninę 16 losowo zebranych szczepów bakteryjnych jako wzorzec odniesienia do następujących zestawów testowych: ParoCheck®Kit 20, micro-IDent®plus1 i Carpegen® Perio Diagnostik. Uzyskany DNA został sprawdzony za pomocą specyficznych wewnętrznych starterów PCR i przesłany do analizy. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że zestaw Carpegen® Perio

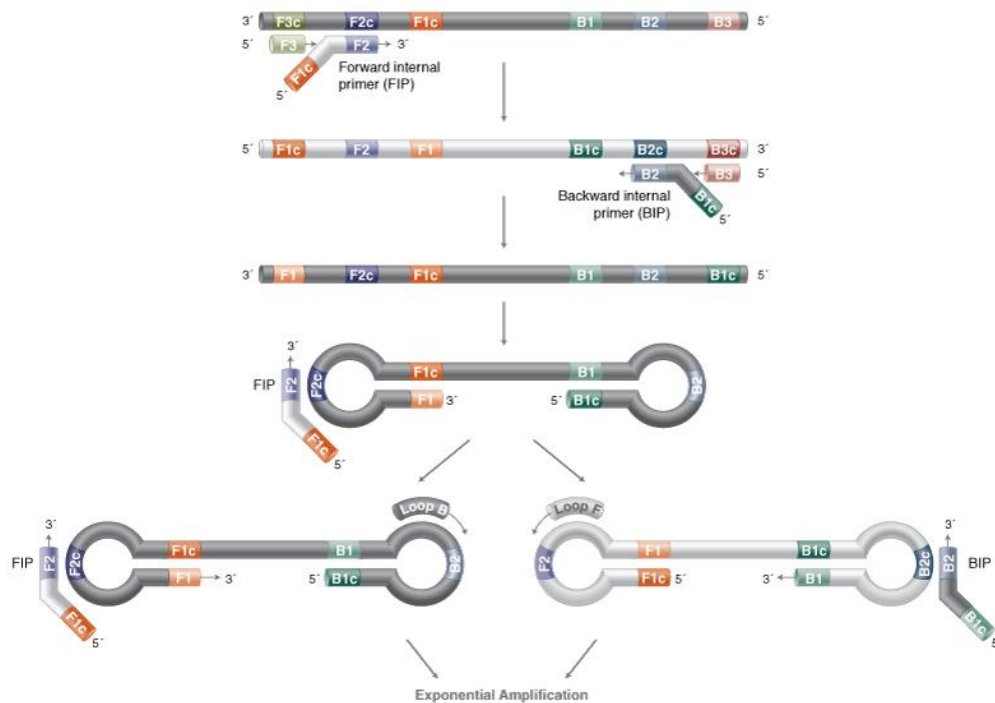
Diagnostik wykazał zdolność do wykrywania sześciu gatunków z czerwonego, zielonego i pomarańczowego kompleksu w oparciu o Real-Time PCR, umożliwiając w ten sposób porównania ilościowe. Chociaż pozostałe dwa zestawy umożliwiają przeprowadzenie jedynie analizy półilościowej bazującej na wykorzystaniu technologii pasków DNA lub chipów DNA, to pozwalają na detekcję szerszej gamy gatunków bakterii. Na przykład testem micro-IDent®plus11 można wykryć patogeny zaliczane do żółtego kompleksu, podczas gdy ParoCheck®Kit 20 kompleksy fioletowe i niebieskie, co zapewnia dodatkową wartość diagnostyczną i terapeutyczną [69].

1.3.7. LAMP - Loop Mediated Isothermal Amplification

W odpowiedzi na wzrost zapotrzebowania na nowe metody detekcji patogenów niewymagające zaawansowanego sprzętu, Notomi wraz ze współpracownikami opracowali technikę amplifikacji izotermicznej za pośrednictwem pętli (LAMP; *ang* Loop mediated Isothermal amplification.) [70]. To nowe narzędzie molekularne stworzono w celu identyfikacji i diagnostyki bakterii. O wyjątkowym charakterze tej metody świadczy wysoka specyficzność i skuteczność analizy oraz łatwość zarządzania. Ostatnio na rynek wprowadzono różne zestawy komercyjne LAMP, w tym testy do wykrywania bakterii *Salmonella*, *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes* [71]. Technika LAMP umożliwia również identyfikację wielu wirusów DNA, takich jak HSV, Adenowirus, HBV, HSV-1, HSV-2 i VZV-1 [72,73,74]. Ponadto metodę amplifikacji izotermicznej wykorzystano również do wykrywania pasożytów, np. Toksoplazmozy [75]. Posługując się bromkiem etydyny oraz CuSO₄ opracowano test dla LAMP służący do identyfikacji płci bydłowej, natomiast połączenie LAMP z immunochromatografią umożliwiło wykrywanie genetycznie modyfikowanej żywności [76]. Przydatność LAMP jako narzędzia diagnostycznego wiąże się ze znacznym uproszczeniem procedury analitycznej. Dotyczy to głównie znacznego skrócenia czasu reakcji, dzięki wyeliminowaniu konieczności cyklicznego osiągnięcia różnych temperatur przez blok grzejny oraz eliminacji wstępnego etapu denaturacji DNA, dzięki zastosowaniu polimerazy DNA (GspSSD) wykazującej zdolność do przemieszczania splotu DNA wysokiej specyficzności reakcji, poprzez zastosowanie czterech starterów, a także zwiększenia wydajności reakcji [70,77]. Inną zaletą metody LAMP jest minimalizacja kosztu aparatury niezbędnej do przeprowadzenia testu. Wymaga jedynie inwestycji w konwencjonalny blok grzewczy lub łąźnię wodną konieczną do uzyskania warunków

izotermicznych [78]. Ponadto, technika ta daje możliwość szybkiego wykrywania bakterii nawet w obecności niespecyficznych sekwencji DNA, które mogłyby potencjalnie zaburzyć specyficzność reakcji [79]. LAMP, a także inne techniki izotermiczne, takie jak, WGA (*ang* Whole Genome Amplification), (SDA; *ang* Strand Displacement Amplification), HAD (*ang* Helicase Displacement Amplification) (RPA: *ang* Recombinase Polymerase Amplification, NASBA: *ang* Nucleic Acid Sequences Based Amplification), eliminują potrzebę etapu denaturacji DNA poprzez zastosowanie polimeraz takich jak Polymeraza Bst, Polymeraza Phi 29, Klenow Fragment (3'→5' exo) oraz Polimeraza T7 RNA [156].

Metoda LAMP składa się z mieszaniny co najmniej czterech specyficznych sekwencji, które obejmują dwa startery zewnętrzne, F3 i B3, dwa wewnętrzne, FIP i BIP oraz startery pętlowe. Pętla macierzysta jest zbudowana z sekwencji DNA pochodzących z wewnętrznej struktury starterów [78]. Miejszem inicjacji syntezy DNA jest główny koniec pętli macierzystej 3'. Następnie jeden wewnętrzny starter wiąże się z pętlą do produktu LAMP, zapewniając aktywność przesunięcia nici i w efekcie wytwarzając oryginalny DNA trzpień-pętla wraz z nowym DNA trzpień-pętla, który jest dwa razy dłuższy niż pętla pierwotna.



Rycina 1 - Amplifikacja izotermiczna za pośrednictwem pętli (LAMP) wykorzystuje mieszaninę 4-6 starterów rozpoznających 6-8 odrębnych regionów docelowego DNA. Polimeraza DNA wypierająca nie inicjuje syntezę, a 2 startery tworzą struktury pętlowe, w celu ułatwienia kolejnych etapów amplifikacji
<https://international.neb.com>

Końcowymi produktami są pętle macierzyste oryginalnej docelowej sekwencji DNA, wygenerowane w ciągu około godziny [79]. Metoda ta pozwala na bardzo wydajną i specyficzną amplifikację danego fragmentu DNA, przy wykorzystaniu co najmniej dwóch komplementarnych starterów DNA, ale jeśli to konieczne, istnieje również możliwość zastosowania do sześciu starterów, co zapewnia wyjątkowo wysoką specyficzność reakcji. Hybrydyzacja do 100-250 par zasad (pz) pozwala na szybką identyfikację patogenu; 10^9 kopii utworzonych w mniej niż 30 minut [79].

1.3.8. Modyfikacje metody LAMP

W 2017 roku w celu ulepszenia metody LAMP, Martineau i wsp. zastosowali wysokie stężenie starterów tzw. „Swarm primers”, które umożliwiają tworzenie nowych amplikonów. Unikalną zaletą tych starterów jest ich zdolność do przyłączenia się do regionu znajdującego się powyżej sekwencji rozpoznających startery FIP/BIP na przeciwnych niciach, pokrywających się zasadniczo z miejscami F1/B1, bez znacznego przeciążania kompleksowości testu. Do stworzenia testu wykorzystano 3 matryce DNA: faga Lambda, gen RbcL *Synechocystis* sp. pcc 6803 oraz ludzki gen HFE. Dodanie „Swarm primers” spowodowało zwiększoną szybkość amplifikacji, uzyskano zwiększony kontrast wskaźnika oraz zwiększoną ilość produktów reakcji. Monitorowanie w czasie rzeczywistym i tworzenie wielu kopii DNA w systemie zamkniętych probówek, zminimalizowało ryzyko zanieczyszczenia. Ponadto, jeżeli jest konieczność wykonania testu w warunkach pozalaboratoryjnych, końcowy wynik reakcji można zaobserwować gołym okiem, za pomocą dodania związków takich jak pirofosforan magnezu ($Mg_2P_2O_7$), kalceina, zieleń SYBR I lub błękit hydroksynaftolowy. (HNB). [80,75].

W ostatnim czasie technologia LAMP została wykorzystana do opracowania nowego, dwukolorowego testu RT-LAMP, służącego wykrywaniu RNA wirusa SARS-COV-2. W tym celu matrycą dla specyficznych starterów jest sekwencja genu kodującego białko nukleokapsydu wirusa (N). Porównanie testu RT-LAMP do RT-qPCR wykazało, iż wskaźnik wykrywania RNA wirusa SARS-CoV-2 mieścił się w zakresie czułości i swoistości odpowiednio 97,5% i 99,7%. Opracowano również test wymazowy, niewymagający etapu izolacji RNA, który wykazywał wysoką wartość specyficzności na poziomie 99,5%, aczkolwiek w porównaniu z oryginalnym testem RT-LAMP, charakteryzował się zmniejszoną wartością czułości wynoszącą 86% [81].

1.3.9. Wady metody LAMP

Podobnie jak inne techniki, także LAMP wykazuje pewne ograniczenia. Ponieważ końcowy produkt reakcji składa się z wielu konkatamerów o dużych rozmiarach i struktur pętlowych, ich obecność utrudnia jego wykorzystanie w procesie klonowania [82]. Wysoka czułość i specyficzność LAMP może być osiągnięta dzięki zastosowaniu większej liczby starterów (4-6). Jednakże uzyskanie prawidłowej sekwencji docelowej do amplifikacji dla stosunkowo silnie konserwowanego regionu specyficznego dla danego drobnoustroju w 6-8 regionach DNA może być znacznie utrudnione. Ponadto, wykorzystanie tak dużej liczby starterów zwiększa ryzyko fałszywie pozytywnego wyniku związanego z powinowactwem nakładania się sekwencji starter-starter, co wymagałoby dalszej walidacji [77]. W związku z tym, że stabilność produktu LAMP jest bardzo wysoka, a sam produkt bardzo trudno ulega degradacji, może to zwiększyć prawdopodobieństwo zanieczyszczenia, a w efekcie generować wyniki fałszywie dodatnie. Można temu zapobiec poprzez stosowanie końcówek do pipet automatycznych zawierających filtry, specjalnie zaprojektowanych pipet oraz użycie komory z laminarnym przepływem powietrza [83]. Problematyczna może być wizualna ocena produktu powstającego w trakcie testów turbidymetrycznych i kolorymetrycznych, co sprawia, że analiza reakcji LAMP może mieć wysoce subiektywny charakter, zależny od percepcji koloru [83]. Dodatkowo, model drabinkowy produktu końcowego, a nie specyficzny wzór prążków obserwowany w klasycznej reakcji PCR, uniemożliwia określenie rozmiaru produktu [82,84].

1.3.10. Detekcja periodontopatogenów metodą LAMP

Pomimo potencjalnych ograniczeń, technikę LAMP można z powodzeniem wykorzystać do wykrywania patogenów przyzębia. Yoshida i wsp. przeprowadzili ocenę czułości tej metody w teście umożliwiającym detekcję gatunków periodontopatycznych. W celu określenia dolnej granicy czułości testu, badacze wykonali seryjne rozcieńczenia chromosomów. W wyniku przeprowadzonych analiz ustalono, że w czasie jednej godziny reakcji z zastosowaniem zestawu starterów dla *P.gingivalis*, bez wykorzystania zestawu starterów pętlowych, granica wykrywalności wynosiła 1 µg/probówkę. Jednak po dodaniu starterów pętlowych, współczynnik wykrywania danych sekwencji istotnie wzrastał i porównywalny wynik osiągnięto już po 30 minutach reakcji [85]. Meada i wsp.

osiągnęli kwantyfikację *P.gingivalis* poprzez monitorowanie reakcji LAMP w czasie rzeczywistym za pomocą barwnika fluorescencyjnego SYBR Green I z liniowością w zakresie 10 (2) -10 (6) komórek, pokazując prawie identyczne wyniki, jak w przypadku konwencjonalnego PCR w czasie rzeczywistym, z przewagą szybkości na korzyść metody LAMP [86]. W innym badaniu Mijagawe i wsp. wykorzystując technikę LAMP zbadali obecność 8 różnych patogenów. W tym badaniu wykorzystano 6 odrębnych sekwencji w obrębie genu 16s. Produkty reakcji wykryto metodą elektroforezy w 2% żelu agarozowym. We wszystkich reakcjach zaobserwowano obecność ampliconów dla wszystkich badanych patogenów przyżęcia z wyekstrahowaną matrycą DNA zawierającą 10^3 komórek. Po przeprowadzeniu reakcji, w której połączono matryce DNA wszystkich gatunków (po 10^3 komórek każdego gatunku), nie wykazano ampliconu [87].

Sumay i wsp. opracowali metodę kolorymetryczną do wykrywania *P.gingivalis*, *T.forsythia* i *T.denticola*. W tym celu wykorzystano klasyczną metodę fenotypową oraz metodę kolorymetryczną LAMP. W reakcji LAMP zastosowano cztery pary starterów ukierunkowanych na geny 16S rRNA wraz ze starterami pętlowymi kolorymetrycznego Master Miksu zawierającego polimerazę DNA *Bst* i czerwień fenolową do wykrywania tworzonych ampliconów. Badanie fenotypowe wykazało różnorodność cech izolatów tego samego szczepu. W ciągu zaledwie 30 minut, LAMP umożliwił identyfikację poszczególnych szczepów periopatogenów w wysoce specyficzny i szybki sposób w połączeniu z wizualną interpretacją wyników, zarówno z wyekstrahowanego DNA, jak i bezpośrednio z całych komórek [88].

Liu i wsp. opracowali metodę detekcji izotermicznej zwaną MB-LAMP (amplifikacja molekularnej pętli izotermicznej), łączącą LAMP i qPCR. Zaletą tego testu jest zastosowanie molekularnej sondy ostrzegawczej, LFP (*ang.* Loop Forward Probe) lub LBP (*ang.* Loop Backward Probe), która minimalizuje niespecyficzną amplifikację fragmentów DNA i umożliwia wyższą specyficzność niż tradycyjna metoda LAMP. Metoda ta oferuje zwiększony potencjał wykrywania *P.gingivalis*, poprzez celowanie w określony fragment genomu patogenu, a także uzyskanie wysokiej czułości. W ciągu 20 minut granica wykrywalności wynosiła tylko 10^{-4} pM lub 10^{-7} ng μ L. Istotnym aspektem tej metody był fakt, iż wydłużenie czasu reakcji nie pozwoliło na wykrycie niższych stężeń kwasów nukleinowych, które mogłyby być uznane za fałszywie dodatnie. W przypadku reakcji qPCR, wyniki pozytywne uzyskiwane powyżej 35 cyklu, uważano za fałszywie dodatnie. Metoda nie wykazała reakcji krzyżowych z 14 innymi patogenami, a także wykazała wysoką czułość oraz swoistość na poziomie 100%. Ponadto, MB-LAMP

okazała się metodą znacznie szybszą niż qPCR w czasie rzeczywistym, co pozwoliło na skuteczniejszą diagnostykę badanych patogenów [89].

1.3.11. Wizualna detekcja produktów LAMP

Większość z wymienionych metod analitycznych może być wykonywana jedynie w idealnych warunkach laboratoryjnych przy użyciu skomplikowanego sprzętu i w wydłużonym czasie pracy. Jednakże zastosowanie wielu metod wykrywania produktów końcowych znacznie poszerza dostępność techniki LAMP. Jedną z odmian tej metody pozwala na wykrycie produktu końcowego powstającego w formie zmętnienia, uzyskanego dzięki zastosowaniu pirofosforanu magnezu ($Mg_2P_2O_7$) przy gęstości optycznej 650. Metodę tę wykorzystano do monitorowania w czasie rzeczywistym obecności mikroorganizmów, takich jak *Mycoplasma pneumoniae* [90]. Wadą tej techniki jest to, że wymaga długiego czasu inkubacji (≥ 60 min), a wizualizacja uzyskanego produktu może być utrudniona nawet w idealnych warunkach [91].

Inne metody bezpośredniego wykrywania produktów końcowych reakcji wykorzystują interkalację kalceiny, zieleni SYBR I i błękitu hydroksynaftolowego (HNB). Dla przykładu, dodanie kalceiny przed inkubacją izotermiczną, umożliwia utworzenie nierozpuszczalnego kompleksu, powodując fluorescencyjną reakcję pirofosforanu manganu [92]. Reakcja pozytywna prowadzi do powstania koloru pomarańczowego, podczas gdy negatywny wynik końcowy pozostaje ciemny [92]. Alternatywnym podejściem jest zastosowanie barwnika SYBR green I. Choć ten interkalujący fluorochrom wykazuje dobrą czułość, jego wadą jest zdolność do inhibicji reakcji LAMP przez zanieczyszczenie aerozolem [93]. Problem związany z zanieczyszczeniem produktu reakcji aerozolem rozwiązano przez zastosowanie HNB, co pozwoliło uzyskać niebieską barwę końcowego produktu reakcji LAMP [93]. Jednakże substancja ta nie wykazuje aktywności fluorescencyjnej, dlatego jej zastosowanie umożliwia jedynie ocenę reakcji barwnej [93].

Poważnym ograniczeniem zastosowania kalceiny jest konieczność włączenia do mieszaniny reakcyjnej jonowej formy manganu, która może mieć hamujący wpływ na aktywność polimerazy [94]. Słabą stroną barwników takich jak kalceina oraz HNB jest również wydłużony czas reakcji oraz stosunkowo niskie wartości czułości >100 – 1000 kopii docelowego DNA [95,96]. Wprowadzenie barwników wrażliwych na zmiany pH umożliwiło pokonanie tych wad. W trakcie procesu włączania deoksynukleozydów

trifosforanu do nowej nici DNA, polimeraza DNA uwalnia dwa produkty uboczne: grupę pirofosforanową i jon wodorowy. Uwalnianie protonów podczas tego procesu zostało wykorzystane jako podstawa różnych metod wykrywania. Zdolność polimerazy DNA do pełnienia swojej funkcji w zakresie wartości pH obniżonej o 2-3 jednostki, pozwoliła na szybkie wykrycie produktu reakcji LAMP bez utraty jego skuteczności. Taka zmiana pH jest wystarczająca dla barwnika wskaźnikowego do wizualizacji końcowego produktu amplifikacji [97,98,99].

1.3.12. Multipleksowy/panelowy test LAMP

Ponadto, ponieważ większość testów diagnostycznych wymaga indywidualnego testowania każdego patogenu, bardzo cennym byłoby zaprojektowanie multipleksowego testu LAMP, który stworzyłby realne rozwiązanie do wykrywania wielu patogenów symultanicznie w jednej próbce. Pozwoliłoby to na znaczne skrócenie czasu potrzebnego do identyfikacji patogenu, prowadząc w konsekwencji do dokładniejszej diagnostyki różnicowej i szybszego wdrożenia leczenia. Do tej pory nie został zaprojektowany multipleksowy test do detekcji periopatogenów, natomiast multipleksowy test LAMP został opracowany do wykrywania wirusa dengi. W celu identyfikacji tego wirusa wykorzystano cztery specyficzne zestawy starterów, ukierunkowane na 30 niekodujących regionów, po czym umieszczono w jednej próbce. Zastosowano reakcję kolorymetryczną wykorzystującą barwnik interkalujący HNB, umożliwiając wizualizację gołym okiem. Bardzo ważnym aspektem tego testu był fakt, iż nie zgłoszono żadnej reaktywności krzyżowej, co świadczy o wysokim potencjale detekcji tego testu [100]. W 2017 roku Strakos i wsp. opracowali multipleksowy test LAMP do wykrywania patogennych i niepatogennych szczepów *E.coli*, ukierunkowanych odpowiednio na gen *phoA* i *stx1* oraz *stx2* [101].

Nie zaobserwowano żadnych powiązań krzyżowych u 58 szczepów bakterii, co czyni tę metodę zadowalającym narzędziem monitorującym [101]. W ostatnim czasie przeprowadzono również multipleksową metodę amplifikacji izotermicznej za pośrednictwem pętli (LAMP) w połączeniu z technologią chromatografii paskowej DNA. Test ten umożliwił detekcję SFG *Rickettsia spp.* i *Plasmodium spp.* Wykorzystanie syntetycznych nukleotydów umożliwiło detekcję oznaczonych genów, z czułością testu sięgającej tysiąca kopii na przeprowadzoną reakcję, natomiast gdy zastosowano natywne, genomowe DNA, zaobserwowano znaczny spadek czułości. Wartość czułości była równa

100 i 10 równoważników genomu na reakcję, odpowiednio dla *Rickettsia monacensis* i *Plasmodium falciparum* [102].

CEL PRACY

Cel ten realizowano poprzez:

1. Oznaczenie (detekcja) periopatogenów w przewlekłym zapaleniu przyzębia za pomocą trzech różnych metod: PCR, Real Time PCR i LAMP.
2. Porównanie czułości i specyficzności trzech metod: PCR, Real Time PCR i LAMP zastosowanych do detekcji periopatogenów w przewlekłym zapaleniu przyzębia.
3. Zbadanie związku między ocenianymi klinicznymi wskaźnikami stanu przyzębia, a danymi uzyskanymi w trakcie molekularnych analiz mikrobiologicznych.
4. Zbadanie zależności między wynikami badań molekularnych i klinicznych, a zmiennymi niezależnymi o charakterze socjo-demograficznym, takimi jak wiek, płeć oraz palenie papierosów.
5. Detekcja liczby kopii DNA poszczególnych patogenów z wykorzystaniem krzywych wzorcowych uzyskanych z seryjnych rozcieńczeń bakteryjnego DNA.

MATERIAŁ I METODY

Zaproponowane w prezentowanej pracy metody badań i sposób gromadzenia danych uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej 912/17 przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Macinkowskiego w Poznaniu.

3.1. Selekcja Pacjentów

Badaniami objęto 118 osób obojga płci w wieku od 18 – 40+ lat, pacjentów Kliniki Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji UMP w Poznaniu. Do grupy osób z objawami choroby przyzębia zakwalifikowano 62 pacjentów - 24 mężczyzn (38,71%) oraz 38 kobiet (61,21%). 3 pacjentów było w wieku 18-29 lat (4,84%), 25 pacjentów było w wieku 30-40 lat (40,32%), 34 pacjentów było w wieku powyżej 40 lat (54,84%). U 50 pacjentów (80,65%), zdiagnozowano przewlekłą postać choroby, u 12 wystąpiła postać agresywna (19,35%). 23 pacjentów jest palaczami (37,10%), 39 nie jest palaczami (62,90%). Grupa kontrolna złożona była z 56 pacjentów - 33 mężczyzn (58,93%) oraz 23 kobiet (41,07%). 21 pacjentów było w wieku 18-29 lat (37,50%), 25 pacjentów było w wieku 30-40 lat (44,64%), 10 pacjentów było w wieku powyżej 40 lat (17,86%). 16 pacjentów jest palaczami (28,57%), 40 nie jest palaczami (71,43%). W tekście rozprawy doktorskiej zostały użyte zamiennie określenia „grupa badana” „grupa chorych” oraz „uczestnicy”.

Tabela 1 - Zmienne dla grupy badanej (chorych) oraz grupy kontrolnej

zmienna		Grupa chorych n=62(%)	Grupa kontrolna n=56(%)
płeć	mężczyźni	24 (38,7)	33(58,9)
	kobiety	38 (61,2)	23 (41,0)
wiek	18-29 lat	3 (4,84)	21(37,5)
	30-40 lat	25 (40,3)	25 (44,6)
	40 lat i więcej	34 (54,84)	10 (17,8)
postać choroby	agresywna	12 (19,3)	-
	przewlekła	50 (80,6)	-
status palenia	palący	23 (37,1)	16 (28,5)
	niepalący	39 (62,9)	40 (71,4)

W pierwszym etapie przeprowadzono kliniczne badanie stomatologiczne (od maja 2017 do września 2018) w celu kwalifikacji pacjentów w zależności od stanu przyzębia. Podstawowym kryterium włączenia pacjentów do grupy badanej było rozpoznanie przewlekłego oraz agresywnego zapalenia przyzębia.

Przeprowadzono badanie podmiotowe (wywiad ogólnolekarski i stomatologiczny) w celu zweryfikowania chorób współistniejących oraz ustalenia okresu ich trwania. Zweryfikowano wiek, płeć pacjentów oraz status palenia tytoniu. Badania zostały wszczęte przed wdrożeniem nowej nomenklatury periodontologicznej, dlatego też manuskrypt zawiera odniesienie do zapalenia przyzębia według starej nomenklatury, jak również nowej, bazując na profilu stanu przyzębia i liczbie zębów oraz na określeniu stanu przyzębia według parametrów, takich jak stan dziąseł, głębokość kieszonki przyzębnej i klinicznej utraty przyczepu nabłonkowego.

Pacjentów podzielono na trzy podgrupy wiekowe:

- 1) Podgrupa 1: 18-30
- 2) Podgrupa 2: 30-40
- 3) Podgrupa 3: >40

Kliniczną ocenę stanu przyzębia przeprowadzono na podstawie wybranych wskaźników periodontologicznych. Stan dziąseł określono na podstawie wskaźnika dziąsłowego (GI; *ang.* Gingival Index) wg i Löe i Silness [141], wskaźnika krwawienia z kieszonki (SBI; *ang.* Sulcus Bleeding Index) wg. Muhlemanna i Sona [140] a stan przyzębia na podstawie głębokości kieszonki przyzębnej (DPT; *ang.* probing depth) oraz (CAL; *ang.* Clinical attachment loss).

W trakcie procesu kwalifikacji, pacjentów poinformowano o sposobie oraz celu badań oraz o konieczności podpisania formularza świadomej zgody na przeprowadzenie badań. Jednym z warunków decydujących o włączeniu danego pacjenta do badania była choroba przyzębia w jej przewlekłym lub agresywnym stanie. U wytypowanych pacjentów oceniono również zachorowalność na próchnicę na podstawie liczby PUW-Z stosując kryteria oceny próchnicy według Światowej organizacji zdrowia (18 World Health Organization. Oral Health Surveys. Basic Methods. 4th Edition. Geneva 1997). Określono liczbę zębów z czynną próchnicą (P), usuniętych z powodu próchnicy (U) oraz wypełnionych (W), co posłużyło do wyliczenia liczby (PUW-Z).

Badanie kliniczne przeprowadzono w sztucznym oświetleniu z użyciem lusterka i zgłębnika stomatologicznego, jak również sondy periodontologicznej.

3.2. Wskaźniki chorób przyzębia

3.2.1. Wskaźnik dziąsłowy (GI)

Wskaźnik dziąsłowy (GI) pozwala na określenie stanu brzegu dziąsłowego przy czterech powierzchniach zęba. Uwzględnia brak lub obecność objawów zapalenia dziąseł, takich jak obrzęk, zmiana zabarwienia, krwawienie przy zgłębnikowaniu i krwawienie samoistne. Kryteria oceny tego wskaźnika opierają się na zmianach jakościowych w dziąśle (Tabela 2).

Tabela 2 - Kryteria oceny stanu dziąseł wg wskaźnika dziąsłowego (GI).

0	Brak objawów zapalenia
1	Łagodne zapalenie: niewielka zmiana zabarwienia i kształtu dziąsła, brak krwawienia przy ucisku dziąsła
2	Umiarkowane zapalenie: dziąsło zaczerwienione, obrzmiałe, błyszczące, występuje krwawienie przy ucisku dziąsła,
3	Ciężkie zapalenie: znaczne zaczerwienienie i obrzęk dziąsła, owrzodzenie skłonność do samoistnego krwawienia

Występowanie krwawienia oceniano po delikatnym wprowadzeniu sondy periodontologicznej do szczeliny dziąsłowej pod kątem 45° do powierzchni zęba. Następnie badano kolejne cztery powierzchnie każdego zęba (mezjalną, dystalną, policzkową oraz językową), stosując skalę od 0 do 3. Wartość liczbowa wskaźnika GI przy danym zębie określano na podstawie podzielenia przez 4 sumy wartości wskaźnika z czterech powierzchni. Wartość wskaźnika w zakresie od 0 -1,0 świadczy o łagodnym zapaleniu dziąseł, od 1,1 – 2,0 – o umiarkowanym, a od 2,1 – do 3,0 o nasilonym zapaleniu dziąseł.

3.2.2. Głębokość kieszonek (PD)

Do oceny stanu przyzębia zastosowano metodę pomiaru klinicznej głębokości kieszonek przyzębnych. Jest to wskaźnik służący do obliczenia odległości pomiędzy brzegiem dziąsła, a dnem kieszonki dziąsłowej.

Pomiaru dokonywano na 6 powierzchniach przy wszystkich obecnych w jamie ustnej zębach przy użyciu skalowanej sondy periodontologicznej wykorzystywanej w badaniach klinicznych WHO-621 (skala do 11,5 mm). Część pomiarowa sondy posiada strefy pomiarowe rozmieszczone w odległości 3,5; 5,5 i 8,5 mm od kulki o średnicy 0,5 mm, która stanowi zakończenie sondy.

Wartość parametru głębokości kieszonek mieszcząca się w przedziale od 0-3mm wskazuje stan fizjologiczny, natomiast wyniki powyżej 4 mm są odzwierciedleniem aktywnego stanu zapalnego, który może mieć negatywny wpływ na utratę przyczepu łącznotkankowego.

3.2.3. Kliniczna utrata przyczepu łącznotkankowego (CAL)

Kryterium różnicującym zapalenie dziąseł od zapalenia przyzębia, jest m.in. kliniczna utrata przyczepu łącznotkankowego (CAL; *ang.* Clinical Attachment Level) spowodowana nieleczonym przewlekłym stanem zapalnym. CAL jest także kluczowym parametrem klasyfikującym nasilenie i formę zapalenia przyzębia.

Rozróżnia się 3 stadia przewlekłego zapalenia przyzębia:

- lekkie (1-2 mm)
- umiarkowane (3-4 mm)
- ciężkie (5 mm >)

Utratę przyczepu łącznotkankowego oszacowano w przestrzeniach przedsionkowo/językowych oraz w przestrzeniach interproksymalnych. Badanie wykonano sondą periodontologiczną od dna kieszonki do połączenia szkliwno-cementowego lub innego ustalonego punktu odniesienia.

3.3. Izolacja bakteryjnego DNA

3.3.1. Akwizycja płynu dziąsłowego

Od wszystkich pacjentów uczestniczących w badaniu (grupa badana i kontrolna) pobrano płyn dziąsłowy, z którego uzyskiwano próbki bakteryjnego DNA. W celu pobrania odpowiedniej ilości materiału posłużono się sterylnymi, papierowymi ćwiekami

endodontycznymi (Caulk-Dentsply), które na 10 sekund umieszczano w szczelinie dziąsłowej. U osób zdrowych (grupa kontrolna), płyn dziąsłowy pobierano ze szczeliny dziąsłowej po izolacji miejsca biorczego i usunięciu płytki nazębnej pod kątem 90° do powierzchni zęba. Uzyskany materiał użyty został w późniejszym terminie w celu identyfikacji patogenów (Rycina 2).



Rycina 2 - Proces pobrania materiału klinicznego. Miejsce biorcze zostało adekwatnie oczyszczone. Materiał biologiczny został umiejscowiony w sterylnych probówkach typu Eppendorf (1,5 ml) (Źródło własne).

W grupie chorych, próbki pozyskiwano ze strefy kieszeni patologicznej o głębokości 4 mm lub większej, z czterech nieprzylegających miejsc proksymalnych, po uprzednim usunięciu złogów naddziąsłowych na około 7 dni przed pobraniem materiału. Jeżeli obszar przyzębia wykazywał zaostrowany stan zapalny (wzmożone krwawienie lub wysięk ropny), pobranie materiału biologicznego odraczano.

Kryteria, które wpłynęły na wykluczenie uczestników z którejkolwiek z analizowanych grup były następujące:

- 1) ciąża – ze względu na potencjalne zmiany zachodzące w profilu mikrobiologicznym;
- 2) choroba układowa – ze względu na jej wpływ na odpowiedź immunologiczną;
- 3) antybiotykoterapia w poprzednich sześciu miesiącach – ze względu na zmiany profilu mikrobiologicznego oraz wpływ na odpowiedź immunologiczną.

Bibuły endodontyczne zawierające pobrany materiał biologiczny natychmiast umieszczano w sterylnych probówkach typu Eppendorf (1,5 ml) zawierających 500 μ l sterylnej soli fizjologicznej (S; sól fizjologiczna/saline) lub 250 μ l buforu DifastT (APA

buffer) (Novazym Polska). Zabezpieczone próby przechowywano w zamrażarce w temperaturze -20°C .

3.3.2. Izolacja bakteryjnego DNA w soli fizjologicznej

Izolację genomowego DNA z bakterii Gram (+) oraz Gram (-) z próbek materiału zabezpieczonych w soli fizjologicznej, wykonano przy użyciu zestawu Novabeads Bacterial DNA Preparation KIT (Novazym, Polska). W metodzie tej zastosowano syntetyczne kompozytowe złoża magnetyczne, które umożliwiają selektywną detekcję DNA i RNA. W procesie izolacji wykorzystano również specjalne bufony umożliwiające uzyskanie wysokiej jakości produktu. Zestaw buforów obejmował:

- STEL Buffer – bufor do zawieszania komórek bakteryjnych;
- Lysis Buffer – bufor lizujący;
- Binding Buffer – bufor do wiązania kwasu nukleinowego;
- Pre-wash Buffer – bufor do płukania wstępnego;
- Wash Buffer – bufor do płukania właściwego;
- TE Buffer – bufor do elucji DNA;

Procedurę izolacji DNA przeprowadzono zgodnie z protokołem załączonym przez producenta do zestawu. W etapie wstępnym, przed przystąpieniem do procesu izolacji, cząstki złoża magnetycznego dokładnie wymieszano i pozostawiono na stole laboratoryjnym do osiągnięcia temperatury pokojowej (RT). Po rozmrożeniu, badane próbki pozyskane ze szczelin oraz kieszeni działkowych zawierające bakterie (500 μl roztworu soli fizjologicznej) dodawano do 300 μl buforu lizującego, intensywnie mieszano przez około 10 sek. przy prędkości 10 000 - 12 000 obr./min w RT i inkubowano przez 5 min w RT. Po tym czasie do próbek dodawano 200 μl buforu Binding Buffer i całość intensywnie mieszano. Następnie dodawano 25 μl buforu zawierającego cząstki złoża magnetycznego, starannie mieszano i inkubowano 5 min w RT. Tak przygotowane mieszaniny zawarte w probówkach typu „Eppendorf” o pojemności 1,5 ml umieszczano w statywie magnetycznym. Po odseparowaniu z mieszaniny cząstek złoża magnetycznego ze związanym DNA za pomocą magnesu, odrzucano frakcję płynną. DNA związany z cząstkami złoża magnetycznego oczyszczano buforem do płukania wstępnego (PreWash Buffer), buforem do płukania właściwego (Wash Buffer) i 80% etanolem kolejno.

W trakcie płukania wstępnego cząstki złoża magnetycznego ze związanym DNA zawieszano w 1ml buforu PreWash Buffer. Po delikatnym wymieszaniu, cząstki z DNA inkubowano przez 5 min w RT. Następnie próbkę umieszczano w statywie magnetycznym w celu odseparowania cząstek magnetycznych z mieszaniny, a pozostałą frakcję płynną odrzucano. Etap płukania wstępnego powtarzano dwukrotnie. W kolejnym etapie DNA związane z cząstkami magnetycznymi płukano w 1 ml buforu Wash Buffer. Probówki ponownie umieszczano w statywie magnetycznym w celu odseparowania mieszaniny cząstek magnetycznych i usuwano frakcję płynną. W dalszej fazie izolacji cząstki złoża magnetycznego ze związanym DNA zawieszano w 1 ml 80% etanolu. Po delikatnym wymieszaniu zawartości probówek, próbki inkubowano przez 1 min w RT, po czym ponownie umieszczano w statywie magnetycznym w celu odseparowania cząstek magnetycznych z mieszaniny i usuwano frakcję płynną. Pozostały etanol odparowywano z pozostawionych w statywie otwartych probówek w czasie 10-15 min w RT. Ostatecznie cząstki złoża magnetycznego ze związanym DNA zawieszano w 50 μ l buforu do elucji (TE buffer) i dwukrotnie inkubowano w temperaturze 65°C w czasie 5 min mieszając z prędkością 800 obr./min. Drugą inkubację prowadzono w otwartej probówce. Po zakończeniu inkubacji, probówki umieszczano w statywie magnetycznym w celu odseparowania cząstek złoża magnetycznego, a bakteryjny DNA obecny we frakcji płynnej przenoszono do czystych probówek. Po oznaczeniu stężenia przy użyciu spektrofotometru NanoDrop NP1000, próbki DNA do czasu analiz PCR, Real-Time PCR i LAMP przechowywano w temperaturze -20°C.

3.3.3. Izolacja bakteryjnego DNA z próbek zabezpieczonych buforem Difast

Alternatywną metodą zabezpieczenia próbek do izolacji bakteryjnego DNA z badanego materiału w trakcie przeprowadzonych analiz było wykorzystanie buforu „DIFAST” (APA). Bufor ten zastosowano w celu usprawnienia procesu izolacji DNA. Uzyskanie optymalnej jakości izolowanego DNA zabezpieczonego buforem „DIFAST” wymaga przestrzegania ściśle określonych warunków izolacji, takich jak ciągłe mieszanie buforu podczas pobierania próbek oraz transferu materiału genetycznego do 2 ml gumowych probówek, które w dalszym etapie są przenoszone do bloku grzejnego utrzymującego temperaturę 95°C.

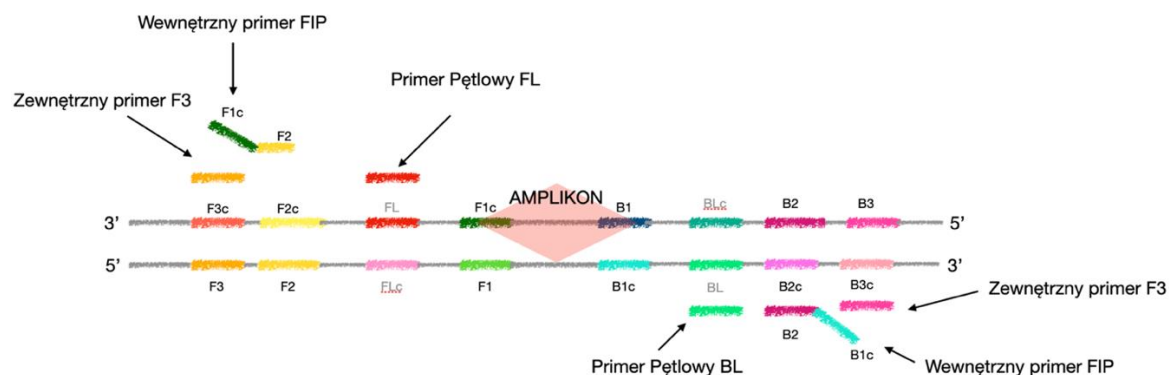
Zgodnie z załączoną przez producenta procedurą, izolacja bakteryjnego DNA z próbek zabezpieczonych buforem „DIFAST”, polegała na przetransferowaniu ćwieków papierowych (ISO 30) pobranych ze szczelin lub kieszeni dziąsłowych o różnych głębokościach, do probówek zawierających 250 µl buforu. Bakterie Gram (+) homogenizowano z użyciem szklanych kuleczek o średnicy 0,1 mm. Następnie próbki umieszczano w bloku grzejnym w temperaturze 95-100°C i inkubowano przez 15 min, jednocześnie mieszając z prędkością 1500 obr./min. Po zakończeniu inkubacji, próbki pozostawiano do ostygnięcia przez 15 min w RT, następnie intensywnie mieszano i wirowano przez 5 min z prędkością 10000-12000 obr./min. Ostatecznie, uzyskane nadsączy przenoszono do nowych probówek.

DNA wyizolowane z zastosowaniem tej procedury można wykorzystać bezpośrednio jako matryce do reakcji PCR lub przechowywać tymczasowo w temperaturze +2 – 8°C. W celu długotrwałego przechowywania zaleca się umieszczenie próbek w temperaturze –20°C, jednakże ponowne ich użycie wymaga krótkiej inkubacji w temperaturze 95°C.

3.4. Detekcja badanych periodontopatogenów

3.4.1. LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)

Izotermiczna technika amplifikacji DNA LAMP wymaga zastosowania zestawu czterech specjalnie zaprojektowanych starterów (F3, B3, wewnętrznego startera do przodu [FIP] i wewnętrznego startera wstecznego [BIP]), które rozpoznają łącznie sześć różnych sekwencji matrycy DNA (F1, F2, F3, B1, B2 i B3) (Rycina 3).



Rycina 3 - Schemat przedstawiający poszczególne primery stosowane w metodzie LAMP. Szczegółowy opis zawarty w tekście poniżej (źródło własne).

Dwa wewnętrzne startery, FIP i BIP, zawierają dwie odrębne sekwencje odpowiadające sekwencjom sensownym i anty-sensowym DNA. FIP służy do primingu w etapie niecyklicznym, czyli syntezy nici potomnej komplementarnej do matrycy, a drugi do syntezy fragmentów jednoniciowych w późniejszych etapach amplifikacji cyklicznej. Starter FIP składa się z sekwencji komplementarnej F1 (F1c) i bezpośredniej F2 (F2). BIP składa się z sekwencji uzupełniającej B1 (B1c) i bezpośredniej B2 (B2). Dwa zewnętrzne startery, F3 i B3c (sekwencja komplementarna do B3), znajdują się poza regionem F2-B2. Aby zwiększyć skuteczność amplifikacji, zaprojektowano dodatkowo dwa startery pętlowe, starter pętli do przodu (LF) i starter pętli wstecznej (LB) (Rycina 3).

W trakcie oznaczeń przeprowadzonych techniką LAMP, wykorzystano następujące sekwencje matrycowe charakterystyczne dla badanych periodontopatogenów:

- 1) *P. gingivalis* (*P.g*) – chromosom, kompletny genom
- 2) *A. actinomycetemcomitans* (*A.a.*) – dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)
- 3) *F. nucleatum* (*F.n.*) – Białko terminacyjne/antyterminacyjne transkrypcji (NusG)
- 4) *T. forsythia* (*T.f.*) – Deiminaza Peptydyloargininy (Peptidylarginine deiminase)

Oligonukleotydowe sekwencje starterowe zastosowane w przeprowadzonych badaniach zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3 - Sekwencje starterów wraz z temperaturą topnienia wykorzystane do identyfikacji poszczególnych patogenów za pomocą metody LAMP (źródło własne).

STARTERY LAMP					
		Sekwencja 5-3	Temperatura Topnienia	Produkt	
Tanarella Forsythia (Peptidylarginine deiminase)	F3	GAACACCGTGAGGAATCTC	59,9		
	B3	AAACCGGATAACATAATCAATT	60,1		
	FIP(F1c+F2)	GAATTCCTCCTCTTGGGAGATGGTTAATTGTTATGCGTGGTAC			
	BIP(B1c+B2)	AATTGTCAATGGTCAATGGTTATGCGATTGTCAATTGTACACCGGT			
	LoopF	CCTCACGATGTTGGAATGA	62,2		
	LoopB	TGGTTACACGCGAATCAT	61,8		
	F2	GGTTAATTGTTATGCGTGGTAC	60		
	F1c	GAATTCCTCCTCTTGGGAGAT	64,9		
	B2	ATTGTCAATTGTACACCGGT	60		
	B1c	AATTGTCAATGGTCAATGGTTATGCG	65		
	Product		70,3		
	194pz				
	Fusobacterium Nucleatum (nusG)	F3	TGGTCCAAGAAAGAAATTAACA		60
B3		AAACACCACTACTTCAATTTCAA	59,3		
FIP(F1c+F2)		GGTCAGAACCACTCTCAAAATGGAAAGTCAAGAGGAAAGAA			
BIP(B1c+B2)		AAGATCAAGAAAGGACAAAGTTGCTGACTGGTGTCAATCTTCCAA			
LoopF		TAACCTCATACCATACAGGAGATC	62		
LoopB		AATTGATCATGAACTGGTAGATT	60,9		
F2		AATGGAAGCTACAAGAAAGAA	59,4		
F1c		GGTCAAGAACCACTCTCAAA	61,7		
B2		CTGGTGTCAATCTTCCAA	56,5		
B1c		AAGATCAAGAAAGGACAAAGTTGCTGA	64,8		
Product					
332pz					
Aggregatibacter Actinomycetemcomitans (Superoxide dismutase)		F3	GCAGTGAAGGCAATGGAA	60,3	
	B3	GTGTCTCAATTTCTGCACTATTAC	60,1		
	FIP(F1c+F2)	GCAAAGCCGCTATTACCGAAACAGCAACAGCTCAAGATGTA			
	BIP(B1c+B2)	GTGCGTGGTGTGGAGAACTTGTGATGAGATGGTTTCT			
	LoopF	GCTTCTACTACCGTTACACCG	62,5		
	LoopB	AATTGACGGAAGCTGACAAA	62,3		
	F2	AAGCAACAAGCTCAAGATGTA	60,2		
	F1c	GCAAAGCCGCTATTACCGAAAC	65		
	B2	CCTTGTGATGAGATGGTTTCT	60		
	B1c	GTGCGTGGTGTGGAGGAA	64,7		
	Product		71,8		
	170pz				
	P Gingivalis (ATCC 33277 chromosome, Kompletny Genom)	F3	CAACGAGCATTCCAGGAA	59,7	
B3		AAGTCCACGAGACTACTT	59,7		
FIP(F1c+F2)		TCTTTGATCAATCCATCGGGATACCTGCTATCGCTGAGTACGA			
BIP(B1c+B2)		CGGTGTGAATCTCTAAATGGCAATCGTACATTGCGAAACCAA			
LoopF		GAACGGGTAGCGTACCAA	62,1		
LoopB		AACTGACTTACTGGACACG	61,7		
F2		TGCTATCGCTGAGTACGA	59,9		
F1c		TCTTTGATCAATCCATCGGGATACC	64,9		
B2		ATCGTACATTGCGAAACCAA	59,8		
B1c		CGGTGTGAATCTCTAAATGGCA	65		
Product			73		
250pz					

Sekwencje starterów wykorzystanych w trakcie analiz zaprojektowano stosując oprogramowanie Primer Explorer, wersja 2.0 (Fujitsu Co., Ltd., Tokio, Japonia). Ich specyficzność początkowo zweryfikowano przy użyciu oprogramowania BLAST na serwerze National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a następnie potwierdzono wewnętrznym testem LAMP. Odczynniki wyprodukowano w OptiGene Ltd. (Unit 5 Blatchford Road, Horsham, West Sussex, RH13 5QR, UK).

Reakcje izotermalnej amplifikacji DNA metodą LAMP prowadzono w objętości 10 µl z użyciem zestawu odczynników Isothermal Master Mix (NOVAZYM POLSKA) dedykowanym specjalnie do tego typu analiz. Mieszanina reakcyjna zawierała polimerazę GspSSD, umożliwiającą szybką amplifikację, bufor reakcyjny, termostabilną nieorganiczną pirofosfatazę, MgSO₄, mieszaninę nukleotydów (dNTP) i barwnik fluorescencyjny oraz odpowiednie startery i badane matryce DNA (Tabela 4).

Tabela 4 - Podsumwanie poszczególnych składników oraz ich objętości wykorzystanych do detekcji periodontopatogenów (źródło własne)

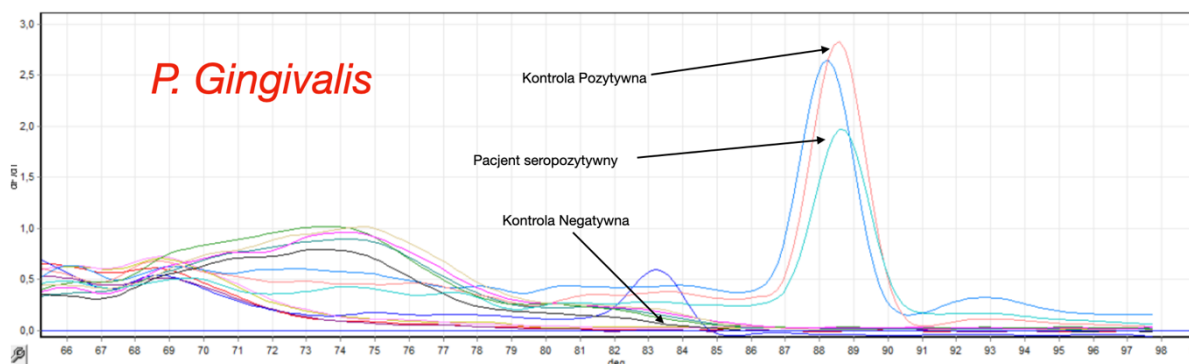
Składnik	Objętość	Stężenie końcowe starterów
Matryca	0.8 μ l	
Isothermal Master Mix	6.0 μ l	
FIP & BIP	0.8 μ l	20 pmol każdy
F3 & B3	0.8 μ l	5 pmol każdy
LoopF & LoopB	0.8 μ l	10 pmol każdy
Woda	0.8 μ l	
Całość	10 μ l	

Proces amplifikacji przeprowadzono przy użyciu termocyklera Rotor Gene (Qiagen). Proces wszczęto poprzez podtrzymanie próbek w temperaturze 95 °C przez 5 min., drugi etap złożony był z 3 cykli, który był powtórzony 40 razy. Cykl 1 - 95°C przez 30 sekund, cykl 2 - 60°C przez 30 sekund, oraz cykl 3 - 72°C przez 30 sekund. Matryce bakteryjnego DNA poddano temperaturze topnienia w przedziale od 70 do 95°C. Pomiar fluorescencji odbywał się przy zmianie temperatury w zakresie 1.0 °C na minutę. W celu weryfikacji wyników, prowadzono detekcję wartości względnej intensywności fluorescencji oraz temperatury topnienia dla poszczególnych szczepów z wykorzystaniem kanału fluorescencji FAM, Green w przedziale 470nm (Rycina 4).

Reakcje LAMP wykonano w następujących warunkach:

Tabela 5 - Warunki Amplifikacji metody LAMP (źródło własne)

	ETAP	TEMPERATURA	CZAS
	Podtrzymanie	95	5 minut
	Cykl 1	95	30 sekund
	Cykl 2	60	30 sekund
40 x	Cykl 3	72	30 sekund
	Topnienie	70-95	1.0°C na minutę



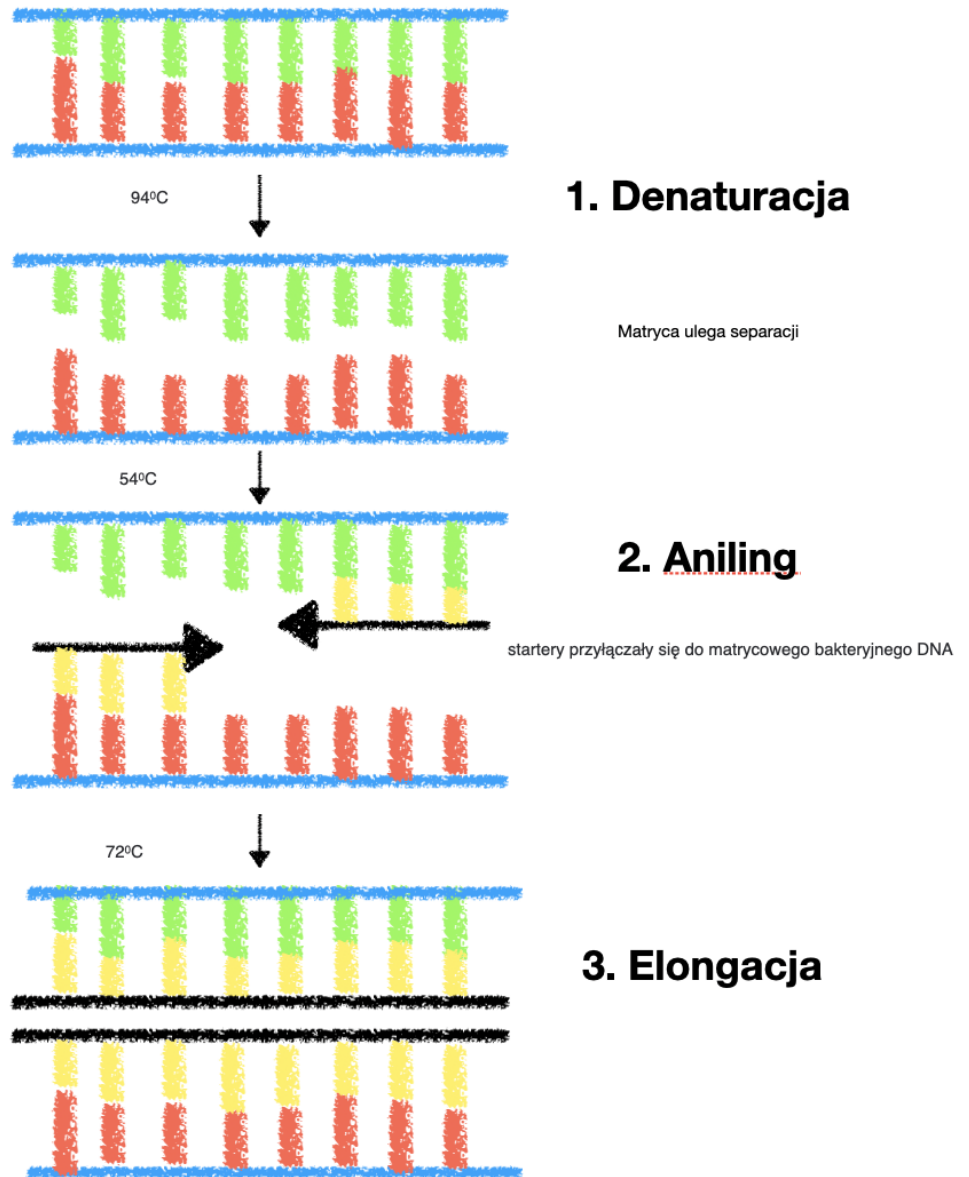
Rycina 4 - Przykładowe przedstawienie przebiegu amplifikacji oraz temperatury (Źródło własne).

W celu weryfikacji obecności DNA periopatogenów, zidentyfikowanych wcześniej techniką LAMP wykonano reakcje PCR oraz Real-Time PCR (PCR w czasie rzeczywistym).

3.4.2. PCR - Łańcuchowa reakcja polimerazy

Reakcja PCR obejmuje pięć etapów, spośród których trzy powtarzane są cyklicznie. Wstępna denaturacja i końcowa elongacja, rozdzielone są powtarzającymi się etapami denaturacji, anilingu i elongacji. W trakcie denaturacji, którą prowadzono w temperaturze 94⁰C, podwójna helisa DNA była rozplataną na dwie pojedyncze nici, natomiast reakcja enzymatyczna polimerazy dobudowującej nukleotydy do wydłużającej się komplementarnej nici produktu reakcji ulegała terminacji. W trakcie anilingu, gdy temperatura była obniżana do 54⁰C, obecne w mieszaninie reakcyjnej startery przyłączały się do matrycowego bakteryjnego DNA. Przyłączenie starterów do matrycy umożliwia polimerazie odnalezienie odpowiedniej sekwencji, od której rozpoczyna się dobudowywanie nukleotydów. W cyklu elongacji, czyli w temperaturze 72⁰C, polimeraza uzyskała optimum temperaturowe dla syntezy produktu reakcji. Wydłużanie nici produktu rozpoczyna się od końca 5' i zmierza do końca 3'. Polimeraza łączy nukleotydy w pozycji komplementarnej z matrycowym DNA. W rezultacie powstaje kolejna kopia DNA. Cały proces trwa od 30-40 cykli, co prowadzi do amplifikacji matrycowego DNA w miliardach kopii. (rycina 5)

PCR (JEDEN CYKL)



30-40 cykli, co prowadzi do amplifikacji matrycowego DNA w miliardach kopii.

Rycina 5 - Proces amplifikacji bakteryjnego DNA za pomocą klasycznej metody PCR (Źródło własne)

Oznaczenia przeprowadzone techniką PCR wykonano wobec sekwencji matrycowych charakterystycznych dla badanych periodontopatogenów takich, jak w oznaczeniach metodą LAMP:

- 1) *P.gingivalis* (**P.g**) - chromosom, kompletny genom
- 2) *A.actinomycetemcomitans* (**A.a.**) – dysmutaza ponadtlenkowa (SOD)
- 3) *F.nucleatum* (**F.n.**) - Białko terminacyjne/antyterminacyjne transkrypcji (NusG)
- 4) *T.forsythia* (**T.f.**) - Deiminaza Peptydyloargininy

Zaprojektowanie starterów wykorzystanych w reakcjach PCR powierzono Pracowni Novazym Polska [<http://novazym.pl/>]. Startery zaprojektowano w oparciu o sekwencje referencyjne ogólnie dostępne w bioinformatycznych bazach danych NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov/] oraz GENATLAS [<http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>]. W tym celu wykorzystano oprogramowanie:

- Primer 3 [<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>]
- NetPrimer [<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>]
- BLAST [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]
- Oligo 7.0 [<https://www.oligo.net/>]

Tabela 6 - Startery oligonukleotydowe wykorzystane w reakcjach PCR i Real-Time PCR (źródło własne)

		Startery Real Time PCR		Sekwencja 5 - 3	Temperatura Topnienia	Produkt
Tanarella Forsythia (BspA)						
	F3	Tan Fors- F		GAACACCGTGAGGAATCTC	59	
	B3	Tan Fors R		AATTGAATTATGTTATGCCGTGT T	60,5	
	Amplicon				74,8	106 bp
Fusobacterium Nucleatum (NusG)						
	F3	FusNuc-F		AAACACCATCTACTTCAATTTCAA	59,5	
	B3	FusNuc- R		TTGAAATTGAAGTAGATGGTGT TT	59,4	
	Amplicon				75,8	197bp
Aggregatibacter Actinomycetemcomitans (SodA)						
	F3	AggAct-F		GGCATGGTTAGTTTTAGAAAA	60,7	
	B3	AggAct- R		GCGTATTCITTGCCATA	61,3	
	Amplicon				76,4	84bp
Porphyromonas Gingivalis (Kompletny Genom)						
	F3	Porgin-F		CAACGAGCATTCCAGGAA	60,1	
	B3	Porgin-R		AGGTAGGTCTGTGGACTT	60	
	Amplicon				75,2	70bp

W celu optymalizacji warunków termicznych reakcji wykonano PCR w gradiencie temperatur. Temperatury anilingu dla poszczególnych starterów zoptymalizowano za pomocą termocyklera Mastercycler Eppendorf Gradient (Eppendorf), który jest wyposażony w blok grzejny umożliwiający wygenerowanie odpowiedniego rozkładu temperaturowego. Gradient wykonano w rozpiętości temperatur od 62 do 70°C (Tabela 7). Jako matrycę kontrolną zastosowano mieszaninę genomowego DNA bakterii pochodzących z płynów dziąsłowych pobranych od pacjentów, u których wcześniej potwierdzono obecność badanych patogenów.

Tabela 7 - Gradient temperaturowy wykorzystany dla metody konwencjonalnego PCR (źródło własne)

Gradient Temperaturowy dla PCR	
Kolumna 1	62°C
Kolumna 2	62.5°C
Kolumna 3	63.2°C
Kolumna 4	64.1°C
Kolumna 5	65.2°C
Kolumna 6	66.2°C
Kolumna 7	67.3°C
Kolumna 8	68.2°C
Kolumna 9	69.0°C
Kolumna 10	69.9°C

Reakcje amplifikacji DNA metodą PCR prowadzono w objętości 20 μ l z użyciem zestawu odczynników Allegro Taq Polimeraza DNA (NOVAZYM POLSKA) (Tabela 8).

Tabela 8 - Podsumowanie poszczególnych składników oraz ich objętości wykorzystanych do detekcji periodontopatogenów za pomocą metody PCR.

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe starterów
Matryca DNA	1,0 μ l	(2,5-5ng/ μ l)
Bufor reakcyjny 700 mM Tris-HCl	0,2 μ l	1x
Allegro TAQ polymeraza	0,2 μ l	1U
Startery PCR	2,0 μ l	0,1-1 μ M
dNTP	0,8 μ l	0,2mM
Woda	14 μ l	
Całość	20 μ l	

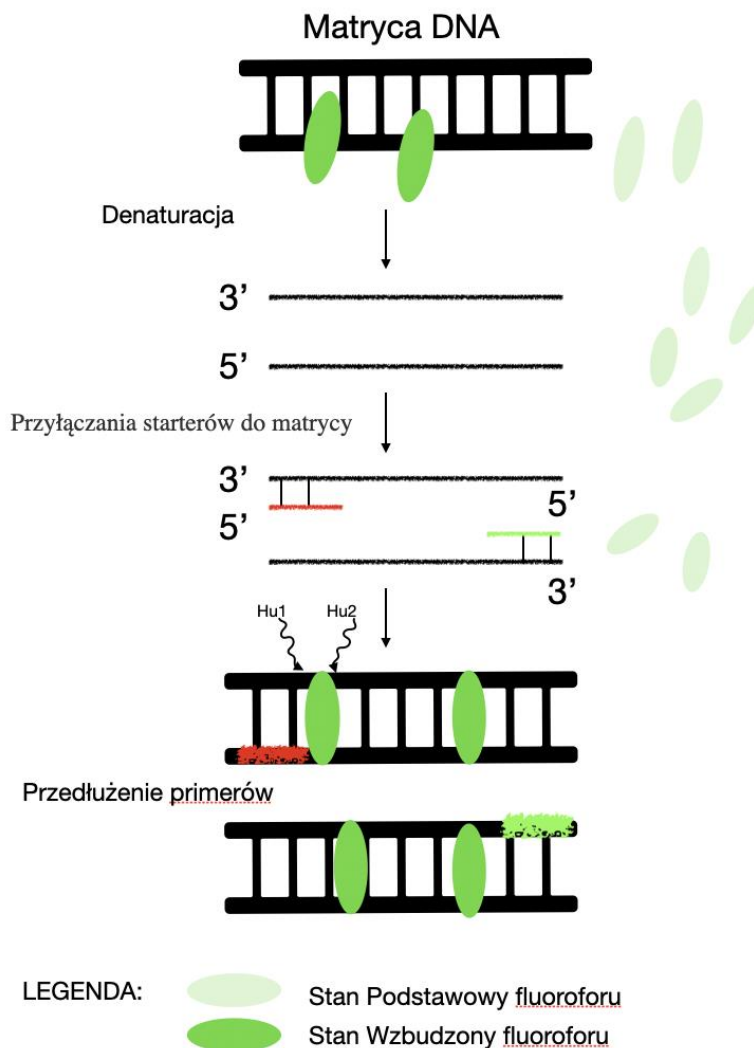
Tabela 9 - Warunki przeprowadzania reakcji PCR (źródło własne).

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
wstępna denaturacja	95°C	5 min	
denaturacja	95°C	25 sek	40
Aniling	wg gradientu	25 sek	
elongacja	72°C	35 sek	
Końcowa elongacja	72°C	7 min	

Produkty reakcji oceniono poprzez poddanie ich procesowi elektroforezy w 2% żelu agarozowym, zawierającym bromek etydyny w stężeniu 0,5 μ g/ml. Proces elektroforezy przebiegał w stałym napięciu (200 V) i natężeniu (500 mA) przez około 20 min w buforze 1 \times TBE (10%). Kontrolę i weryfikację produktów wykonano po zakończeniu elektroforezy na transiluminatorze w świetle UV wobec markera mas Nova 100 bp DNA Ladder (Novazym Polska), a uzyskane obrazy archiwizowano przy pomocy zintegrowanego systemu akwizycji obrazu.

3.4.3. Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)

Reakcje Real-Time PCR wykonano z użyciem zestawu QuantiFast SYBR Green PCR (NOVAZYM, POLSKA), zaprojektowanym do stosowania w protokole dwuetapowym, w którym proces przyłączania starterów do matrycy (anealing) i syntezy produktu (elongacja) są ze sobą połączone (Rycina 6). W reakcji wykorzystano polimerazę DNA Hot Start Taq Plus, której aktywacja trwała 5 min w temperaturze 95°C. Proces denaturacji matrycy DNA trwał 10 sek. w temperaturze 95°C, po czym w trakcie 30 sek. następowało wydłużanie sekwencji DNA w temperaturze 60°C. Na tym etapie dokonywano detekcji fluorescencji, co umożliwiało pomiar wartości względnej intensywności fluorescencji oraz temperatury topnienia produktów reakcji dla poszczególnych szczepów bakterii. Proces weryfikacji pozytywnych wyników wykonano z wykorzystaniem kanału fluorescencji FAM Green. W zależności od pierwotnego stężenia matrycy bakteryjnego DNA, ilość cykli reakcji zawierała się pomiędzy 35- 40. Specjalnie opracowany bufor zawiera dodatek PCR Q-Bond, który znacznie przyspiesza przebieg reakcji skracając czas denaturacji, renaturacji oraz elongacji. Denaturację prowadzono w temperaturze 95°C, po której następował bezpośrednio etap wydłużania w 60°C. Protokół ten wykorzystano dla starterów o temperaturze topnienia poniżej 60°C. W celu uzyskania maksymalnej efektywności reakcji, długości starterów zawierały się w przedziale 60–200 pz.



Rycina 6 - Metoda Real Time PCR do oceny ilościowej za pomocą barwnika fluorescencyjnego SYBR I. (źródło własne).

W metodzie Real-Time PCR, zastosowanej w przeprowadzonych badaniach, do oceny ilościowej wykorzystano barwnik fluorescencyjny SYBR Green I. Jest to jeden z barwników interkalujących do DNA, który preferencyjnie wnika w strukturę mniejszego rowka. W trakcie reakcji PCR, z każdym cyklem amplifikacji, wraz ze wzrostem ilości produktu wzrasta stechiometrycznie ilość związanych cząsteczek fluorochromów, a tym samym intensywność sygnału fluorescencyjnego. Barwnik fluorescencyjny SYBR Green I obecny w wykorzystanej w trakcie analiz mieszaninie reakcyjnej, umożliwia analizę ilości produktu reakcji bez konieczności syntezy specyficznych znakowanych sond.

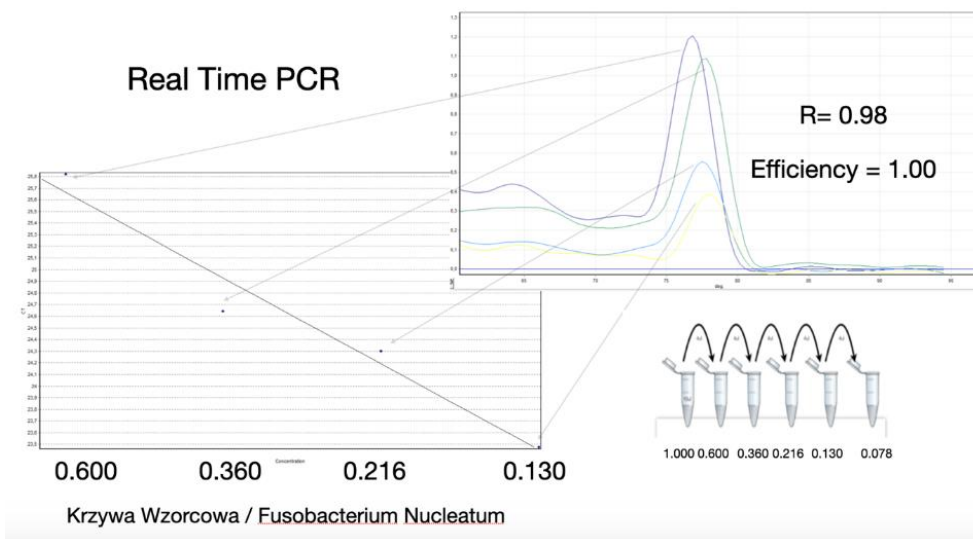
Tabela 10 - Podsumowanie poszczególnych składników oraz ich objętości wykorzystanych do detekcji periodontopatogenów za pomocą metody Real Time PCR (źródło własne).

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe starterów
Matryca	0,5 μ l	
2 \times QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix	5,0 μ l	
F3 & B3	1,0 μ l	5 pmol każdy
Woda	3,5 μ l	
Całość	10 μ l	

3.5. Liczba kopii bakteryjnego DNA

Kontrolę pozytywną wykorzystaną w badaniach stanowiło DNA wyizolowane z materiału pobranego od seropozytywnych uczestników badania, które zostało następnie poddane sekwencjonowaniu, w celu weryfikacji szczepów bakterii poddawanych detekcji. Ocenę ilościową produktów uzyskanych w trakcie reakcji przeprowadzono na podstawie krzywych wzorcowych wykonanych dla poszczególnych periopatogenów.

Krzywe wzorcowe utworzono na podstawie zbioru pacjentów pozytywnych dla danego patogenu, tak aby uzyskać 10 μ l bakteryjnego DNA. Kolejne stężenia zostały uzyskane poprzez rozcieńczenie. Stężenie o wartości 0.600 uzyskano poprzez pobranie 4 μ l, stężenia o wartości 1.000 i przetransferowanie do 6 μ l sterylnej soli fizjologicznej. Kolejne stężenia otrzymano poprzez ten sam proces rozcieńczenia. Po uzyskaniu odpowiedniej ilości rozcieńczeń, stworzona została krzywa wzorcowa, która umożliwiła na oszacowanie wyjściowej liczby kopii bakteryjnego DNA.



Rycina 7 - Krzywa wzorcowa dla ilości kopii Białka terminacyjnego/antyterminacyjnego transkrypcji (NusG) *F. nucleatum*. Wartość współczynnika nachylenia krzywej $R = 0.98$ dla reakcji o wydajności = 1.00 (źródło własne)

3.6. Analiza Statystyczna

Uzyskane wyniki stomatologicznych badań klinicznych poddano analizie statystycznej. Parametry statystyki opisowej: wartości średnich, mediany, odchyłeń standardowych, obliczono dla zmiennych mierzalnych w grupie chorych (badanej) i kontrolnej (PUW-Z, GI, SBI PD, CAL).

Podstawowe dane takie jak średnia, mediana oraz odchylenie standardowe, umożliwiły na wyciągnięcie ogólnych wniosków na temat parametrów grupy chorych oraz kontrolnej. Wykorzystano test U Manna-Whitneya w celu porównania między grupą chorych, a kontrolną poniższych parametrów, jak również pomiędzy poszczególnymi parametrami (wskaźnikami periodontologicznymi) takimi jak: PD (głębokość kieszonek), GI (Gingival index) oraz SBI (indeks krwawienia kieszonek), CAL i PUW-Z. Wyniki przyjęto za statystycznie istotne przy $p < 0,05$.

Diagnostyczna dokładność testów (czułość i swoistość) LAMP, Real-Time PCR oraz konwencjonalne PCR, została zbadana za pomocą analizy odbiornika (ROC). Obszary ROC pod krzywą (AUC) o wartości większej niż 0,5, uważane były za najniższą granicę dla istotnej dyskryminacji między badanymi grupami. Im bliżej ROC AUC jest zbliżona do wartości 1,0, tym większa ogólna dokładność testu. Dokładne poziomy AUC, 95% przedziały ufności (95% CI).

Test ANOVA Friedmana z uwzględnieniem współczynnika zgodności Kendalla, pozwolił na określenie czy istnieją statystycznie istotne różnice pomiędzy liczbą kopii dla poszczególnych periodontopatogenów.

WYNIKI

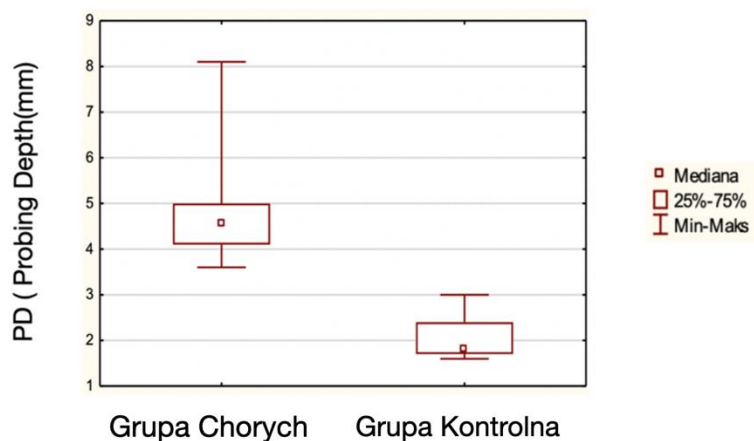
Dane demograficzne zawarto w Tabeli 1 w rozdziale Materiał i metody.

4.1. Wyniki badań klinicznych

Wyniki badań klinicznych przedstawiono w Tabeli 11.

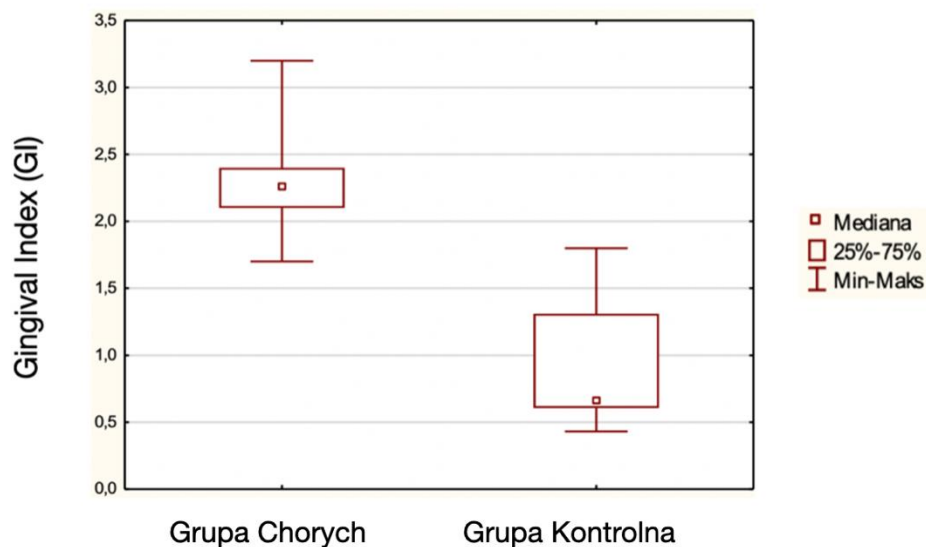
Tabela 11 - Stan dziąseł i przyzębia w grupie badanej i kontrolnej.

Zmienna	Grupa badana n=62 Grupa kontrolna n=56	Śr.	Med.	Min	Maks	Odch.std.	P – wartość Test U Manna Whitneya
PD (mm)	badana	4,8	4,55	3,6	8,1	0,92	0,0001
	kontrolna	1,95	1,8	1,6	3	0,36	
GI	badana	2,25	2,25	1,7	3,2	0,32	0,0001
	kontrolna	0,9	0,65	0,43	1,8	0,43	
SBI	badana	2,8	2,5	1,3	4,9	1,01	0,0001
	kontrolna	0,28	0,14	0,09	0,9	0,28	
CAL (mm)	badana	3,82	3,45	1,8	5,8	0,97	0,0001
	kontrolna	0,17	0,13	0,01	0,9	0,16	



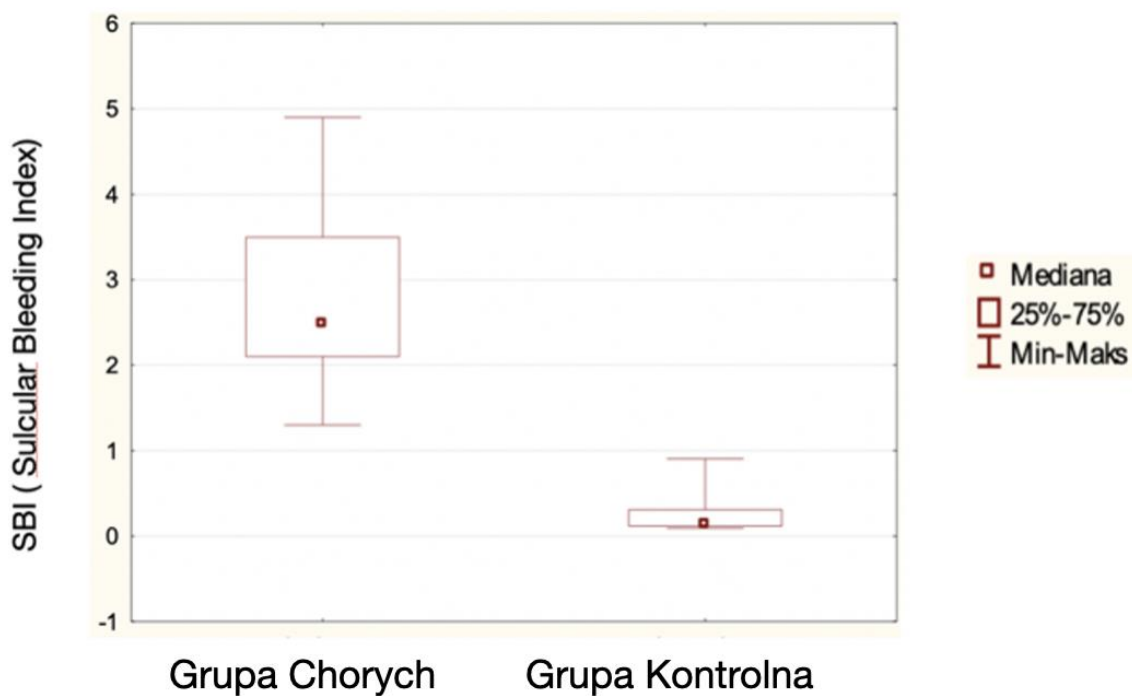
Rycina 8 - Głębokość kieszonki przyzębnej w grupie badanej (chorej) i kontrolnej.

Mediana wskaźnika głębokości kieszonki przyzębnej wynosi 4,55 mm w grupie badanej i 1,8 mm w kontrolnej.



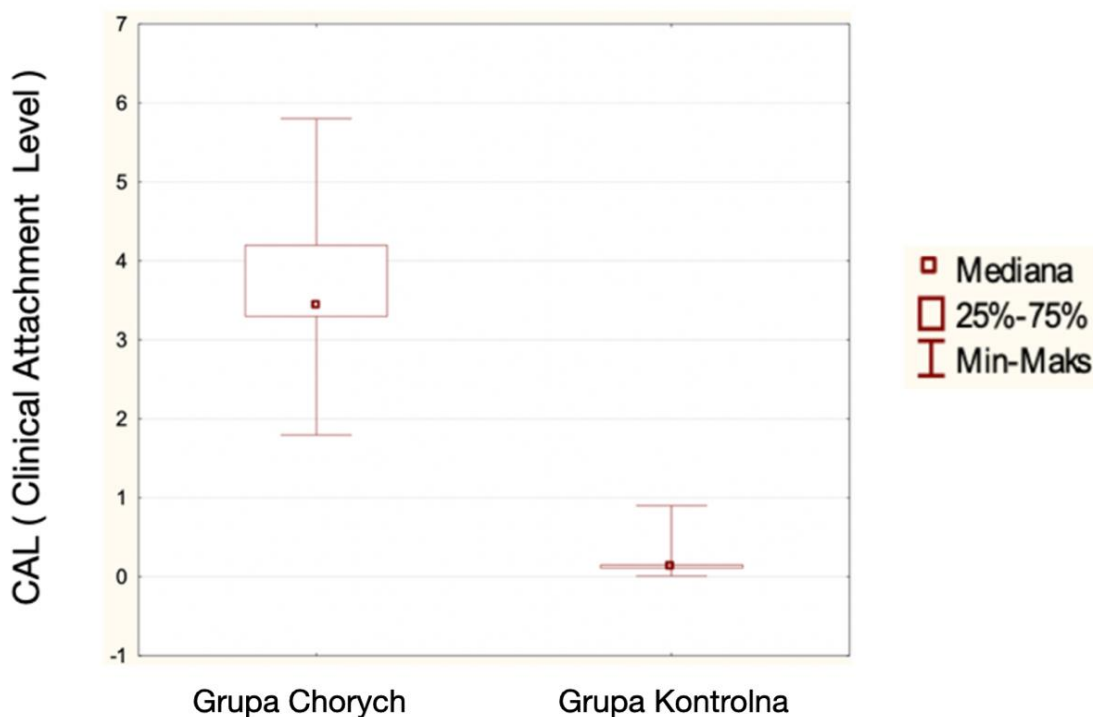
Rycina 9 - Stan dziąseł (na podstawie wskaźnika GI) w grupie badanej i kontrolnej.

Mediana wskaźnika GI dla grupy badanej wynosiła 2,25, natomiast dla kontrolnej 0,65.



Rycina 10 - Stan dziąseł (na podstawie wskaźnika krwawienia SBI) w grupie badanej i kontrolnej.

Mediana wskaźnika SBI dla grupy badanej wskazywała wartość 2,5, natomiast dla kontrolnej 0,14.



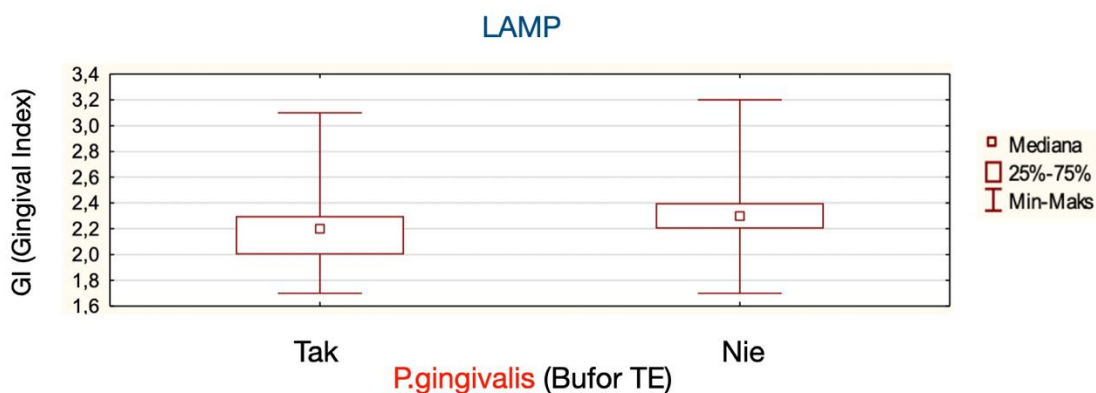
Rycina 11 - Stan przyzębia (na podstawie wskaźnika CAL) w grupie badanej i kontrolnej. Mediana wskaźnika CAL w grupie badanej wynosiła 3,45 mm, natomiast w kontrolnej 0,13mm.

4.2. Wyniki badań molekularnych w zależności od badanych zmiennych klinicznych

4.2.1. Zależności pomiędzy wykrywalnością obecności *P.gingivalis* za pomocą testów LAMP, Real Time PCR, PCR a badanymi zmiennymi.

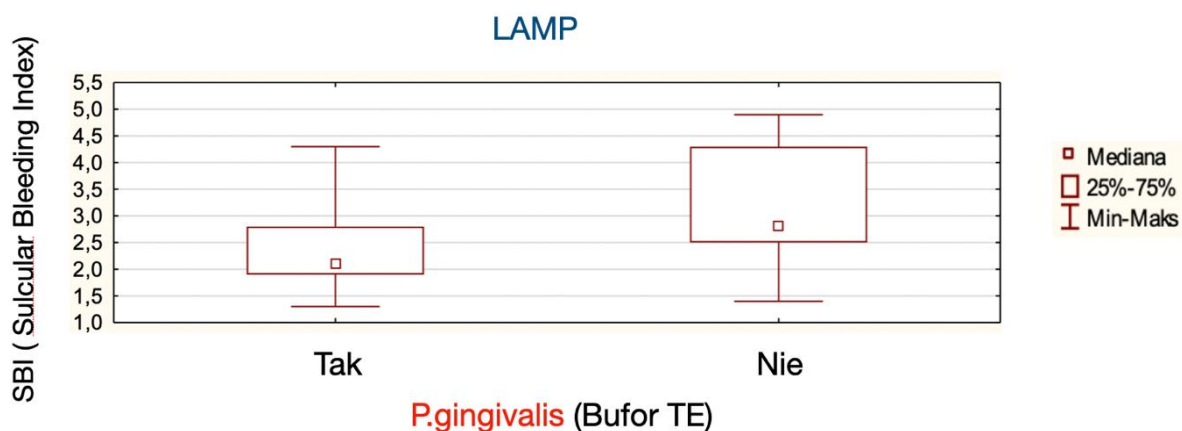
P.gingivalis; LAMP (bufor TE)

W grupie badanej, spośród 60 pacjentów, u których przeprowadzono test LAMP w buforze TE, bakterię *P.gingivalis* wykryto u 27 osób (45,00%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii wykrytej testem LAMP w buforze TE, a zmiennymi, z wyjątkiem GI oraz SBI. Mediany wskaźników GI i SBI dla osób, u których stwierdzono obecność bakterii wynosiły odpowiednio: 2,30 i 2,80, a dla tych, u których jej nie było odpowiednio 2,49 ($p=0,01$) i 2,10. Szczegóły przedstawiono na rycinie 12 i 13 oraz tabeli 12.



Rycina 12 - Zależność wykrywalności *P.gingivalis* za pomocą testu LAMP (bufor TE) od zmiennej GI.

Stwierdzono statystycznie istotną zależność pomiędzy obecnością bakterii *P.gingivalis* wykrytej testem LAMP w buforze TE, a zmienną GI (wskaźnik stanu dziąseł).



Rycina 13 - Zależność wykrywalności *P.gingivalis* za pomocą testu LAMP (bufor TE) od zmiennej SBI.

Odnotowano statystycznie istotną zależność pomiędzy obecnością bakterii *P.gingivalis* wykrytej testem LAMP w buforze TE, a zmienną SBI.

Tabela 12 - Wykrywalność bakterii P. gingivalis, za pomocą testu LAMP Bufor TE, w zależności od poszczególnych zmiennych.

Zmienna	Wartość testu (Chi ²)	p-wartość
płeć	2,7	p=0,09
wiek	0,91	p=0,63
diagnoza		p=0,54
status palenia	0,06	p=0,80
Etap	2,79	p=0,24
stopień	0,10	p=0,95
stabilność	0,01	p=0,90
PD (mm)	Z=-0,54	p=0,58
GI	Z=-2,49	p=0,01
SBI	Z=-2,49	p=0,01
CAL	Z=-0,80	p=0,92
P	Z=0,04	p=0,62
U	Z=-0,89	P=0,75
W	Z=-0,42	p=0,97
PUW -Z	Z=-0,26	p=0,79

Stała obecność bakterii *P.gingivalis* z biegiem czasu nasila proces zapalny i może przeistoczyć się w zapalenie przyzębia z ewidentnym wzrostem wskaźników GI oraz SBI.

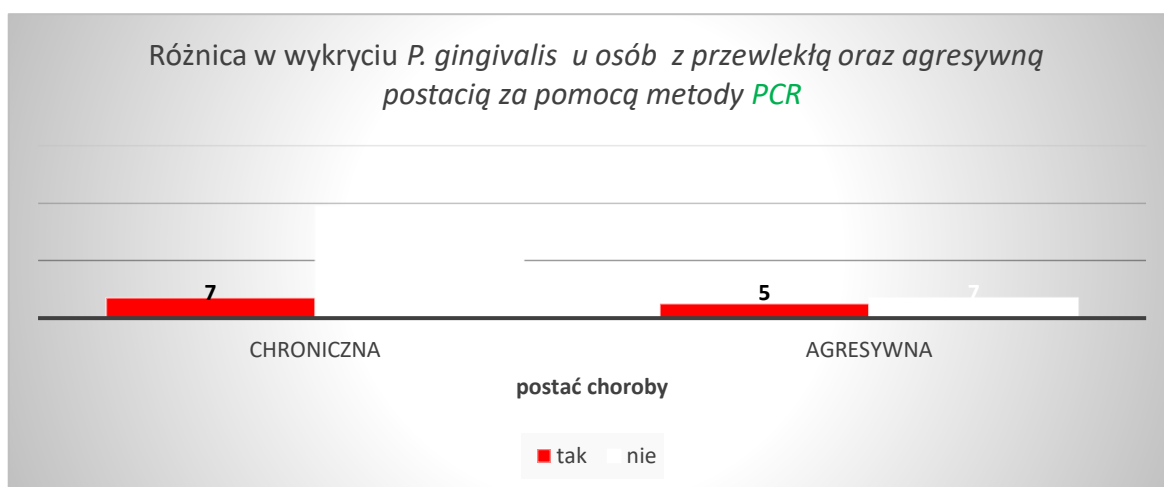
***P.gingivalis* LAMP (bufor Difast)**

Analizując uzyskane wyniki 35 osób chorych, u których przeprowadzono test LAMP w buforze „Difast”, bakterię *P.gingivalis* wykryto u dwóch (5,71%), nie wskazano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii wykrytej testem LAMP „Difast”, a badanymi zmiennymi. Szczegółowy opis wyników poszczególnych grup zawarty został w indeksie.

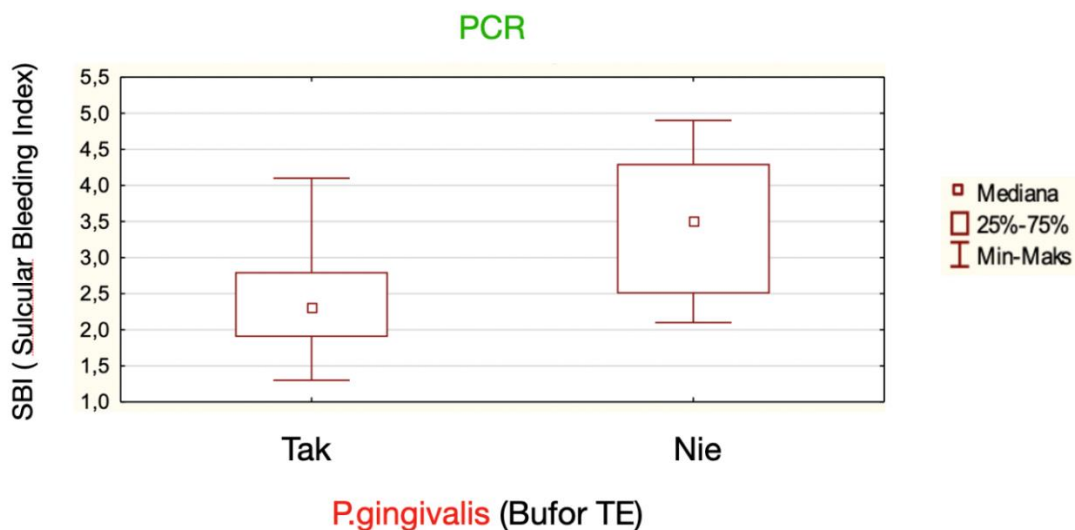
***P.gingivalis* PCR (bufor TE)**

Wśród 58 osób, u których przeprowadzono test PCR w buforze TE, bakterię *P.gingivalis* wykryto u 12 (20,69%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii wykrytej testem PCR w buforze TE, a zmiennymi, z wyjątkiem różnicy pomiędzy wykryciem bakterii *P.gingivalis* u osób z przewlekłą oraz agresywną postacią choroby ($p=0,04$) oraz wskaźnika SBI ($p=0,01$).

Wśród pacjentów, u których wykryto bakterię, było 5 osób (41,67%) z rozpoznaniem agresywnej postaci choroby, natomiast wśród pacjentów, u których nie stwierdzono bakterii, agresywną postać choroby miało 7 osób (15,22%). Mediana indeksu SBI dla osób z obecnością bakterii wynosiła 3,50, a dla tych bez jej obecności 2,80 ($p=0,01$). Szczegóły przedstawiają ryciny 14 oraz 15 oraz tabela 12.



Rycina 14 - Przewlekły oraz agresywny wariant choroby w grupie badanej u osób z dodatnim wynikiem na obecność *P. gingivalis* uzyskany za pomocą metody PCR.



Rycina 15 - Zależność wykrywalności P.gingivalis za pomocą testu PCR (bufor TE) od zmiennej SBI.

Mediana indeksu SBI dla osób z obecnością bakterii *P.gingivalis* wynosiła 3,50, a dla osób bez jej obecności 2,80 ($p=0,01$) uzyskana za pomocą metody PCR.

Tabela 13 - Wykrywalność bakterii P.gingivalis za pomocą testu PCR w buforze TE w zależności od poszczególnych zmiennych.

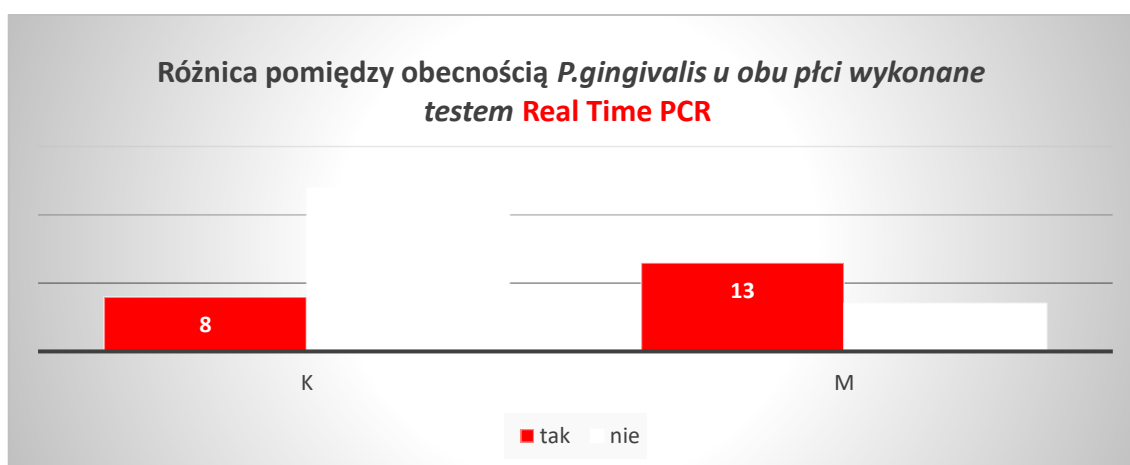
Zmienna	Wartość testu (Chi ²)	p-wartość
płeć	0,02	p=0,88
wiek	4,46	p=0,10
diagnoza	4,06	p=0,04
status palenia	0,24	p=0,62
etap	3,62	p=0,16
stopień	1,92	p=0,38
stabilność	1,60	p=0,20
PD (mm)	-1,26	p=0,20
GI	-1,3	p=0,18
SBI	-2,56	p=0,01
CAL (mm)	-1,50	p=0,13
P	-0,66	p=0,50
U	0,86	p=0,38
W	-0,62	p=0,53
PUW -Z	-0,01	p=0,98

***P.gingivalis*; PCR (bufor „Difast”)**

Wśród 35 osób, u których przeprowadzono test PCR z wykorzystaniem buforu „Difast”, bakterię *P.gingivalis* wykryto u dwóch (5,71%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii wykrytej testem PCR „Difast”, a badanymi zmiennymi. Szczegółowy opis wyników poszczególnych grup zawarty został w indeksie.

***P.gingivalis*; Real-Time PCR (bufor TE)**

Wśród 52 pacjentów, u których przeprowadzono test Real-Time PCR z wykorzystaniem buforu TE *P.gingivalis* wykryto u 21 osób (33,87%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii wykrytej testem Real-Time PCR w buforze TE, a zmiennymi, z wyjątkiem płci. ($p=0,006$.)



Rycina 16 - Wykrywalność *P. gingivalis* za pomocą testu Real Time PCR w zależności od płci.

Detekcja bakterii *P.gingivalis* za pomocą testu Real-Time PCR (bufor TE) wskazała na statystycznie istotną różnicę pomiędzy grupą 13 mężczyzn (61,90%) i 8 kobiet (38,10%).

Tabela 14 - Wykrywalność bakterii *P.gingivalis* za pomocą testu Real-Time PCR w buforze TE w zależności od badanych zmiennych.

Zmienna	Wartość testu (Chi ²)	p-wartość
płeć	7,28	p=0,006
wiek	5,36	p=0,06
diagnoza	0,36	p=0,54
status palenia	0,02	p=0,87
Etap	4,10	p=0,12
stopień	0,07	p=0,96
stabilność	1,55	p=0,21
PD (mm)	Z=-1,5	P=0,11
GI	Z=-1,21	P=0,22
SBI	Z=-1,44	P=0,14
CAL	Z=-0,80	P=0,41
P	Z=0,56	P=0,56
U	Z=0,31	P=0,75
W	Z=-0,42	P=0,66
PUW -Z	Z=0,16	P=0,86

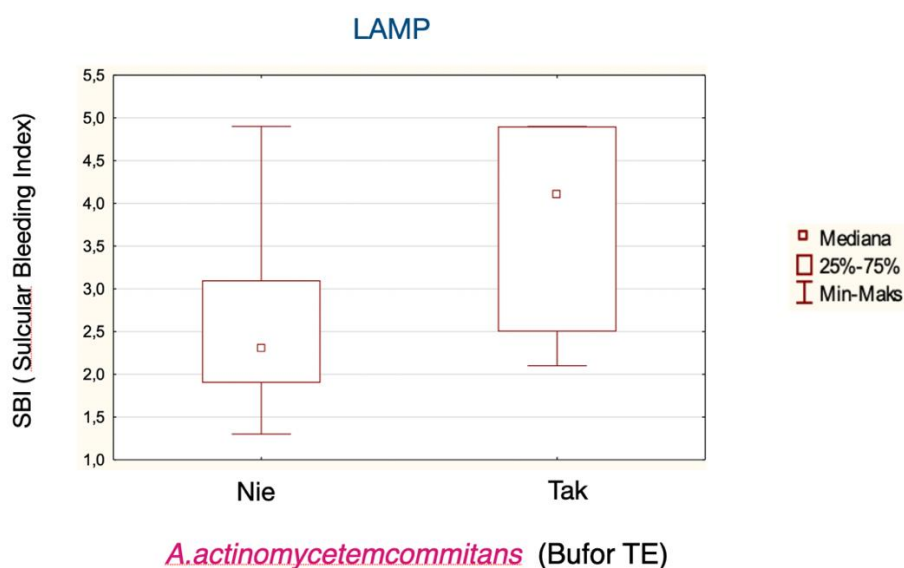
***P.gingivalis*; Real-Time PCR (bufor „Difast”)**

Pośród 31 osób, u których przeprowadzono test Real-Time PCR w buforze „Difast”, bakterię *P.gingivalis* wykryto u czterech (33,87%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością tej bakterii a badanymi zmiennymi. Szczegółowy opis wyników poszczególnych grup zawarty został w indeksie.

4.2.2. Zależności pomiędzy wykrywalnością obecności *A.actinomycescomitans* wykrytej za pomocą wykrytych testów LAMP, Real-Time PCR, PCR, a badanymi zmiennymi.

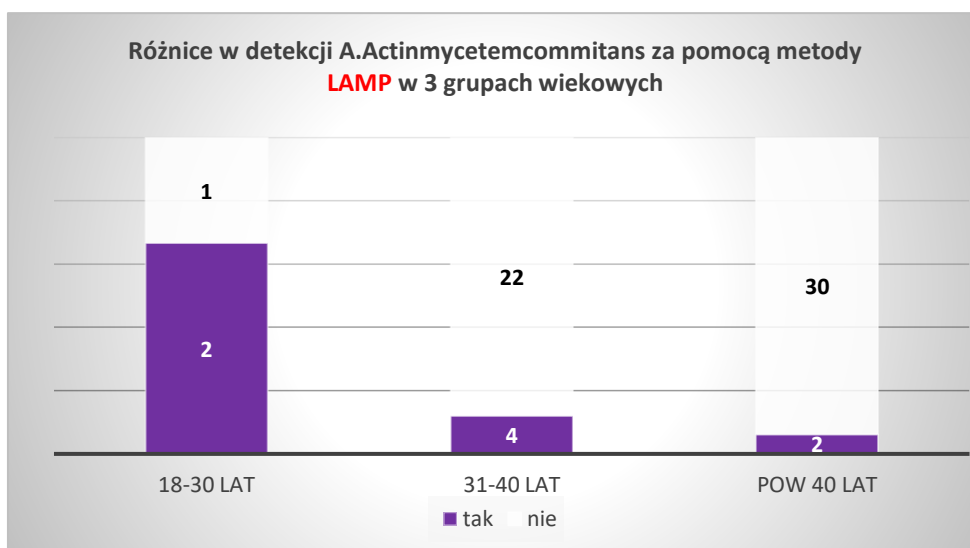
A.actinomycescomitans; LAMP (bufor TE)

Wśród 60 osób, u których przeprowadzono test LAMP dla *A.actinomycescomitans* w buforze TE, bakterię wykryto u 7 (11,67%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii wykrytej testem LAMP w buforze (TE), a zmiennymi, z wyjątkiem wieku ($p=0,00931$) oraz SBI; ($p=0,01$). Szczegóły przedstawiają ryciny 17, 18 oraz tabela 15.



Rycina 17 - Zależność wykrywalności *A.actinomycescomitans* za pomocą testu LAMP (bufor TE) od zmiennej SBI.

Zaobserwowano statystycznie istotną zależność pomiędzy obecnością bakterii *A.actinomycescomitans* wykrytej testem LAMP w buforze (TE), a zmienną SBI. ($p=0,01$).



Rycina 18 - Wykrywalność *A.actinomycetemcomitans* za pomocą testu LAMP (bufor TE) w zależności od wieku

Wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy trzema grupami wiekowymi. U osób w przedziale wiekowym 18-30 lat (dwie) (28,57%), 31-40 lat (cztery) (42,85 %) oraz powyżej 40 lat (dwie) (28,57%) zaobserwowano obecność *A.actinomycetemcomitans* za pomocą metody LAMP.

*Tabela 15 - Wykrywalność bakterii *A.actinomycetemcomitans* za pomocą testu LAMP w buforze TE, w zależności od badanych zmiennych.*

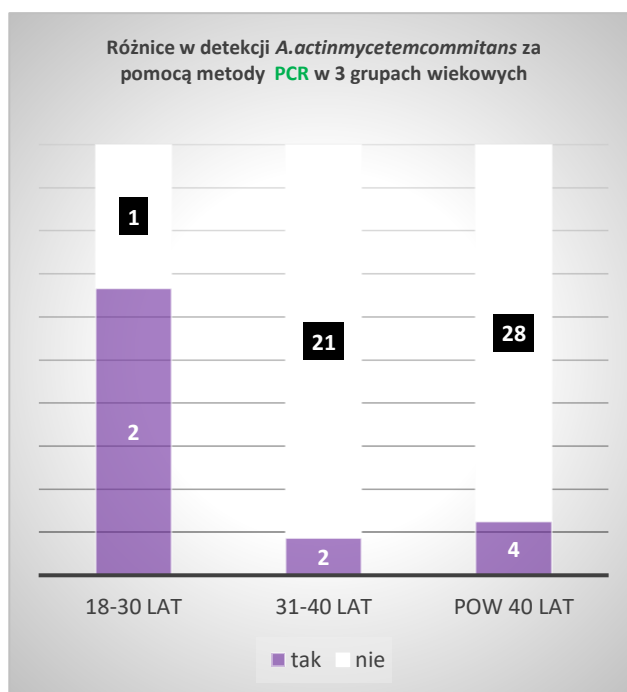
Zmienna	Wartość testu (Chi ²)	p-wartość
płeć	1,04	0,30
wiek	9,35	0,00931
diagnoza	1,59	0,10
status palenia	1,06	0,30
Etap	0,31	0,85
stopień	2,55	0,27
stabilność	0,86	0,35
PD (mm)	Z=0,47	0,63
GI	Z=-0,03	0,96
SBI	Z=-2,37	0,01
CAL (mm)	Z=0,03	0,97
P	Z=-1,78	0,07
U	Z=-0,50	0,61
W	Z=-0,59	0,54
PUW -Z	Z=-0,88	0,37

A.actinomycetemcomitans; LAMP (bufor „Difast”)

Natomiast u żadnej spośród 35 osób, u których przeprowadzono test LAMP w buforze „Difast”, nie wykryto bakterii *A.actinomycetemcomitans*.

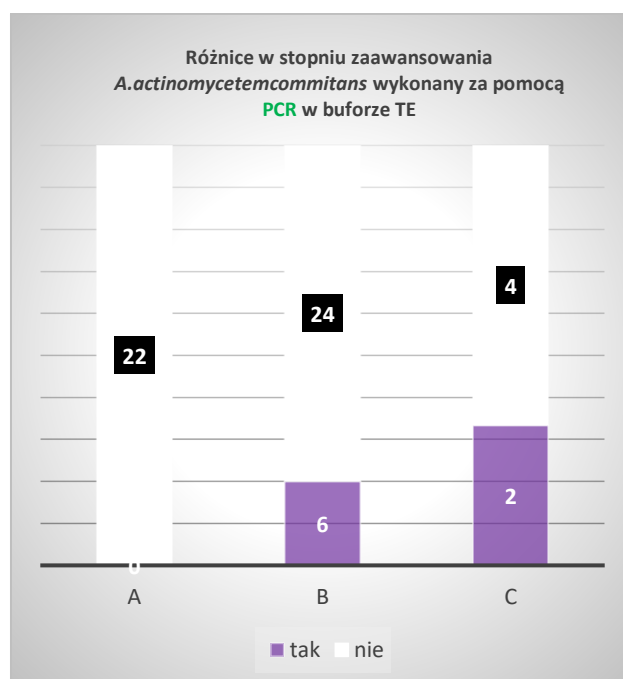
A.actinomycetemcomitans; PCR (bufor TE)

Wśród 58 osób, u których przeprowadzono test PCR dla *A.actinomycetemcomitans* w buforze TE, bakterię wykryto u 8 (13,79%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii wykrytej testem PCR z wykorzystaniem buforu TE, a badanymi zmiennymi, z wyjątkiem wieku ($p=0,02$) oraz stopnia zaawansowania choroby ($p=0,03$). Szczegóły przedstawiają ryciny 19, 20 oraz tabela 16.



Rycina 19 - Wykrywalność *A.actinomycetemcomitans* za pomocą metody PCR (bufor TE) w zależności od wieku

Zaobserwowano statystycznie istotne zależności pomiędzy trzema grupami wiekowymi. U osób w przedziale wiekowym 18-30 lat (dwie) (25.00%), 31-40 lat (dwie) (25.00 %) oraz powyżej 40 lat (cztery) 50.00%) wykryto obecność *A.actinomycetemcomitans*.



Rycina 20 - Wykrywalność *A.actinomycetemcomitans* za pomocą metody PCR (bufor TE) w zależności od stopnia zaawansowania choroby przyzębia.

Zaobserwowano różnice w stopniu zaawansowania choroby: u nikogo z badanych nie stwierdzono stopnia A (0,00%), u sześciu stwierdzono stopień B (75,00%), a dwóch (25,00%) stopień C choroby.

Tabela 16 - Wykrywalność bakterii *A.actinomycetemcommitans* za pomocą testu PCR dla w buforze TE, w zależności od badanych zmiennych.

Zmienna	Wartość testu (Chi ²)	p-wartość
płeć	2,08	0,14
wiek	7,25	0,02
diagnoza	3,01	0,08
status palenia	0,08	0,77
Etap	1,44	0,48
stopień	6,73	0,03
stabilność	1,28	0,25
PD (mm)	Z=-0,54	0,58
GI	Z=0,72	0,46
SBI	Z=-1,62	0,10
CAL (mm)	Z=-0,47	0,63
P	Z=-0,82	0,41
U	Z=0,51	0,60
W	Z=-0,74	0,45
PUW -Z	Z=-0,03	0,97

A.actinomycetemcommitans; PCR (bufor „Difast”)

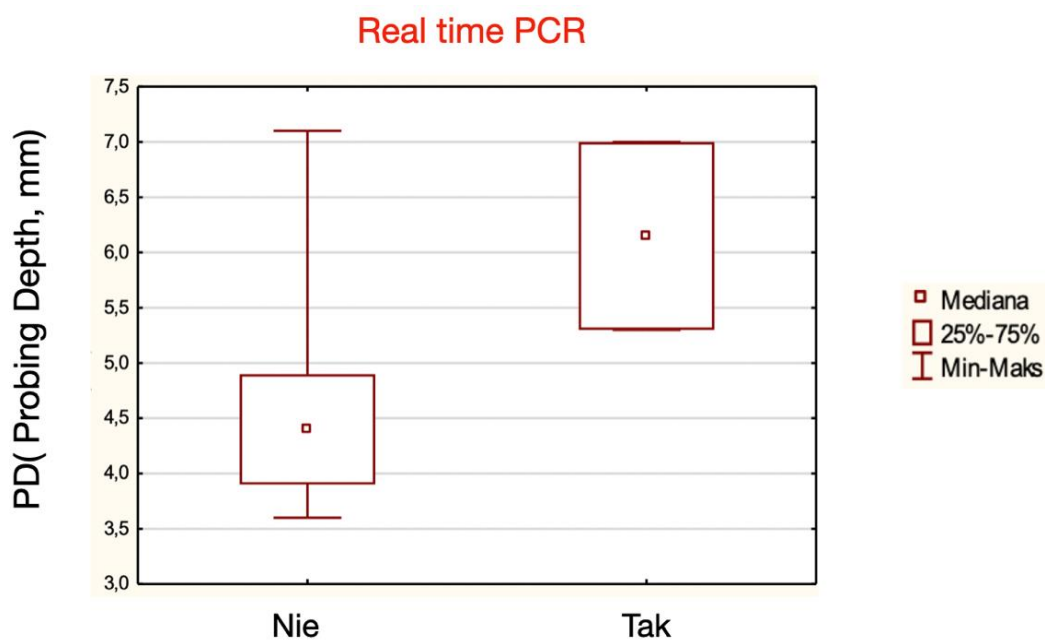
Wśród 35 osób, u których wykonano test PCR dla *A.actinomycetemcommitans* w buforze „Difast”, bakterię wykryto u pięciu (14,29%), nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a badanymi zmiennymi. Szczegółowy opis grup zawarty został w indeksie.

***A.actinomycetemcomitans*; Real-Time PCR (bufor TE)**

Wśród 57 osób, u których przeprowadzono test Real-Time PCR dla *A.actinomycetemcomitans* w buforze TE, bakterię wykryto u 8 osób (14,04%), nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a zmiennymi. Szczegółowy opis wyników poszczególnych grup zawarty został w indeksie.

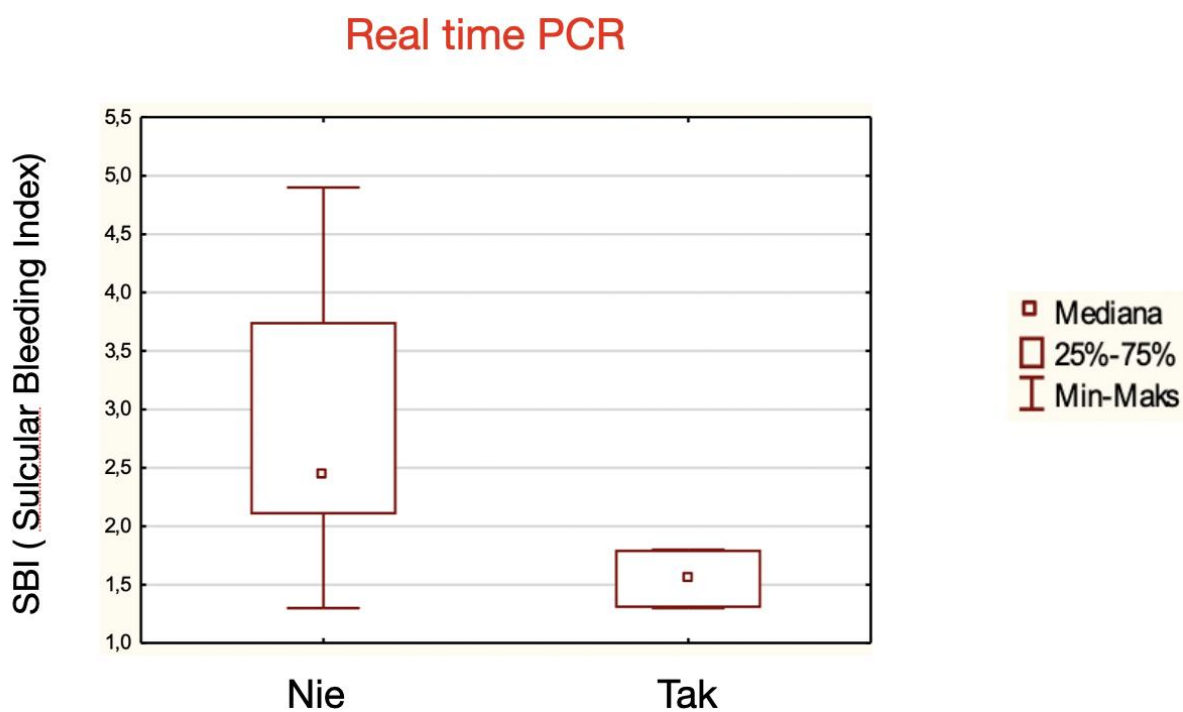
***A.actinomycetemcomitans*; Real time PCR (bufor Difast)**

Wśród 32 osób, u których przeprowadzono test Real-Time PCR dla *A.a* w buforze „Difast”, bakterię wykryto u dwóch (5,88%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii wykrytej testem Real-Time „Difast”, a badanymi zmiennymi z wyjątkiem głębokości kieszonki ($p=0,04$) oraz SBI ($p=0,04$). Szczegóły przedstawiają ryciny 21, 22 oraz tabela 17.

***A.actinomycetemcomitans* (Bufor Difast)**

Rycina 21 - Zależność wykrywalności *A.actinomycetemcomitans* za pomocą testu Real time PCR (bufor Difast) od zmiennej PD.

Wykazano istotnie statystyczną zależność pomiędzy obecnością bakterii *A.actinomycetemcomitans* wykrytej testem Real-Time „Difast”, a zmienną PD ($p=0,04$).



***A.actinomycetemcommitans* (Bufor Difast)**

*Rycina 22 - Zależność wykrywalności *A.actinomycetemcommitans* za pomocą testu Real time PCR (bufor Difast) od zmiennej SBI.*

Wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy obecnością bakterii *A.actinomycetemcommitans* wykrytej testem Real-Time PCR z wykorzystaniem buforu „Difast”, a zmienną SBI ($p=0,04$).

*Tabela 17 - Wykrywalność bakterii *A.actinomycetemcomitans* za pomocą testu Real Time dla (bufor „Difast”) w zależności od badanych zmiennych.*

Zmienna	Wartość testu (Chi ²)	p-wartość
płeć	0,18	0,66
wiek	1,68	0,43
diagnoza	0,02	0,88
status palenia	0,26	0,60
Etap	2,01	0,36
stopień	2,77	0,24
stabilność	1,76	0,18
PD (mm)	Z=-1,97	0,04
GI	Z=0,65	0,51
SBI	Z=2,04	0,04
CAL (mm)	Z=-0,84	P=0,39
P	Z=-0,14	P=0,88
U	Z=0,47	P=0,63
W	Z=0,07	P=0,94
PUW-Z	Z=0,25	P=0,79

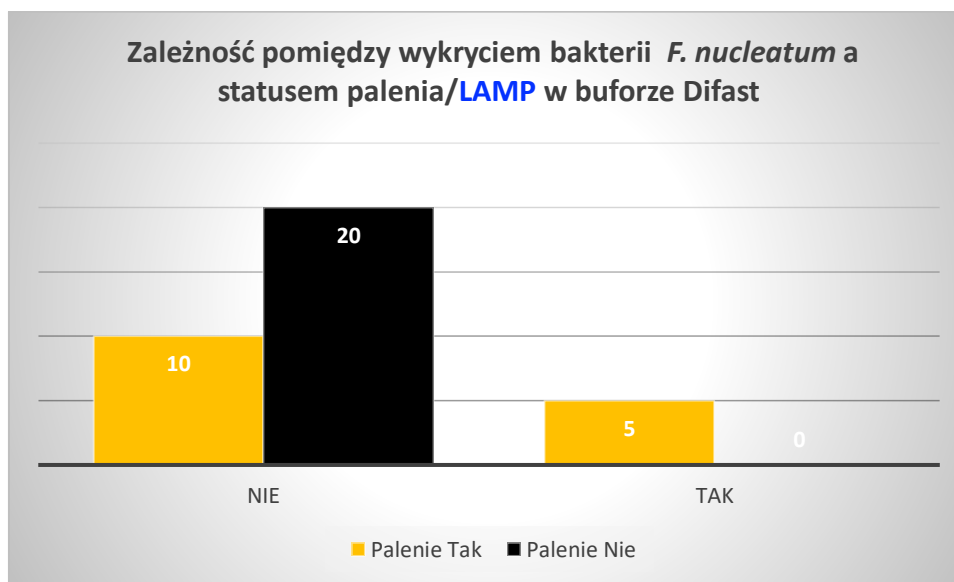
4.2.3. Zależności pomiędzy wykrywalnością obecności *F.nucleatum* za pomocą testów LAMP, Real-Time PCR, PCR a badanymi zmiennymi.

F. Nucleatum; LAMP (bufor TE)

Wśród 58 osób, u których przeprowadzono test LAMP *F. Nucleatum* w buforze TE, bakterię tę wykryto u 15 (25,86%), nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a badanymi zmiennymi. Szczegółowy opis wyników poszczególnych grup zawarty został w indeksie.

F. Nucleatum; LAMP (bufor „Difast”)

Wśród 35 osób, u których przeprowadzono test LAMP *F. Nucleatum* w buforze „Difast”, bakterię wykryto u pięciu (14,29%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a badanymi zmiennymi, z wyjątkiem statusu palenia ($p=0,02$). Szczegóły przedstawiają ryciny 23 oraz tabela 18.



*Rycina 23 - Wykrywalność bakterii *F.nucleatum* za pomocą testu LAMP w buforze Difast w zależności od statusu palenia*

Wykryto istotną zależność pomiędzy detekcją patogenu *F.nucleatum*, a statusem palenia. Wszystkie osoby, u których stwierdzono obecność bakterii (5 osób) (100,00%), były palaczami. Test wykonano za pomocą metody LAMP z wykorzystaniem buforu „Difast”.

Tabela 18 - Wykrywalność bakterii *F. Nucleatum* za pomocą testu LAMP (bufor Difast) w zależności od badanych zmiennych. zmiennymi.

Zmienna	Wartość testu (Chi ²)	p-wartość
płeć	0,19	0,66
wiek	1,33	0,51
diagnoza	0,01	0,93
status palenia	5,01	0,02
Etap	0,53	0,76
stopień	1,56	0,45
stabilność	0,01	0,94
PD (mm)	Z=-1,10	0,26
GI	Z=1,69	0,08
SBI	Z=0,68	0,49
CAL (mm)	Z=0,68	0,49
P	Z=-1,36	0,17
U	Z=1,08	0,27
W	Z=1,20	0,22
PUW-Z	Z=0,96	0,33

***F. Nucleatum*; PCR (bufor TE)**

Wśród 58 pacjentów, u których przeprowadzono test PCR na obecność *F. Nucleatum* w buforze TE, bakterię wykryto u 13 osób (22,41%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a zmiennymi. Szczegółowy opis wyników poszczególnych grup zawarty został w indeksie.

***F. Nucleatum*; PCR (bufor „Difast”)**

Wśród 35 osób, u których przeprowadzono test PCR na obecność *F. Nucleatum* „Difast”, bakterię wykryto u 6 osób (17,14%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii a zmiennymi. Szczegółowy opis grup zawarty został w indeksie.

F. Nucleatum; Real Time PCR (bufor TE)

Wśród 54 osób, u których przeprowadzono test Real-Time PCR na obecność *F.Nucleatum* bufor TE, bakterię wykryto u 12 (22,22%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a zmiennymi. Szczegółowy opis wyników poszczególnych grup zawarty został w indeksie.

F. Nucleatum; Real-Time PCR (bufor „Difast”)

Wśród 33 pacjentów, u których przeprowadzono test Real-Time na obecność *F.Nucleatum* „Difast”, bakterię wykryto u 13 (39,39%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a zmiennymi. Szczegółowy opis wyników poszczególnych grup zawarty został w indeksie.

4.2.4. Zależności pomiędzy wykrywalnością obecności T. forsythia za pomocą testów LAMP, Real-Time PCR, PCR, a badanymi zmiennymi***T. forsythia; LAMP (bufor TE)***

Wśród 58 osób, u których przeprowadzono test LAMP na obecność *T.Forsythia* w buforze TE, bakterię wykryto u 10 (17,24%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a badanymi zmiennymi. Szczegółowy opis wyników poszczególnych grup zawarty został w indeksie.

T. forsythia; LAMP (bufor „Difast”)

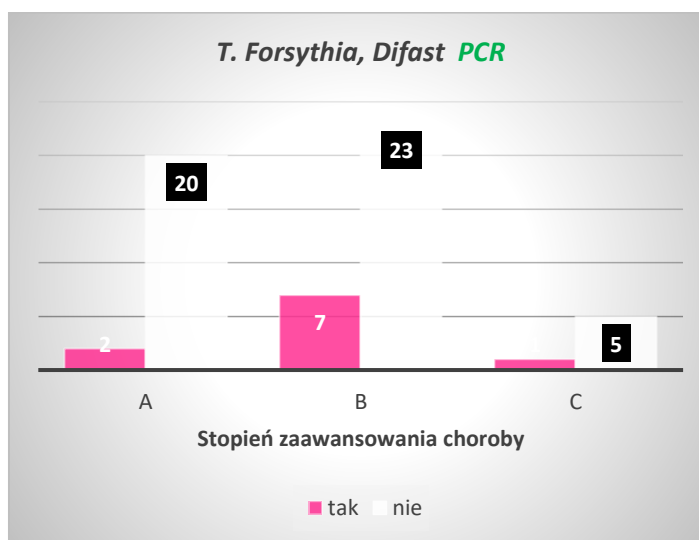
Wśród 35 pacjentów, u których przeprowadzono test LAMP na obecność *T. Forsythia* w buforze „Difast”, bakterię wykryto u dwóch (5,71%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a zmiennymi. Szczegółowy opis grup zawarty został w indeksie.

***T. forsythia*; PCR (bufor TE)**

Wśród 58 osób, u których przeprowadzono test PCR na obecność *T. Forsythia* w buforze TE, bakterię wykryto u 10 (17,24%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a zmiennymi. Szczegółowy opis wyników poszczególnych grup zawarty został w indeksie.

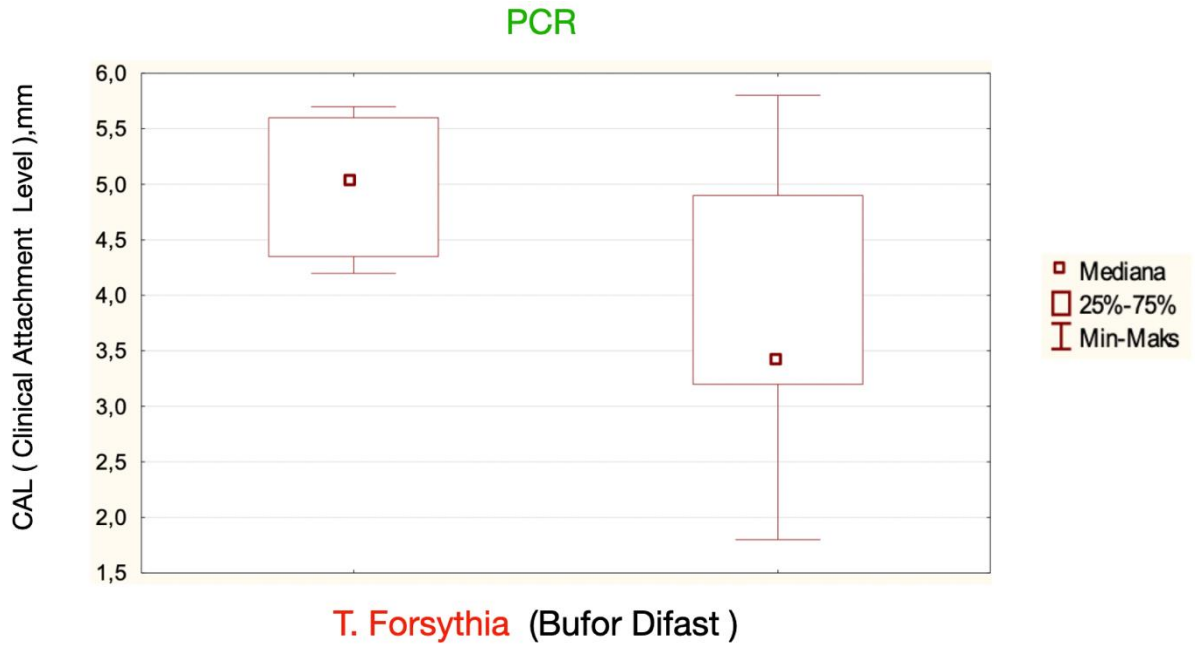
***T. forsythia*; PCR (bufor „Difast”)**

Wśród 35 osób, u których wykonano test PCR na obecność *T.Forsythia* w buforze „Difast” bakterie wykryto u czterech (11,43%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a badanymi zmiennymi, z wyjątkiem stopnia zaawansowania choroby ($p=0,04$) oraz wskaźnika CAL ($p=0,04$). Szczegóły przedstawiają ryciny 24, 25 oraz tabela 19.



Rycina 24 - Wykrywalność *T. forsythia* za pomocą metody PCR (bufor Difast) w zależności od stopnia zaawansowania choroby przyzębia.

Bakterię *T.forsythia* wykryto u dwóch osób ze zdiagnozowanym stopniem A choroby, u 7 ze stopniem B i dwóch ze stopniem C ($p=0,04$).



Rycina 25 - Zależność wykrywalności *T. forsythia* za pomocą testu PCR (bufor Difast) od zmiennej CAL.

Wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy obecnością bakterii *T.forsythia* wykrytej testem PCR z wykorzystaniem buforu „Difast”, a zmienną CAL ($p=0,04$).

Tabela 19 - Wykrywalność bakterii T. Forsythia za pomocą metody PCR w buforze „Difast” w zależności od badanych zmiennych.

Zmienna	Wartość testu (Chi ²)	p-wartość
płeć	0,03	0,87
wiek	0,69	0,70
diagnoza	0,18	0,67
status palenia	0,62	0,43
Etap	4,39	0,11
stopień	6,21	0,04
stabilność	0,08	0,78
PD (mm)	Z=0,00	1,00
GI	Z=-0,36	0,71
SBI	Z=-0,20	0,83
CAL (mm)	Z=1,99	0,04
P	Z=-0,15	0,87
U	Z=0,82	0,40
W	Z=0,72	0,46
PUW -Z	Z=1,11	0,26

***T. forsythia*; Real-Time PCR (bufor TE)**

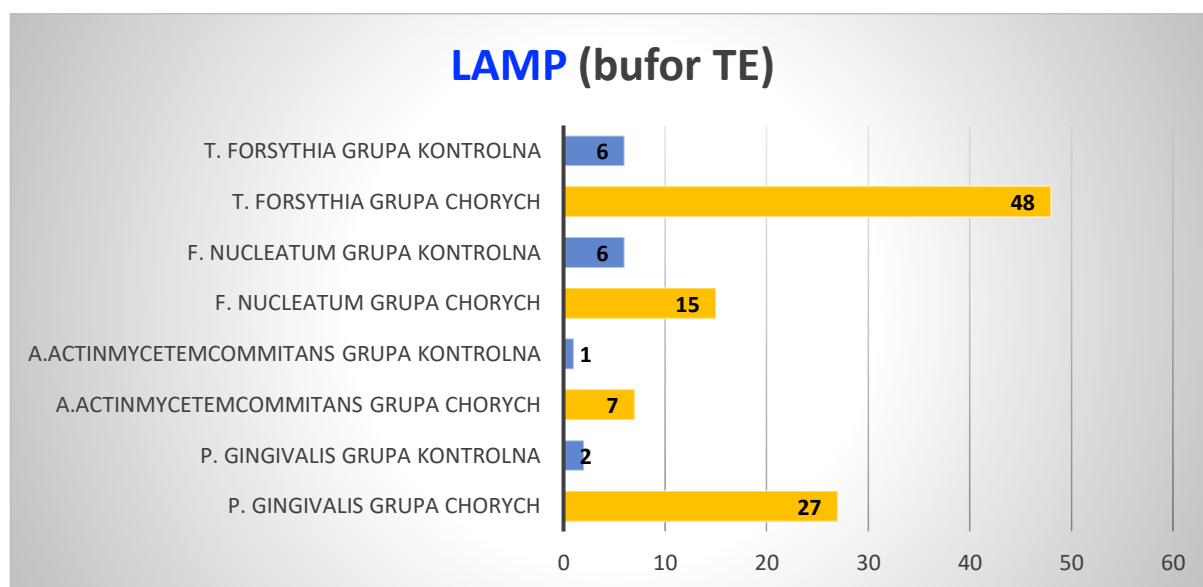
Wśród 48 osób, u których przeprowadzono test Real-Time PCR na obecność *T. Forsythia* Bufor TE, bakterię wykryto u 31 (64,58%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii a badanymi zmiennymi. Szczegółowy opis grup zawarty został w indeksie.

***T. forsythia*; Real Time PCR (bufor „Difast”)**

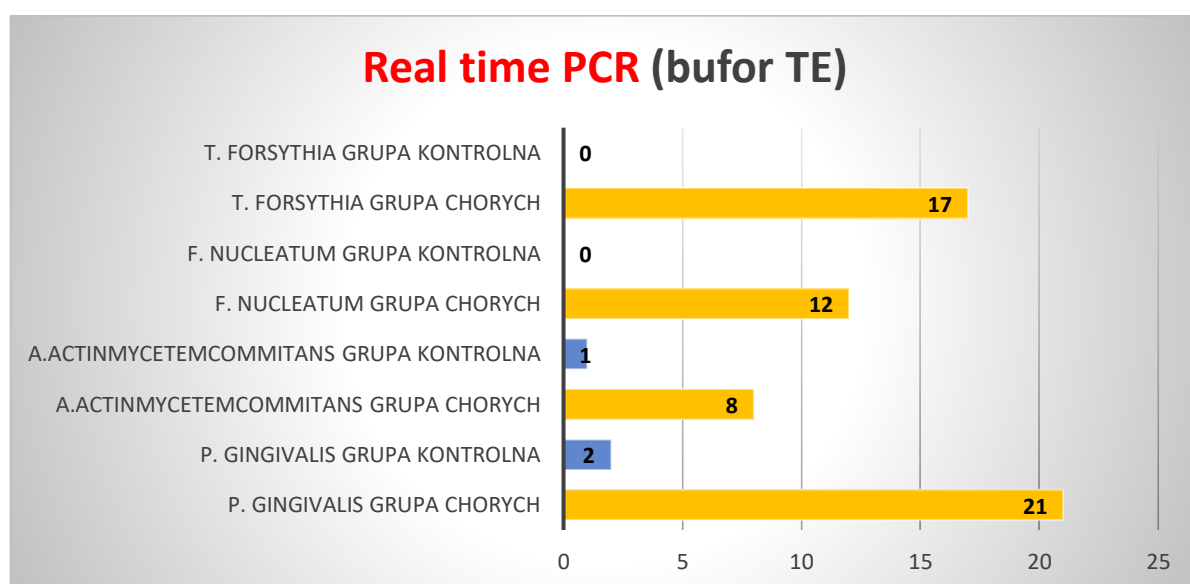
Wśród 22 pacjentów, u których przeprowadzono test Real-Time PCR na obecność *T.Forsythia* w buforze „Difast”, bakterię wykryto u 14 (63,64%). Nie zaobserwowano statystycznie istotnej zależności pomiędzy obecnością bakterii, a zmiennymi. Szczegółowy opis grup zawarty został w indeksie.

4.3. Kwantyfikacja periopatogenów

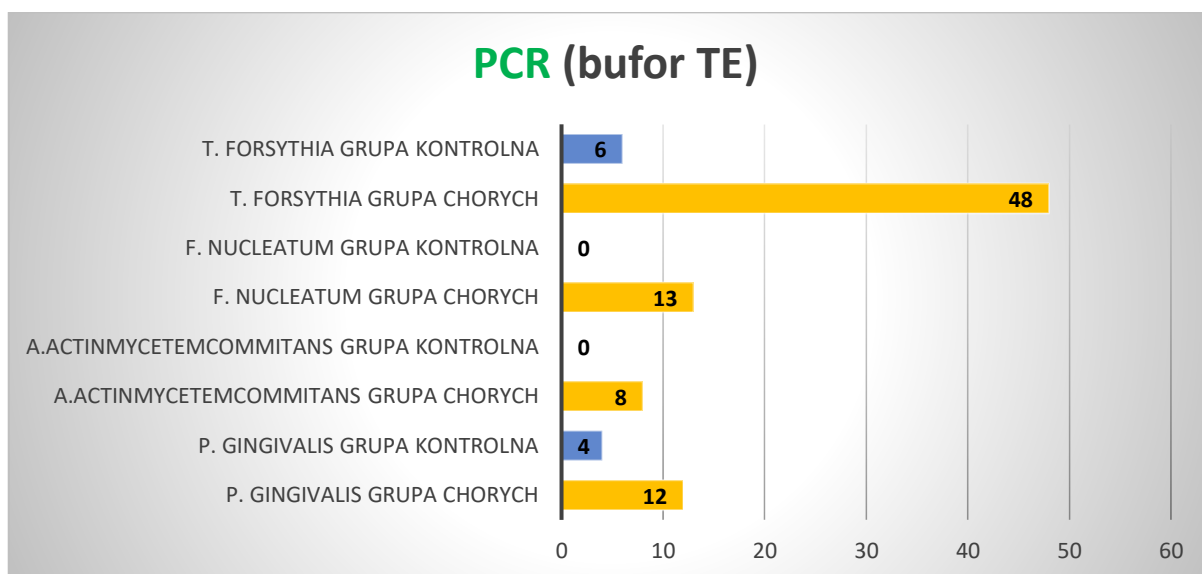
W tabelach 26-30 przedstawiono wyniki badań trzech testów diagnostycznych: LAMP, PCR oraz Real-Time PCR dla poszczególnych bakterii w buforze TE oraz za pomocą testu „Difast” w grupie chorych, natomiast grupa kontrolna nie została uwzględniona. Skuteczność wykrywania bakterii przy wykorzystaniu poszczególnych testów oceniono za pomocą krzywych ROC i opisano w dalszej części pracy.



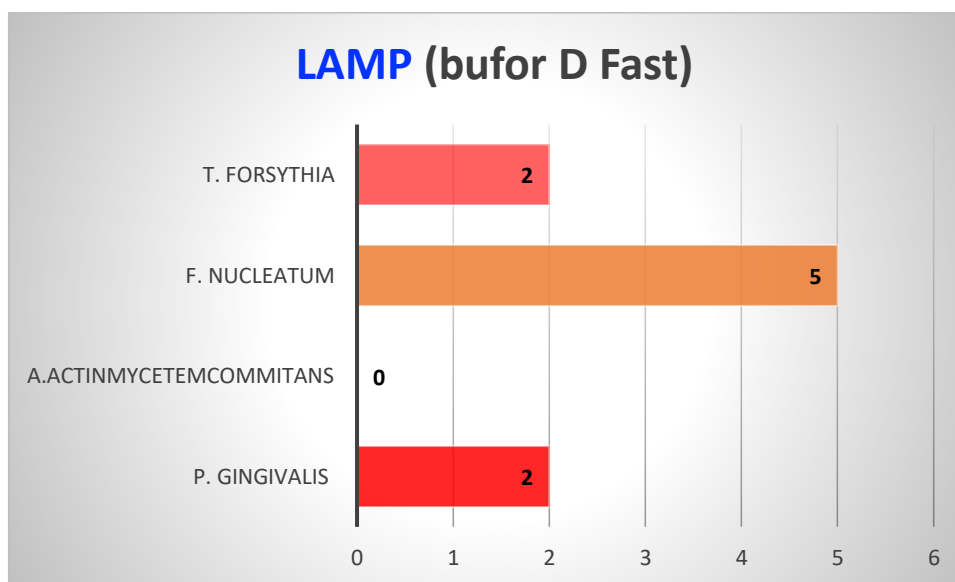
Rycina 26 - Porównanie częstotliwości występowania bakterii w grupie chorych (badanej) oraz kontrolnej wykrytych testem LAMP w buforze TE.



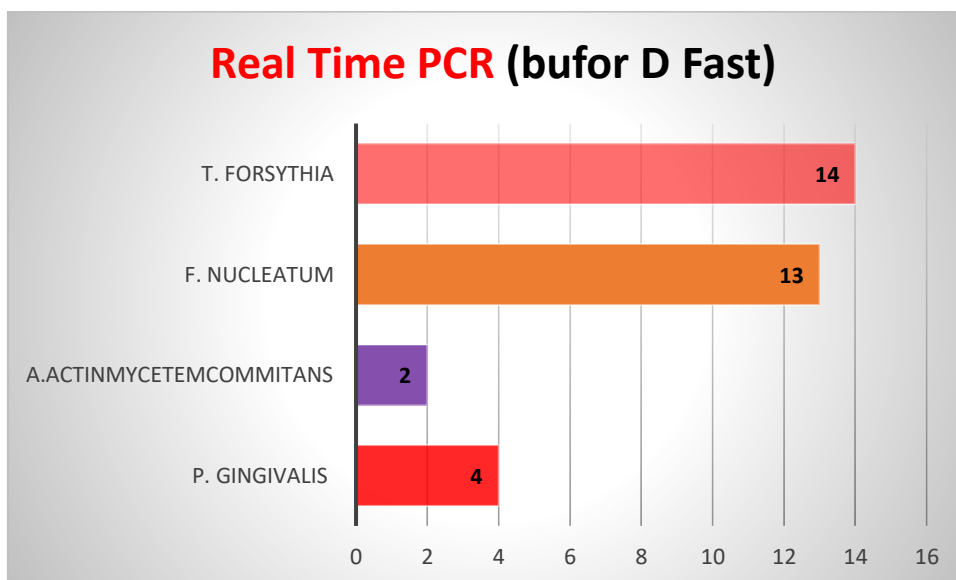
Rycina 27 - Porównanie częstotliwości występowania bakterii w grupie chorych oraz kontrolnej wykrytych testem Real Time PCR w buforze TE.



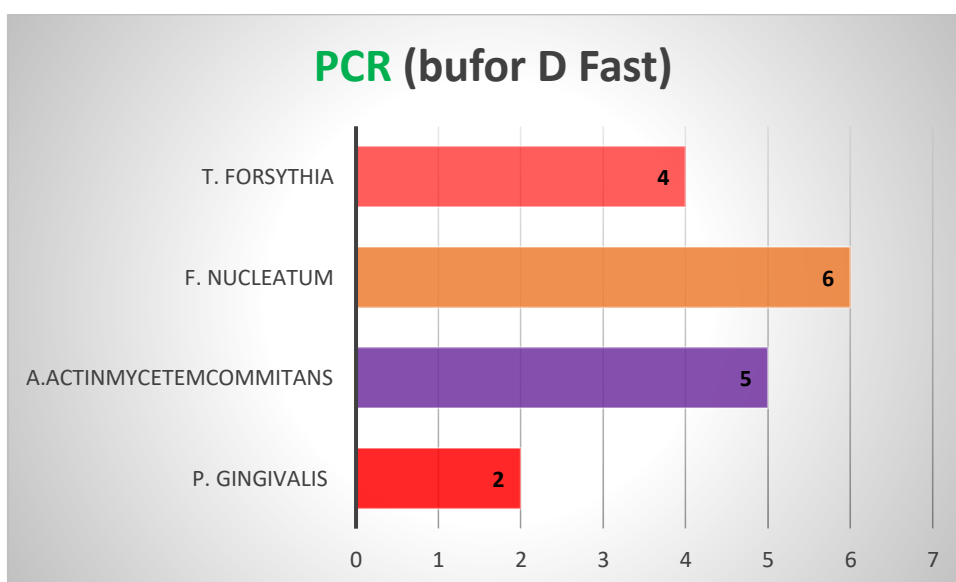
Rycina 28 - Porównanie częstotliwości występowania bakterii w grupie chorych oraz kontrolnej wykrytych testem PCR w buforze TE.



Rycina 29 - Częstotliwość występowania bakterii w grupie chorych (badana) wykrytych testem LAMP w buforze Difast.



Rycina 30 - Częstość występowania bakterii w grupie chorych wykrytych testem Real Time PCR w buforze „Difast”.



Rycina 31 - Częstość występowania bakterii w grupie chorych wykrytych testem PCR w buforze Difast.

4.4. Czulość oraz Swoistość Testów wykorzystanych w badaniu

W oparciu o wyniki badań skonstruowano odpowiednie tabele kontyngencji, w których określono ilość wyników prawdziwie dodatnich (*ang.* True Positives – TP), prawdziwie ujemnych (*ang.* True Negatives - TN), fałszywie dodatnich (*ang.* False Positives – FP) i fałszywie ujemnych (*ang.* False Negatives – FN), a na ich podstawie określono wymienione powyżej wskaźniki. Czulość testu diagnostycznego, czyli zdolność danej metody diagnostycznej do wykrycia rzeczywistej obecności danego patogenu, obliczono wg wzoru:

$$\text{TP czulość} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}}$$

Swoistość każdej metody, czyli zdolność danego badania diagnostycznego do określenia osób, u których w rzeczywistości nie stwierdza się obecności danego patogenu, obliczono wg wzoru:

$$\text{TN swoistość} = \frac{\text{TN}}{\text{FP} + \text{TN}}$$

Dla każdej metody określono również pozytywną wartość predykcyjną (*ang.* Positive Predictive Value – PPV) oraz negatywną wartość predykcyjną (*ang.* Negative Predictive Value – NPV). Wartość PPV wskazuje, z jakim prawdopodobieństwem u pacjenta, u którego stwierdzono obecność badanego patogenu z użyciem danej metody (np. LAMP, Real-Time PCR czy PCR), rzeczywiście bakterie te są obecne, tj. wykryte za pomocą złotych standardów (Real-Time PCR oraz PCR). Wartość NPV z kolei obrazuje, z jaką pewnością można stwierdzić, że u osoby, u której nie stwierdzono obecności danego patogenu w badaniu LAMP, Real-Time PCR czy PCR, rzeczywiście nie stwierdza się obecności patogenu. Aby określić te dwie wartości zastosowano poniższe wzory:

$$\text{TP PPV} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}}$$

$$\text{TN NPV} = \frac{\text{TN}}{\text{FN} + \text{TN}}$$

Detekcja produktów wzrokiem (żel agarozowy) zakłada, że zmienna ze swej natury jest dychotomiczna i nie ma możliwości uzyskania wyniku pośredniego.

W badaniu z wykorzystaniem testów diagnostycznych LAMP, Real-Time PCR uzyskuje się konkretny wynik liczbowy, dlatego w celu określenia odpowiedniego punktu, wykreślono krzywą ROC i dokonano analizy (*ang.* Receiver Operator Characteristics).

PCR w czasie rzeczywistym opiera się na amplifikacji określonego fragmentu DNA, używanego jako matrycy do generowania milionów kopii. PCR w czasie rzeczywistym różni się od konwencjonalnego PCR, ponieważ umożliwia ciągłe monitorowanie DNA

wytwarzanego w każdym cyklu przy użyciu barwników fluoroforowych. Fluorescencja jest uwalniana za każdym razem, gdy syntetyzowana jest nowa kopia DNA, a zatem ilość fluorescencji jest proporcjonalna do ilości wyprodukowanego DNA.

Wyniki PCR w czasie rzeczywistym są wizualizowane na wykresie amplifikacji. Fluorescencja jest przedstawiona na osi Y, podczas gdy liczba cykli PCR jest wykreślona na osi X. Krzywa amplifikacji składa się z fazy początkowej, w której wytwarzana fluorescencja jest poniżej poziomu detekcji termocyklera, drugiej fazy, w której fluorescencja wzrasta (jest to przyrost wykładniczy na początku fazy) i trzeciej fazy (plateau), w której reakcja kończy się, a fluorescencja jest stabilizowana. W drugiej fazie można ustawić wartość progową, która wskazuje obszar wzrostu wykładniczego.

Typowym wynikiem analizy PCR w czasie rzeczywistym z systemem detekcji opartym na barwniku, jest wykres amplifikacji z krzywą dla każdego detektora. Ponieważ poziom sygnału fluorescencji jest zmienny w zależności od barwnika, wartość progowa będzie ustawiana niezależnie dla każdej krzywej. Sygnał wzmocnienia dla każdego barwnika (SYBR 1) będzie uważany za dodatni, gdy krzywa detektora przekracza jego wartość progową. Dlatego próbki będą uważane za pozytywne (obecność patogenu), jeśli wykazują pozytywny sygnał FAM.

Po ustaleniu obecności danego patogenu, możliwym jest wykreślenie krzywej w układzie współrzędnych, w którym na osi x zaznacza się wartość 1 - swoistość, a na osi y - czułość. Następnie analizowane jest pole pod wykresem (ang. Area Under the Curve – AUC), AUC znajduje się w przedziale $<0;1>$. Im wartość jest wyższa, tym wartość diagnostyczna testu jest lepsza. Istotne jest również, aby pole to było statystycznie istotnie różne od wartości 0,5, przy której krzywa przecina wykres na pół, co sugeruje o tym, że wartość badania diagnostycznego jest taka sama, jak losowy przydział do każdej z grup.

4.4.1. Porównanie detekcji *P.gingivalis* z wykorzystaniem metody LAMP (Bufor TE) oraz PCR *P.gingivalis* (Bufor TE) w grupie chorych (badana).

Tabela 20 - Wartości kontyngencji dla P.gingivalis (Bufor TE) analizowanej za pomocą metody PCR.

	Real-Time PCR <i>P. gingivalis</i> Bufor TE (Nie)	Real-Time PCR <i>P. gingivalis</i> Bufor TE (Tak)	Suma
PCR <i>P. gingivalis</i> (Bufor TE) Nie	81 (76,42%)	13 (12,26%)	94 (88,67%)
PCR <i>P. gingivalis</i> (Bufor TE) Tak	4 (3,77%)	8 (5,55%)	12(11,32%)
Ogółem	85 (80,19%)	21 (19,44%)	106

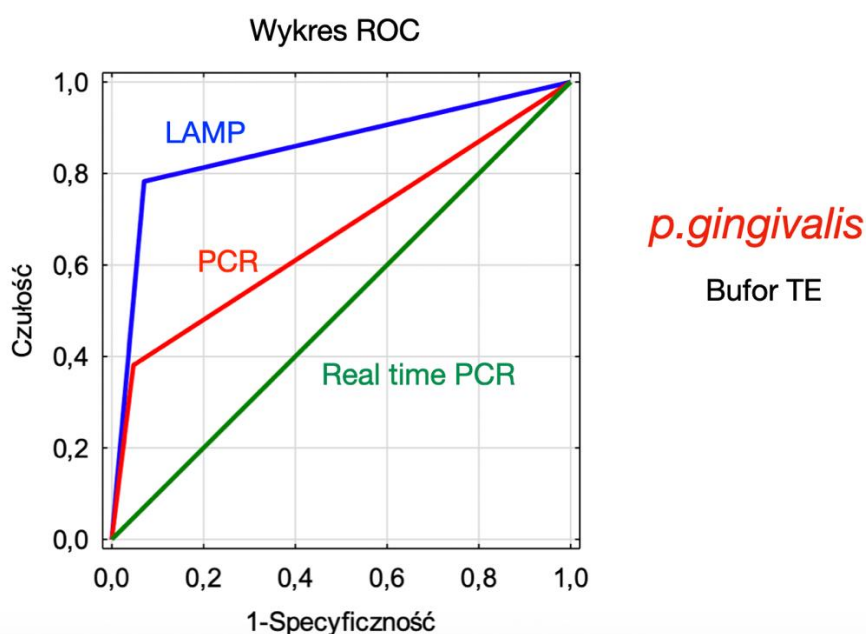
Ryzyko eksponowanych, czyli tak zwana dodatnia wartość predykcyjna (PPV) wyniosła 0,667. Ryzyko nieeksponowanych, czyli tak zwana ujemna wartość predykcyjna (NPV) wyniosła 0,862. Ryzyko względne (RR) wyniosło 4,821. Dokładność (ACC) wyniosła 0,840, czułość (Sensitivity) 0,381, specyficzność (Specificity) 0,953, a wskaźnik J Youdena 0,334.

Tabela 21 - Wartości kontyngencji dla P.gingivalis w buforze TE analizowanej za pomocą metody PCR.

	Real-Time PCR <i>P. gingivalis</i> Bufor TE (Nie)	Real-Time PCR <i>P. gingivalis</i> Bufor TE (Tak)	Suma
LAMP <i>P. gingivalis</i> Bufor TE Nie	79 (73,15%)	5 (4,63%)	84 (77,78%)
LAMP <i>P. gingivalis</i> Bufor TE Tak	6 (5,56%)	18 (16,67%)	24 (22,22%)
Ogółem	85 (78,70%)	23 (21,30%)	108

Ryzyko eksponowanych, czyli tak zwana dodatnia wartość predykcyjna (PPV) wyniosła 0,7500. Ryzyko nieeksponowanych, czyli tak zwana ujemna wartość predykcyjna (NPV) wyniosła 0,940. Ryzyko względne (RR) wyniosło 12,600. Dokładność (ACC) wyniosła 0,898, czułość (Sensitivity) 0,783, specyficzność (Specificity) 0,929, a wskaźnik J Youdena 0,712.

Zaobserwowano statystycznie istotną różnicę w wykrywaniu bakterii *P.gingivalis* pomiędzy testami LAMP i PCR $P=0,006$ – test LAMP był istotnie lepszy od testu PCR.



Rycina 32 - Wykres krzywych ROC dla *P. gingivalis* (bufor TE).

Wykres wskazuje na istotnie lepszy poziom detekcji bakterii *P.gingivalis* za pomocą testu LAMP w porównaniu z testem PCR

4.4.2. Porównanie detekcji *T.Forsythia* z wykorzystaniem metody LAMP (Bufor TE) oraz Real-Time PCR *T.Forsythia* (Bufor TE) (Bufor TE) w grupie chorych (badana).

Za złoty standard wykrywania bakterii przyjęto test PCR w buforze TE. W odniesieniu do niego, obliczono liczbę wyników prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich oraz fałszywie ujemnych dla testu LAMP.

Tabela 22 - Wartości kontyngencji dla *T. forsythia* (Bufor TE) analizowanej za pomocą metody LAMP.

	PCR <i>T. Forsythia</i> Bufor TE (Nie)	PCR <i>T. Forsythia</i> Bufor TE (Tak)	Suma
LAMP <i>T. Forsythia</i> Bufor TE (Nie)	TN= 44 (75,86%)	FN= 4 (6,90%)	48 (82,76%)
LAMP <i>T. Forsythia</i> Bufor TE (Tak)	FP= 4 (6,90%)	TP= 6 (10,34%)	10 (17,24%)
Ogółem	48 (82,76%)	10 (17,24%)	58

Ryzyko eksponowanych, czyli tak zwana dodatnia wartość predykcijna (PPV) wyniosła 0,917. Ryzyko nieeksponowanych, czyli tak zwana ujemna wartość predykcijna (NPV) wyniosła 0,600. Ryzyko względne (RR) wyniosło 2,292. Dokładność (ACC) wyniosła 0,862, czułość (Sensitivity) 0,917, specyficzność (Specificity) 0,600, a wskaźnik J Youdena 0,517.

Za złoty standard wykrywania bakterii przyjęto test PCR Salinie. W odniesieniu do niego, obliczono liczbę wyników prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich oraz fałszywie ujemnych dla testu Real-Time PCR.

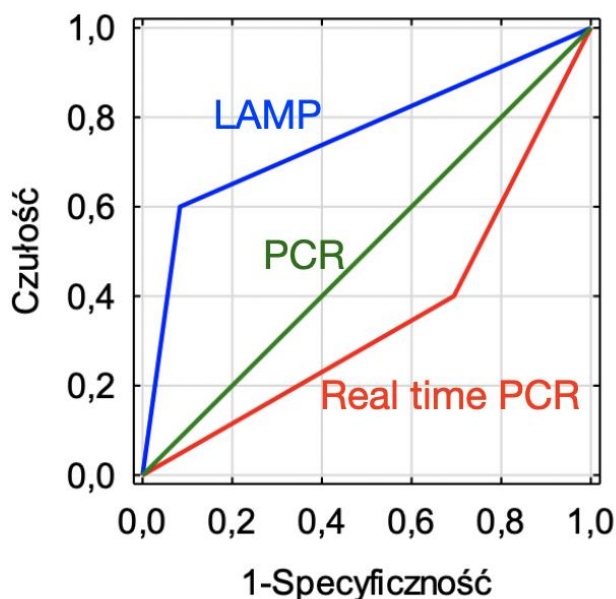
Tabela 23 - Wartości kontyngencji dla *T. forsythia* (Bufor TE) analizowanej za pomocą metody Real-Time PCR.

	PCR <i>T. Forsythia</i> Bufor TE (Nie)	PCR <i>T. Forsythia</i> Bufor TE (Tak)	Suma
Real-time PCR <i>T. Forsythia</i> Bufor TE (Nie)	11 (23,91%)	6 (13,04%)	17 (36,96%)
Real-time PCR <i>T. Forsythia</i> Bufor TE (Tak)	25 (54,35%)	4 (8,70%)	29 (63,04%)
Ogół	36 (78,26%)	10 (21,74%)	46

Ryzyko eksponowanych, czyli tak zwana dodatnia wartość predykcyjna (PPV) wyniosła 0,647. Ryzyko nieeksponowanych, czyli tak zwana ujemna wartość predykcyjna (NPV) wyniosła 0,138. Ryzyko względne (RR) wyniosło 0,751. Dokładność (ACC) wyniosła 0,326, czułość (Sensitivity) 0,306, specyficzność (Specificity) 0,400, a wskaźnik J Youdena - 0,294.

Wykazano statystycznie istotną różnicę w wykrywaniu bakterii *T.Forsythia* przy zastosowaniu testów LAMP Bufor TE i Real-Time PCR (Bufor TE) w odniesieniu do testu PCR Bufor TE – $p=0,0000$ w badanej grupie. Lepsza wykrywalność tej bakterii uzyskano za pomocą testu LAMP w porównaniu z testem Real-Time PCR.

Wykres ROC



T. Forsythia

Bufor TE

Rycina 33 - Wykres krzywych ROC dla *T. forsythia* (bufor TE).

Wykres obrazuje istotnie lepszy poziom detekcji bakterii *T. forsythia* za pomocą testu LAMP w porównaniu z testem Real-Time PCR.

4.4.3. Porównanie detekcji *F. Nucleatum* (bufor DiFast) z wykorzystaniem metody LAMP (Bufor TE) oraz metody Real-Time *F.Nucleatum* PCR (Bufor „Difast”) (Bufor TE) w grupie chorych (badana).

Za złoty standard wykrywania bakterii przyjęto test PCR w buforze TE. W odniesieniu do niego, obliczono liczbę wyników prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich oraz fałszywie ujemnych dla testu LAMP.

Tabela 24 - Wartości kontyngencji dla F.nucleatum (bufor „Difast”) analizowanej za pomocą metody LAMP.

	PCR <i>F. Nucleatum</i> Bufor “Difast” Nie	PCR <i>F. Nucleatum</i> Bufor “Difast” Tak	Suma
LAMP <i>F. Nucleatum</i> Bufor “Difast” Nie	TN= 29 (82,86%)	FN= 1 (2,86%)	30 (85,71%)
LAMP <i>F. Nucleatum</i> Bufor “Difast” Tak	FP= 0 (0,00%)	TP= 5 (14,29%)	5 (14,29%)
Ogółem	29 (82,86%)	6 (17,14%)	35

Ryzyko eksponowanych, czyli tak zwana dodatnia wartość predykcyjna (PPV) wyniosła 0,967. Ryzyko nieeksponowanych, czyli tak zwana ujemna wartość predykcyjna (NPV) wyniosła 1,000. Dokładność (ACC) wyniosła 0,971, czułość (Sensitivity) 1,000, specyficzność (Specificity) 0,833, a wskaźnik J Youdena 0,833.

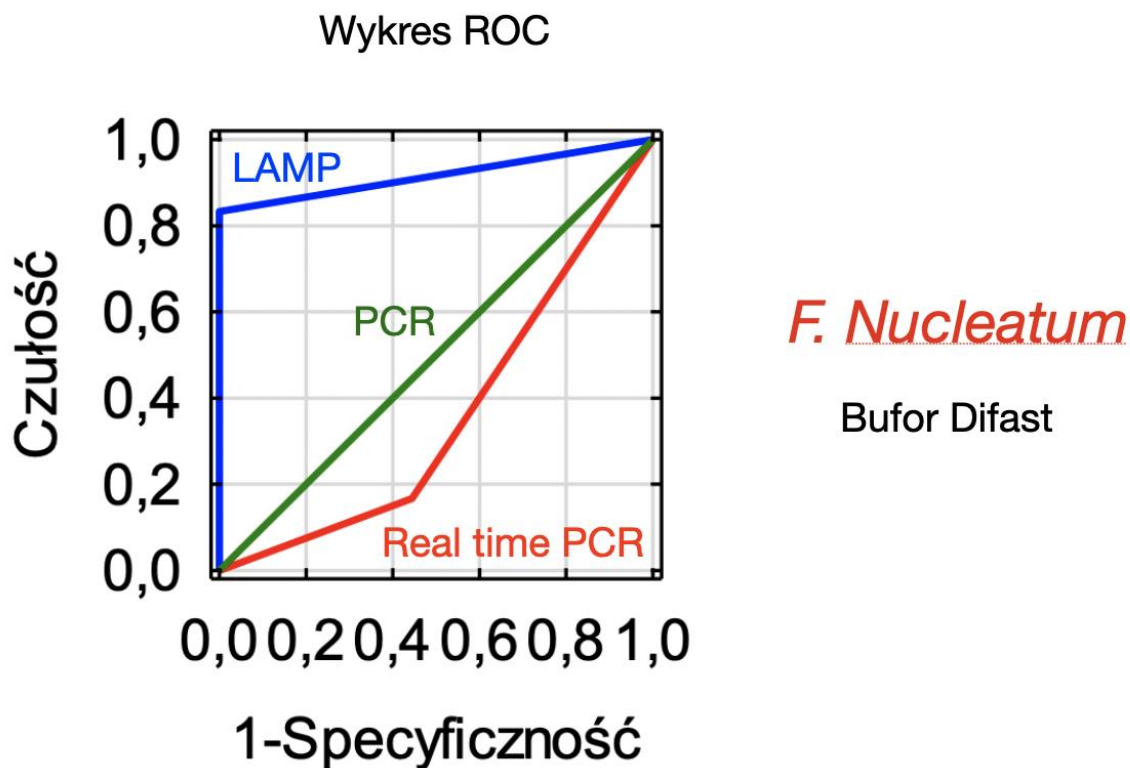
Za złoty standard wykrywania bakterii przyjęto test PCR D Fast. W odniesieniu do niego, obliczono liczbę wyników prawdziwie dodatnich, prawdziwie ujemnych, fałszywie dodatnich oraz fałszywie ujemnych dla testu Real-Time PCR.

*Tabela 25 - Wartości kontyngencji dla *F.nucleatum* (Bufor „Difast”) analizowanej za pomocą metody Real-Time PCR.*

	PCR <i>F. Nucleatum</i> Bufor “Difast” (Nie)	PCR <i>F. Nucleatum</i> Bufor “Difast” (Tak)	Suma
Real time PCR <i>F. Nucleatum</i> Bufor “Difast” (Nie)	15 (45,45%)	5 (15,15%)	20 (60,60%)
Real time PCR <i>F. Nucleatum</i> Bufor “Difast” (Tak)	12 (36,37%)	1 (3,03%)	13 (39,40%)
Ogółem	27 (81,82%)	6 (18,18%)	33

Ryzyko eksponowanych, czyli tak zwana dodatnia wartość predykcyjna (PPV) wyniosła 0,750. Ryzyko nieeksponowanych, czyli tak zwana ujemna wartość predykcyjna (NPV) wyniosła 0,077. Ryzyko względne (RR) wyniosło 0,813. Dokładność (ACC) wyniosła 0,485, czułość (Sensitivity) 0,556, specyficzność (Specificity) 0,167, a wskaźnik J Youdena - 0,278.

Wykazano statystycznie istotną różnicę w wykrywaniu bakterii *F. Nucleatum* za pomocą testów LAMP „Difast” i Real-Time PCR „Difast” w porównaniu z testem PCR „Difast” – $p=0,0000$ w badanej grupie. Lepsza wykrywalność tej bakterii uzyskano za pomocą testu LAMP w porównaniu z testem Real-Time PCR.

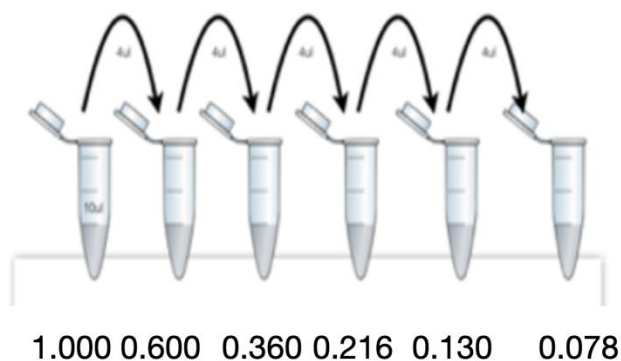


Rycina 34 - Wykres krzywych ROC dla *F. Nucleatum* (bufor Difast).

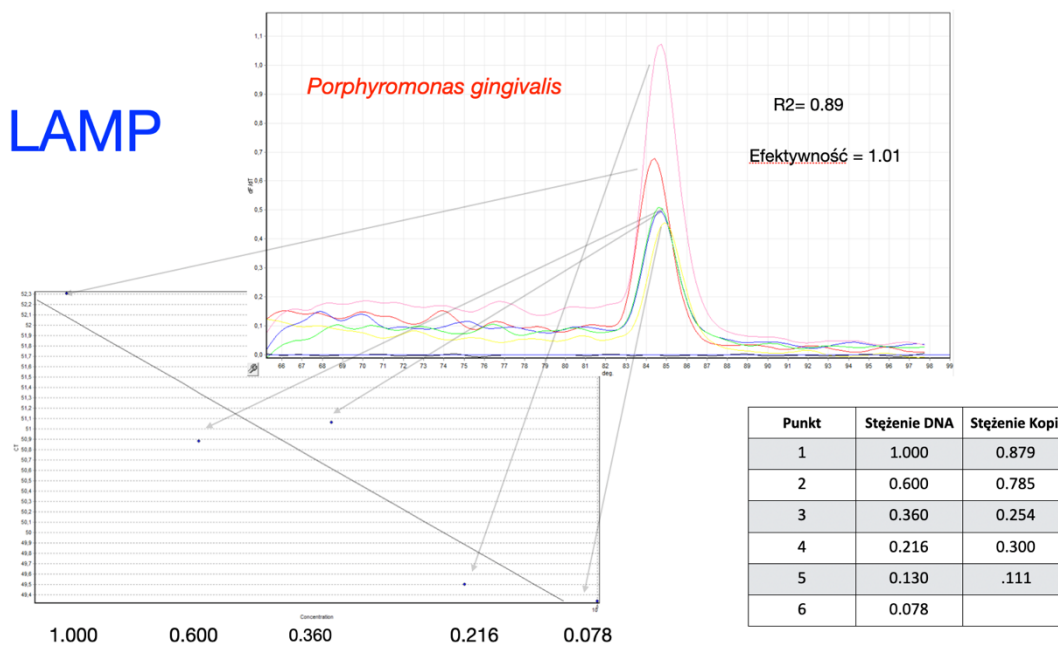
Wykres obrazuje istotnie lepszy poziom detekcji bakterii *F.nucleatum* za pomocą testu LAMP w porównaniu z testem Real-Time PCR przy wykorzystaniu buforu „Difast”.

4.5. Krzywe wzorcowe

Stężenie maksymalne zawarte w krzywej wzorcowej o wartości, 1.000, zostało uzyskane z puli pacjentów, u których stwierdzono obecność DNA danych patogenów. Dla każdej krzywej wzorcowej pozyskano 10ul bakteryjnego DNA. Kolejne stężenia zostały uzyskane poprzez seryjne rozcieńczenie. Stężenie o wartości 0.600 zostało uzyskane poprzez pobranie 4ul stężenia o wartości 1.000 i przetransferowanie do 6ul sterylnej soli fizjologicznej. Kolejne stężenia uzyskiwano stosując ten sam proces rozcieńczenia. Po uzyskaniu odpowiedniej ilości rozcieńczeń, stworzona została krzywa wzorcowa, na bazie, której możliwym było oszacowanie wyjściowej liczby kopii DNA danego patogenu oraz wyznaczenie efektywności danego testu w oparciu o wartości cykli progowych (C_i) osiągniętych dla określonych stężeń początkowych DNA. Poniżej przedstawiono krzywe wzorcowe wraz z wykresami temperatur topnienia bakteryjnego DNA.

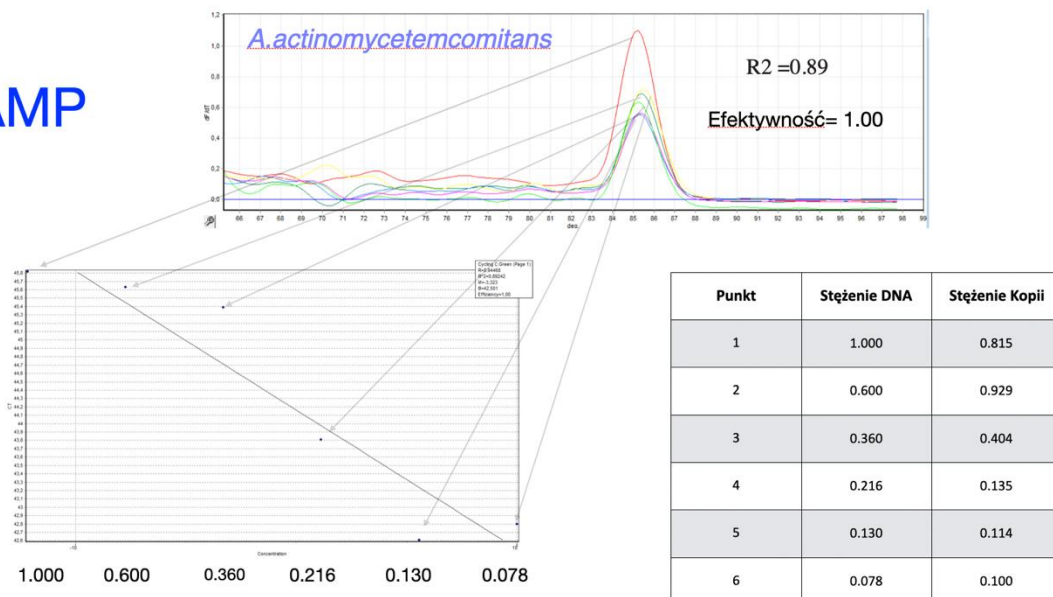


Rycina 35 - Proces elucji bakteryjnego DNA w celu uzyskania krzywej wzorcowej na bazie, której został wygenerowany wyjściowy numer kopii bakteryjnego DNA.



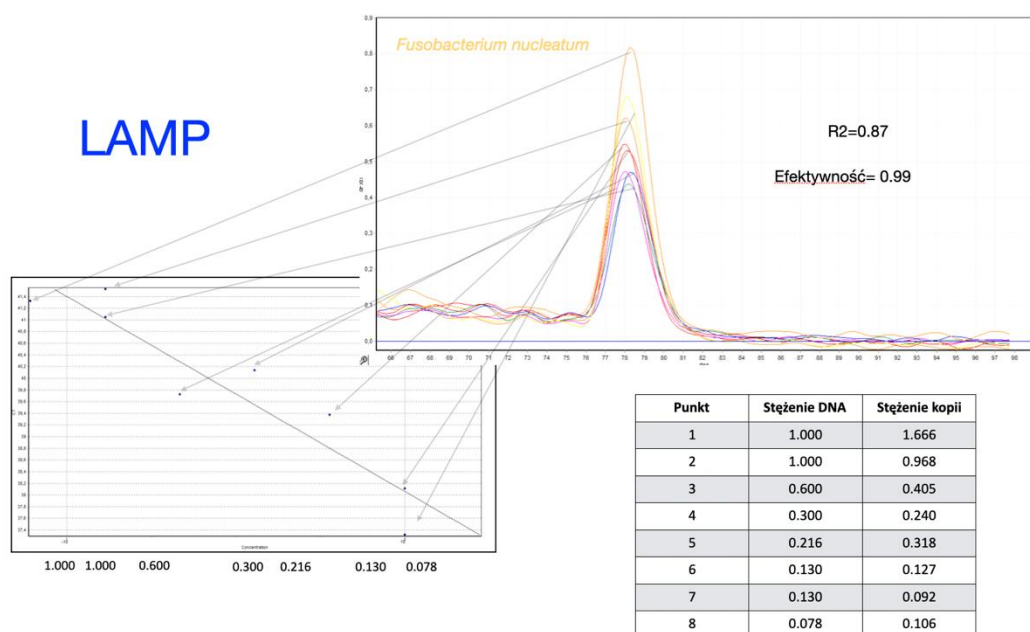
Rycina 36 - Krzywa wzorcowa wraz z wykresem temperatury topnienia uzyskana metodą LAMP dla *P.gingivalis*. Uzyskano Wartość R² = 0.89 oraz efektywności 1.01.

LAMP

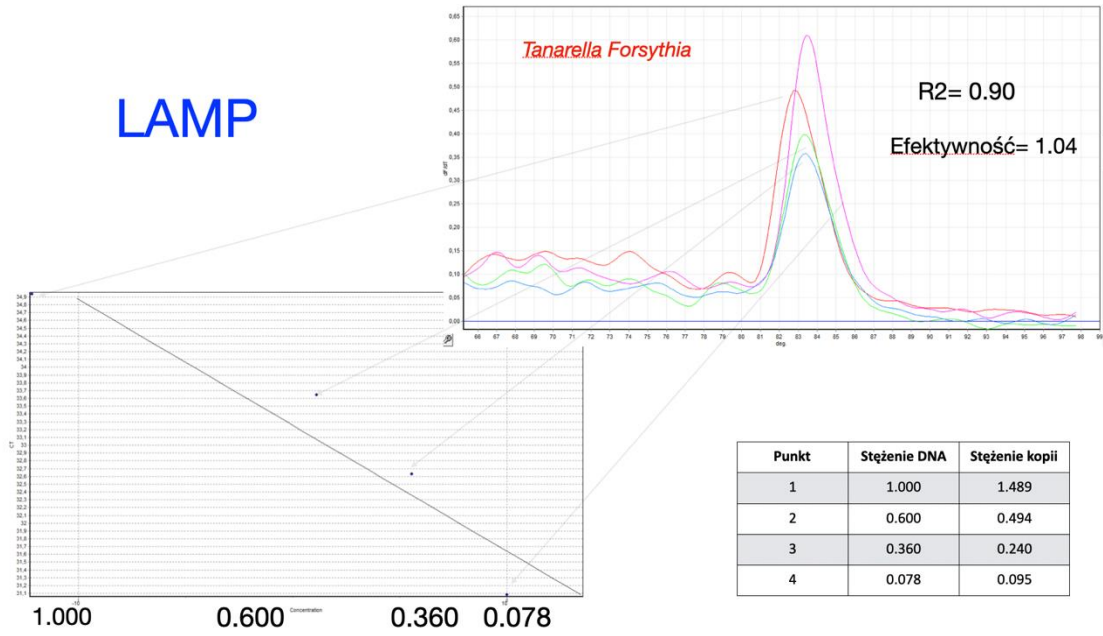


Rycina 37 - Krzywa wzorcowa wraz z wykresem temperatury topnienia uzyskana metodą LAMP dla *A.actinomycetemcomitans*. Uzyskano Wartość $R^2 = 0.89$ o wydajności 1.00.

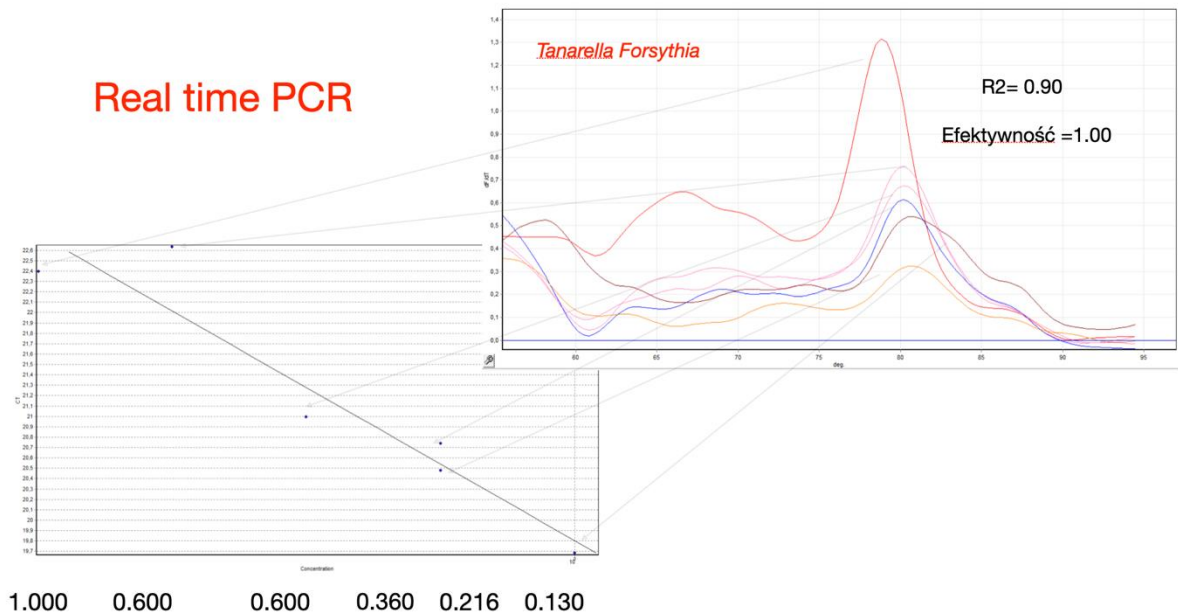
LAMP



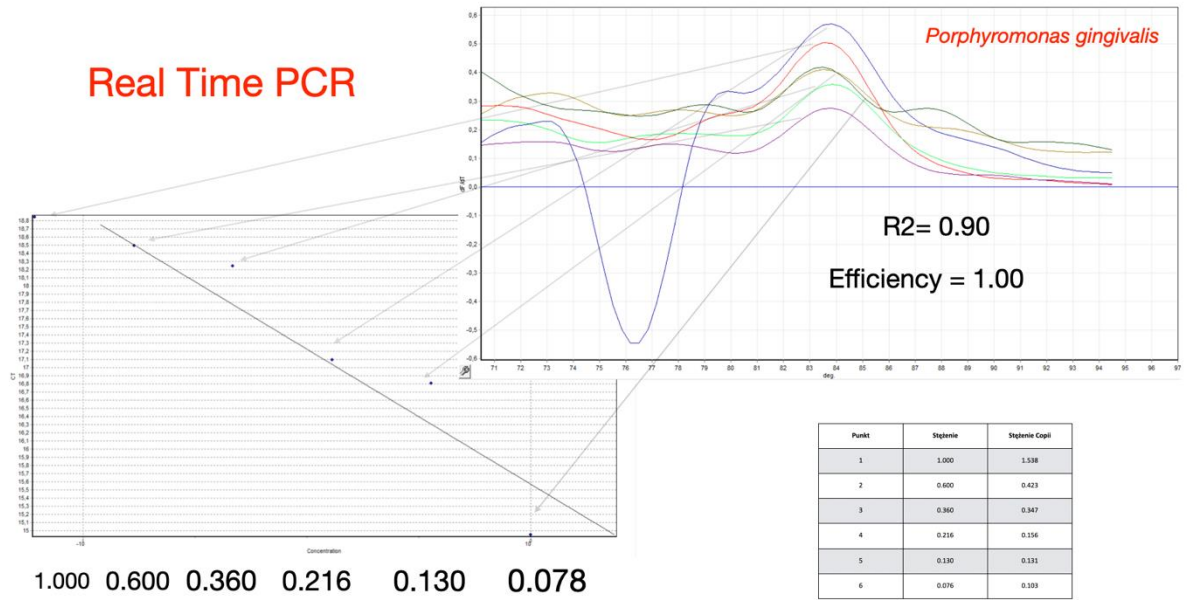
Rycina 38 - Krzywa wzorcowa wraz z wykresem temperatury topnienia uzyskana metodą LAMP dla *F.nucleatum*. Uzyskano Wartość $R^2 = 0.87$, o efektywności 0.99.



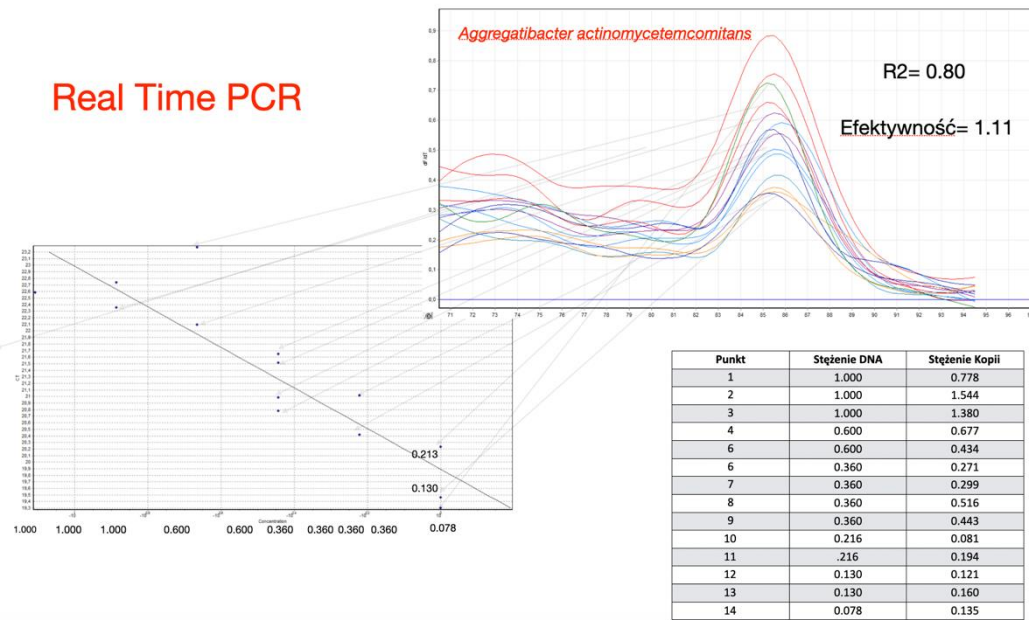
Rycina 39 - Krzywa wzorcowa wraz z wykresem temperatury topnienia uzyskana metodą LAMP dla T. forsythia. Uzyskano Wartość $R^2 = 0.87$, o efektywności 0.99.



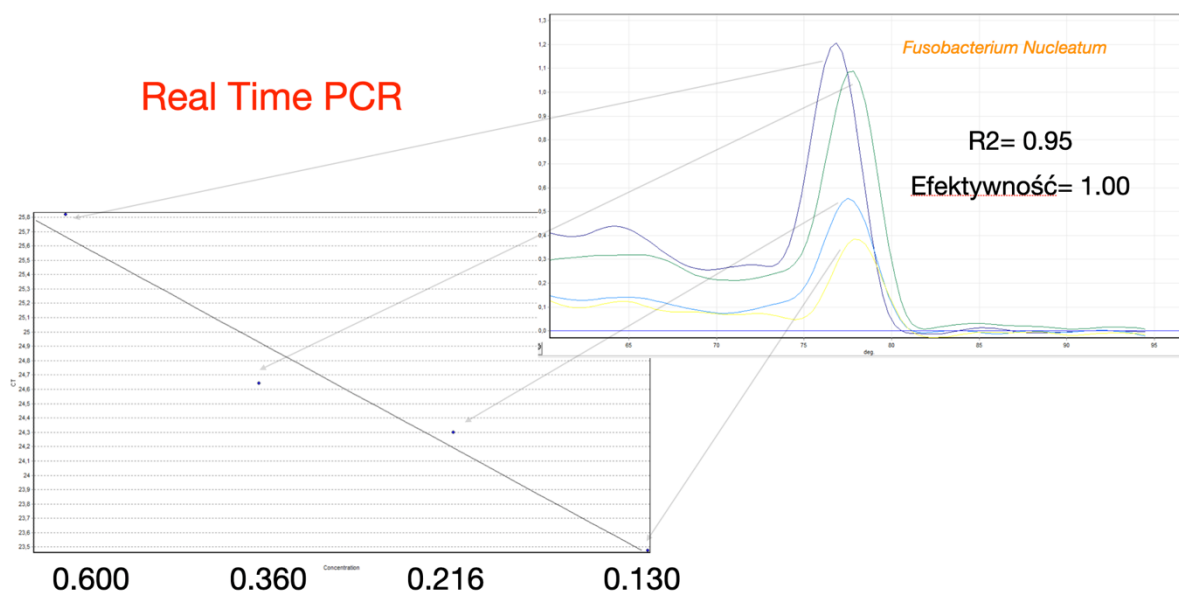
Rycina 40 - Krzywa wzorcowa wraz z wykresem temperatury topnienia uzyskana metodą Real-time PCR dla T.forsythia. Uzyskano wartość $R^2 = 0.90$, o efektywności 1.00.



Rycina 41 - Krzywa wzorcowa wraz z wykresem temperatury topnienia uzyskana metodą Real-time PCR dla *P.gingivalis*. Uzyskano wartość R2 = 0.90, o efektywności 1.00.



Rycina 42 - Krzywa wzorcowa wraz z wykresem temperatury topnienia uzyskana metodą Real-time PCR dla *A.actinomycetemcomitans*. Uzyskano wartość R2 = 0.80, o efektywności 1.11.



Rycina 43 - Krzywa wzorcowa wraz z wykresem temperatury topnienia uzyskana metodą LAMP dla *F.nucleatum*. Uzyskano Wartość $R^2 = 0.95$, o efektywności 1.00.

4.6. Liczba kopii bakteryjnego DNA

Na podstawie krzywych wzorcowych wygenerowanych z seryjnych rozcieńczeń, uzyskano liczbę kopii poszczególnych patogenów.

Tabela 26 - Liczba kopii poszczególnych szczepów bakterii uzyskanych za pomocą metody LAMP (bufor TE oraz „Difast”) w grupie badanej.

Liczba kopii grupa chorych / LAMP	n ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny	Górny
<i>P.gingivalis</i> (bufor TE)	22	122996,2±406667,1	0,14	0	1623444	0	18,18
<i>A.actinomycetemcomitans</i> (bufor TE)	14	812,6±2246,4	0,77	0	7995	0	5,9
<i>T.forsythia</i> (bufor TE)	14	0,9±3,5	0	0	13	0	0
<i>F.Nucleatum</i> (bufor TE)	20	21,0±70,9	0	0	308	0	1,2
<i>F.Nucleatum</i> (bufor Difast)	6	0,0±0,1	0	0	0	0	0,01

Tabela 27 - Liczba kopii poszczególnych szczepów bakterii uzyskanych za pomocą metody Real-time PCR (bufor TE oraz „Difast”) w grupie badanej.

Liczba kopii grupa chorych / Real time PCR	n ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny	Górny
<i>A.actinomycetemcomitans</i> (bufor TE)	20	0,3±0,6	0,08	0,01	3	0,01	0,23
<i>A.actinomycetemcomitans</i> (bufor Difast)	8	0,1±0,1	0	0	0	0	0,05
<i>T.forsythia</i> (bufor TE)	23	0,0±0,1	0	0	0	0	0,02
<i>T.forsythia</i> (bufor Difast)	10	0,0±0,0	0	0	0	0	0

Tabela 28 - Liczba kopii poszczególnych szczepów bakterii uzyskanych za pomocą metody LAMP (bufor TE oraz „Difast”) dla grupy badanej i kontrolnej.

Liczba kopii cała grupa (chorych + kontrola) (LAMP)	n ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny	Gómy
<i>P. gingivalis</i> (bufor TE)	22	122996,2±406667,1	0,13	0	1623444	0	18,18
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (bufor TE)	17	669,2±2049,9	0,2	0	7995	0	3,99
<i>T. forsythia</i> (bufor TE)	14	0,9±3,5	0	0	13	0	0
<i>F. nucleatum</i> (bufor TE)	26	16,4±62,4	0	0	308	0	1,44
<i>F. nucleatum</i> (bufor Difast)	6	0,0±0,1	0	0	0	0	0,01

Tabela 29. Liczba kopii poszczególnych szczepów bakterii uzyskanych za pomocą metody Real-time PCR (bufor TE oraz „Difast”) dla grupy badanej i kontrolnej.

Liczba kopii cała grupa (chorych + kontrola) (Real time PCR)	n ważnych	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Dolny	Gómy
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (bufor TE)	27	0,3±0,5	0,13	0	3	0,01	0,32
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (bufor Difast)	8	0,1±0,1	0,01	0	0	0,01	0,05
<i>T. forsythia</i> (bufor TE)	23	0,0±0,1	0	0	0	0	0,02
<i>T. forsythia</i> (bufor Difast)	10	0,0±0,0	0	0	0	0	0

Tabela 30. Liczba kopii poszczególnych szczepów bakterii (test LAMP) w zależności od płci i statusu palenia.

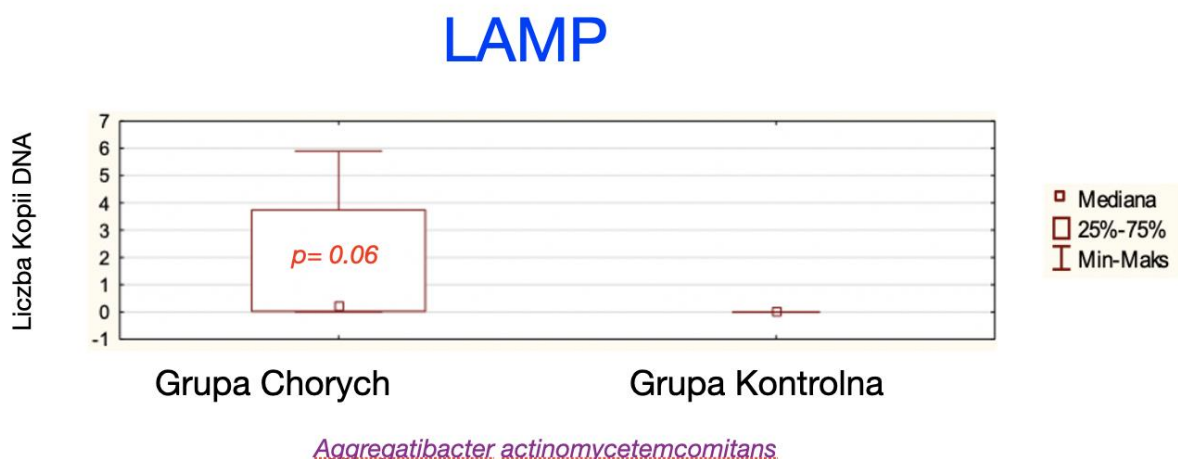
Liczba kopii / LAMP	P – wartość dla płci	p-wartość dla statusu palenia
<i>P. gingivalis</i> (bufor TE)	0,57	0,4
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (bufor TE)	0,16	0,87
<i>T. forsythia</i> (bufor TE)	0,89	0,52
<i>F. Nucleatum</i> (bufor TE)	0,83	0,52
<i>F. Nucleatum</i> (bufor Difast)	0,66	1

Tabela 31. Liczba kopii badanych szczepów bakterii (test Real-Time PCR) w zależności od płci oraz statusu palenia.

Liczba kopii / Real time PCR	P – wartość dla płci	p-wartość dla statusu palenia
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (bufor TE)	0,81	0,42
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (bufor Difast)	1	0,24
<i>T. forsythia</i> (TE)	0,16	0,44
<i>T. forsythia</i> (bufor Difast)	0,33	0,83

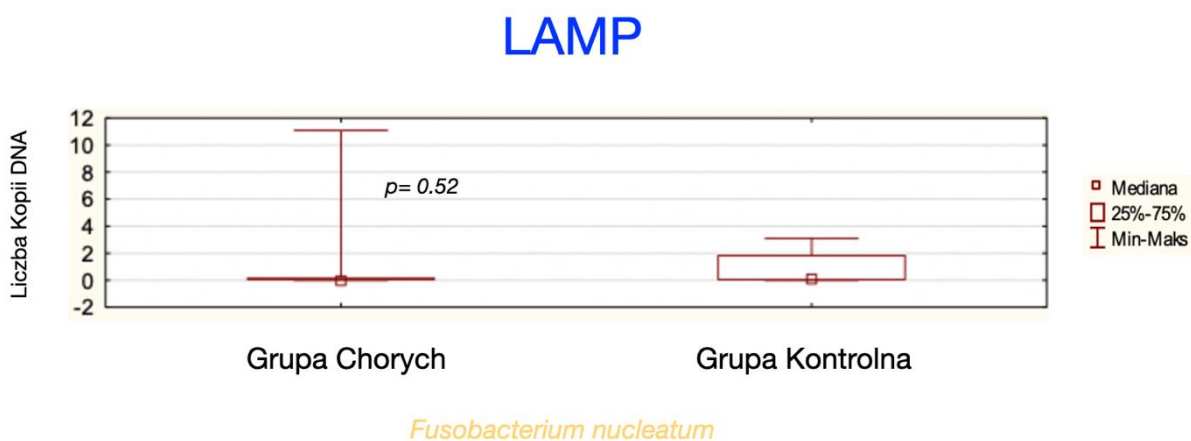
Za pomocą testu U Manna-Whitneya (ocena liczby kopii względem płci oraz statusem palenia) nie wykazano statystycznie istotnych różnic w zależności od płci.

Test ANOVA Friedmana z uwzględnieniem współczynnika zgodności Kendalla, pozwolił odpowiedzieć na pytanie czy istnieją statystycznie istotne różnice pomiędzy liczbą kopii dla poszczególnych periodontopatogenów. Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w liczbie kopii bakteryjnego DNA, *A.actinomycetemcomitans* identyfikowanych za pomocą metody LAMP oraz Real-Time PCR z wykorzystaniem buforu TE oraz *F.nucleatum* za pomocą metody LAMP z wykorzystaniem Buforu TE. Z powodu niewystarczającej ilości danych, test ANOVA uniemożliwił wykonanie analiz dla pozostałych szczepów bakteryjnych.



Rycina 44 - Porównanie liczby kopii dla bakterii *A.actinomycetemcomitans* (metoda LAMP (Bufor TE) w grupie badanej i kontrolnej.

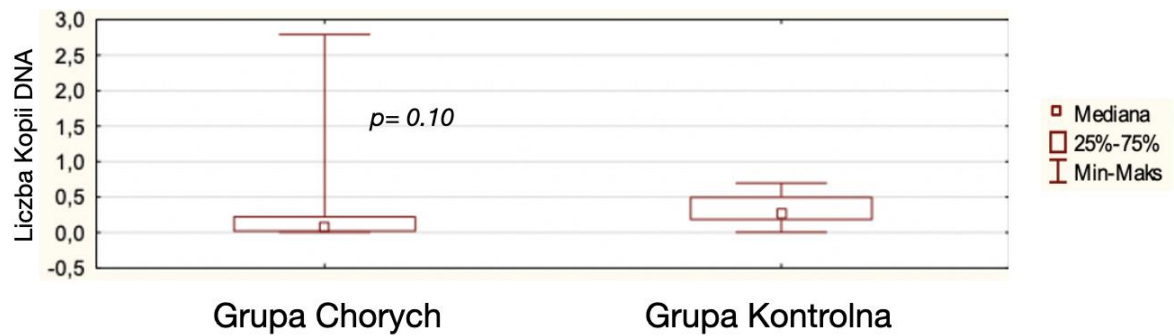
Stwierdzono (test U Manna Whitneya $p=0.06$) brak istotnej różnicy w liczbie numerów kopii *A.actinomycetemcomitans*, jednakże liczba badanych przypadków mogła mieć wpływ na uzyskana wartość.



Rycina 45. Porównanie liczby kopii dla bakterii *F.nucleatum* (metody LAMP, bufor TE) w grupie badanej i kontrolnej.

Nie wykazano istotnej różnicy (test U Manna-Whitneya $p=0,52$) w liczbie numerów kopii *F.nucleatum*.

Real time PCR



Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Rycina 46. Porównanie liczby kopii dla bakterii *A.actinomycetemcomitans* za pomocą metody Real-Time PCR (Bufor TE) w grupie badanej i kontrolnej numeru.

Nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy (test U Manna-Whitneya $p=0,10$) w liczbie numerów kopii *A.actinomycetemcomitans*.

DYSKUSJA

Zapalenie przyzębia jest chorobą szeroko rozpowszechnioną wśród populacji ludzkiej, będącą wynikiem oddziaływania wielu czynników na tkanki przyzębia. Najważniejszym, jednakże czynnikiem etiologicznym są bakterie [132], a postęp i nasilenie choroby, są ściśle uwarunkowane reakcją immunologiczną organizmu na związane z nimi antygeny. Zróżnicowana odpowiedź gospodarza na patogeny odpowiedzialna za przebieg choroby, zależna jest od uwarunkowań genetycznych i środowiskowych [106]. Konsekwencją uogólnionego stanu zapalnego przyzębia może być utrata znacznej części uzębienia, a także wzmożone ryzyko rozwoju m.in. chorób układu sercowo-naczyniowego [105]. Liczne badania wskazują, że kilkaset znanych gatunków mikroorganizmów zasiedla jamę ustną, jednakże tylko nieliczne szczepy mają zdolność wpływu na wzmożoną utratę przyczepu łącznotkankowego [106]. Na podstawie trzech badań transkryptomicznych Nikhil i wsp. stwierdzili, że drobnoustroje wcześniej nie uznawane za chorobotwórcze mogą przyczyniać się do rozwoju i nasilenia choroby przyzębia [106].

W codziennej praktyce stomatologicznej, lekarze dentyści borykają się i walczą z następstwami związanymi z zapaleniem przyzębia. Często stosowana jest niecelowana terapia antybiotykowa powodująca wiele niepożądanych skutków ubocznych. W celu ograniczenia potencjalnego zagrożenia wynikającego z nadużywania antybiotyków, poszukuje się coraz doskonalszych technik diagnostycznych, które ułatwią detekcję periodontopatogenów w warunkach ambulatoryjnych. W przeprowadzonych badaniach opisanych w niniejszej pracy wykorzystano izotermiczną amplifikację kwasów nukleinowych LAMP, wskazując ją jako technikę umożliwiającą szybką, czułą i wiarygodną detekcję głównych patogenów odpowiedzialnych za ostre i przewlekłe stany zapalne przyzębia. W celu weryfikacji przydatności techniki LAMP w badaniach przyzębia, wykorzystano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) oraz łańcuchową reakcję polimerazy z analizą produktu w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR), która stanowi obecnie tzw. „złoty standard” diagnostyczny w badaniach periodontopatogenów. W ostatnim czasie metody izotermiczne, takie jak LAMP, zyskują stale rosnącą popularność. LAMP, podobnie jak Real-Time PCR, cechuje wysoka czułość i specyficzność, jednak wyróżnia się znacznie skróconym czasem wykonania oraz prostotą

aparatury niezbędnej do przeprowadzenia reakcji, a co za tym idzie – istotną oszczędnością środków finansowych [108].

Oba typy łańcuchowej reakcji polimerazy, PCR i Real-Time PCR, od wielu lat są głównym narzędziem diagnostycznym. Reakcja PCR jest testem czułym, aczkolwiek podatnym na pojawienie się błędów, które głównie wynikają z obecności w środowisku reakcji czynników hamujących przebieg procesu i wpływających na skuteczność reakcji. Ponadto, konieczność posiadania wysoce specjalistycznej aparatury, termocyklera, często wyklucza jej wykorzystanie w warunkach ambulatoryjnych [61]. Reakcja Real-Time PCR, uznawana jest obecnie za podstawową technikę laboratoryjną umożliwiającą w relatywnie krótkim czasie oszacowanie oraz pełne monitorowanie reakcji poprzez ilościową analizę produktów amplifikacji. Ze względu na różnorodność wariantów reakcji Real-time PCR, technika ta może charakteryzować się różnymi cechami. Zastosowanie sond nukleotydowych istotnie zwiększa czułość reakcji, natomiast użycie interkalujących niespecyficznych barwników fluorescencyjnych znacznie przyspiesza prowadzony proces. Wariant reakcji Real-Time PCR wykorzystujący barwnik fluorescencyjny SYBR obarczony jest możliwością pojawienia się, w większym stopniu, niespecyficznych produktów będących wynikiem dimeryzacji starterów, tzw. primer-dimer, co potencjalnie może obniżać wiarygodność testu [62]. Istotne ograniczenia metod PCR oraz Real-Time PCR skłaniają liczne grupy badawcze do poszukiwania alternatywnych metod.

Nadrzędnym celem prezentowanej pracy było wykazanie użyteczności metody LAMP w celu detekcji peridontopatogenów odpowiedzialnych za ostre i przewlekłe zapalenie przyzębia oraz potencjalną możliwość wykorzystania tej techniki do szybkiej diagnostyki w warunkach gabinetu stomatologicznego. Szczególnie istotne dla podjęcia badań były informacje pochodzące z dostępnych danych literaturowych, w których stwierdzono, że metoda LAMP jest metodą porównywalną do Real-Time PCR, a niektóre jej warianty wyróżniają się znacznie szybszym procesem analitycznym [83-88]. W trakcie przeprowadzonych analiz molekularnych określono obecność DNA czterech patogenów: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* oraz *Tannerella forsythia*, w próbkach płynu dziąsłowego pozyskanych od chorych z zapaleniem przyzębia i od uczestników, u których nie stwierdzono wykładników patologicznych w obrębie tkanki przyzębia. Wyniki uzyskane metodą LAMP poddano weryfikacji technikami PCR i Real-Time PCR, które wykorzystano nie tylko w celu porównania skuteczności wykrywania patogenów, ale także czułości i

specyficzności. Zbadano również związek między parametrami klinicznymi, takimi jak GI, PD, CAL i SBI, zmierzonymi w grupie chorych i grupie kontrolnej, a danymi uzyskanymi w trakcie molekularnych analiz mikrobiologicznych. Sprawdzone, czy istnieją zależności między uzyskanymi wynikami badań, zarówno molekularnych, jak i klinicznych, a zmiennymi niezależnymi o charakterze socjo-demograficznym, takimi jak wiek, płeć oraz palenie papierosów.

Mając na uwadze potencjalną heterogeniczność genetyczną badanych patogenów oraz świadomość tego, że zastosowane do badań testy LAMP oraz Real-Time PCR wykorzystywały jako czynnik detekcyjny barwnik fluorescencyjny niespecyficznie interkalujący do produktów powstających w trakcie reakcji, a nie specyficzną sondę hydrolityczną hybrydującą ze specyficzną sekwencją docelową, konstrukcję starterów wykorzystanych w niniejszej pracy, oparto o wysoce konserwatywne sekwencje genów. Dodatkowo, selektywność zestawów starter/sonda stosowanych w reakcjach LAMP przetestowano *in silico*, przy użyciu odpowiednich narzędzi bioinformatycznych, m.in. programu BLAST, tak aby zminimalizować ryzyko wystąpienia reakcji krzyżowej blisko spokrewnionych szczepów bakteryjnych. Ponadto, w celu określenia diagnostycznej dokładności zastosowanych technik LAMP, PCR oraz Real-Time PCR, oceniono ich czułość i swoistość za pomocą analizy krzywej ROC (ROC; ang. Receiver Operating Characteristic). Miarą tego testu statystycznego jest obszar zawarty pod krzywą (AUC; ang. Area Under Curve). Im większy obszar pod krzywą ROC, tym prawdopodobieństwo, że zastosowana technika analityczna była lepsza, jest wyższe. Wartość AUC = 0,5 uznaje się za najniższą granicę dla istotnej statystycznie dyskryminacji między badanymi grupami. Im wartość AUC jest bardziej zbliżona do 1.0, tym ogólna dokładność techniki analitycznej poddanej analizie jest większa.

Meada i wsp. porównali metodę LAMP z Real-Time PCR. Autorzy zbadali obecność między innymi *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis* i *P.intermedia* w próbkach płytki nazębnej. Uzyskane przez nich wyniki wykazały wyższą lub porównywalną czułość LAMP w porównaniu z Real-Time PCR [87]. Porównanie czułości i swoistości zastosowanych technik analitycznych przeprowadzone na podstawie wyników uzyskanych w trakcie prezentowanych badań, wykazało brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy tymi metodami w odniesieniu do wszystkich ocenianych patogenów. Jednakże, w przypadku detekcji bakterii *P.gingivalis* test LAMP okazał się istotnie statystycznie lepszą metodą od klasycznego testu PCR oraz wyróżniał się znacznie skróconym czasem analizy. Lepsza wykrywalność patogenu przy użyciu LAMP, wynika

z zastosowania w tej metodzie bardziej złożonego układu starterów, które pozwalają uzyskać produkt reakcji nawet z bardzo małej ilości matrycy [130]. Porównanie parametrów specyficzności i swoistości metod LAMP oraz Real-Time PCR, wykorzystanych do oceny wszystkich czterech periodontopatogenów w grupie chorych, wykazało brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy uzyskanymi wynikami, niezależnie od buforu (TE czy „Difast”), w którym zabezpieczono materiał do analiz. Metoda LAMP okazała się istotnie statystycznie lepsza w celu wykrywania *F.nucleatum* oraz *T.Forsythia* z materiału zabezpieczonego do izolacji buforem TE. (Rycina 33, 34) W związku z powyższym, wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy potwierdzają znaczną użyteczność metody LAMP do łatwej i szybkiej diagnostyki mikrobiologicznej zapalenia przyzębia. Wysoka czułość i specyficzność metody izotermicznej w połączeniu z łatwością przygotowania próbki do analizy, dzięki wykorzystaniu buforu „Difast”, co umożliwia ominięcie konieczności ekstrakcji bakteryjnego DNA, powoduje, że w warunkach ambulatoryjnych technika LAMP może być poważną alternatywą dla reakcji Real-Time PCR.

Porównano również specyficzność i swoistość technik LAMP, PCR i Real-Time PCR przeprowadzanych z użyciem próbek pochodzących od chorych, z których izolowano DNA bakterii, zabezpieczonych buforem TE (bufor Tris 10 mM pH 8.0, 1 mM EDTA) lub buforem „Difast”. Bufor TE jest bardzo trwałym medium, zabezpieczającym bakteryjne DNA dzięki obecności EDTA, które chelatując jony dwuwartościowe inaktywuje nukleazy. Natomiast obecny w roztworze bufor Tris pozwala utrzymać DNA w formie stabilnej. Z kolei bufor „Difast” umożliwia usprawnienie procesu pozyskiwania DNA tak, aby detekcja odbywała się w jeszcze krótszym czasie. Bufor ten wykorzystano wcześniej, m.in. przez Pieczul i Wąsowską, w celu wyekstrahowania genomowego DNA grzyba *Zymoseptoria tritici* w 15-minutowej procedurze [127]. W porównaniu do metody opartej o wykorzystanie buforu „Difast”, standardowa procedura izolacji DNA trwa około 60-70 minut. Ze względu na obecność cząstek stałych, bufor „Difast” wymaga ciągłego mieszania podczas akwizycji materiału do badań. Nieprzestrzeganie odpowiedniej procedury może negatywnie wpłynąć na skuteczność procesu izolacji DNA. Porównanie technik LAMP, PCR i Real-Time PCR wykorzystanych w celu analizy próbek materiału badanego zabezpieczanych buforami TE lub „Difast”, wskazało istotną statystycznie różnicę w wykrywaniu *P.gingivalis* i *A.Actinmycetemcommitans* na korzyść buforu TE (Rycina 26). Jedynie w trakcie detekcji bakterii *F.Nucleatum* wykorzystanie buforu „Difast” wiązało się z lepszą wykrywalnością tego patogenu (Rycina 29).

Ponadto, nieprzestrzeganie rygorystycznych wymogów procedury użycia buforu „Difast”, może prowadzić do zaburzenia procesu izolacji bakteryjnego DNA, co wiąże się z uzyskaniem zbyt małej ilości bakteryjnego DNA, przez co wynik reakcji może być fałszywie ujemny.

Obok czynników środowiskowych, genetycznych i podatności organizmu gospodarza, główną przyczynę inicjacji i postępu zapalenia, stanowią drobnoustroje. Obecność periodonopatogenów w obrębie przyzębia może wywierać niekorzystny wpływ na przebieg oraz progresję choroby, co może manifestować się odchyleniem wartości parametrów klinicznych od odpowiadających im norm. Podstawowym mikrobiologicznym czynnikiem etiologicznym brzeźnego zapalenia przyzębia u ludzi jest *P.gingivalis* [27]. Ilościowa ocena *P.gingivalis* przy użyciu techniki LAMP przeprowadzonej w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem barwnika fluorescencyjnego SYBR Green I z liniowością w zakresie 10^2 - 10^6 komórek, została przeprowadzona przez grupę badawczą Meada. Wykorzystując tę technikę badacze uzyskali prawie identyczne wyniki, jak przy użyciu Real-Time PCR. Jednakże porównanie obu metod wykazało znaczą przewagę LAMP pod względem szybkości reakcji [86].

Jednym z parametrów klinicznych jest wskaźnik dziąsłowy (GI), umożliwiający określenie stanu brzegu dziąsłowego przy czterech powierzchniach zęba. Parametr ten uwzględnia obecność lub brak objawów zapalenia dziąseł, takich jak obrzęk, zmianę zabarwienia, krwawienie przy zgłębnikowaniu oraz samoistne krwawienie. Wraz z postępem czasu, proces zapalenia dziąseł ulega intensyfikacji i może przeistoczyć się w zapalenie przyzębia, któremu towarzyszy widoczna utrata przyczepu łącznotkankowego oraz proces pogłębiania się kieszonek przyzębnych. Pomimo faktu, iż nie wszystkie stany zapalne dziąseł prowadzą bezpośrednio do rozwoju zapalenia przyzębia, uważa się, że warunkiem zapalenia przyzębia jest poprzedzające je zapalenie dziąseł [111]. Według badań przeprowadzonych przez Schatzle i wsp. popartych 26 letnimi obserwacjami, średnia wartość skumulowanej utraty przyczepu klinicznego (CAL) w miejscach bez stanu zapalnego (GI – 0) u osób w wieku 60 lat wynosiła 1,94 mm. W miejscach, w których stwierdzono stan GI – 1, wykazano utratę przyczepu średnio na poziomie 2,42 mm, natomiast w GI – 2a - 3,31 mm. Badanie to wskazało również, że w miejscach, w których dochodziło do spontanicznego krwawienia podczas eksploracji sondą periodontologiczną, następowała z czasem utrata przyczepu na poziomie 70%. Interesujący jest fakt, iż miejsca określone jako GI – 0 także wykazywały tendencję do utraty przyczepu oraz tworzenia się kieszonek. Obserwowane zjawisko wiązało się

najprawdopodobniej z tym, że fluktuacji zmian stanu tkanek podczas długich okresów obserwacji towarzyszył stan zapalny na poziomie sub-klinicznym [112]. Wyniki zaprezentowane w niniejszej pracy również wskazują różnicę w wartościach parametru Gingival Index (GI), obserwowaną pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną, której istotność statystyczną potwierdził test U Manna-Whitneya ($p=0,00001$). Mediana wartości indeksu GI u chorych wynosiła 2,25, a w grupie kontrolnej 0,65. (Tabela 11,12) Innym ważnym parametrem umożliwiającym określenie stopnia zaawansowania choroby przyzębia jest wskaźnik krwawienia z kieszonki dziąsłowej (SBI; *ang* Sulcus Bleeding Index). Hafajee w swoich badaniach [113] wykazał pozytywną korelację pomiędzy obecnością bakterii *P.gingivalis*, a wartościami SBI. W świetle opublikowanych przez niego danych, obecność tego patogenu może wzmacniać stan zapalny przyzębia oraz powodować pojawienie się spontanicznego krwawienia dziąsła w trakcie sondowania, co może skutkować znaczną utratą przyczepu łącznotkankowego. Spostrzeżenia te korespondują z rezultatami badań uzyskanymi przez grupę Hucka i wsp., którzy sugerują, że *P.gingivalis*, który uznawany jest za najsilniejszy marker bakteryjny w przewlekłym zapaleniu przyzębia, jest mocno związany z utratą kości przyzębia [128]. Wyniki uzyskane w prezentowanych badaniach wskazują istotną statystycznie różnicę pomiędzy średnimi wartościami parametru SBI obserwowanymi w grupie chorych i w grupie kontrolnej. Dodatkowo analiza wyników uzyskanych za pomocą testu LAMP wskazała istotną statystycznie zależność pomiędzy obecnością *P.gingivalis*, a parametrami klinicznymi GI oraz SBI. (Rycina 12,13) (Tabela 13).

Mdał oraz wsp. wykazali, że nasilenie choroby mierzone liczbą miejsc przyzębia, w których na początku badania stwierdzono toczący się proces przewlekłego zapalenia ($CAL/PD > 4$ mm), wiązało się z szybką progresją zapalenia dziąseł. Wartość stosunku utraty klinicznego poziomu przyczepu łącznotkankowego do głębokości kieszonek przyzębnych (CAL/PD), może być wykorzystana jako wskaźnik prognostyczny umożliwiający ocenę ryzyka progresji choroby [110]. Średnie wartości parametru CAL, zaobserwowane w trakcie prezentowanych badań, zgodnie z testem U Manna-Whitneya różniły się na poziomie istotnym statystycznie między grupą chorych, a grupą kontrolną ($p < 0,01$). Mediana CAL w grupie uczestników wykazujących objawy stanu zapalnego przyzębia wynosiła 3,45, natomiast w grupie kontrolnej – 0,13. (Tabela 11,12) (Rycina 11)

W celu oceny stanu przyzębia zmierzono także głębokość kieszonek przyzębnych (PD). Wskaźnik ten obliczany jest na podstawie pomiaru odległości pomiędzy brzegiem

dziąsła, a dnem kieszonki dziąsłowej. Wyniki parametru PD przekraczające wartość 4 mm odzwierciedlają aktywny stan zapalny, który w konsekwencji może wpływać na utratę przyczepu łącznotkankowego, wywołując chorobę przyzębia oraz sprzyjając jej progresji. Zwykle jako miarę skumulowanego nasilenia choroby przyjmuje się liczbę miejsc z głębokością kieszonki przyzębnej $PD > 5$ mm oraz liczbę brakujących zębów [109]. W wyniku przeprowadzonych badań zaprezentowanych w niniejszej pracy zaobserwowano różnicę pomiędzy średnią wartością głębokości kieszonki dziąsłowej w grupie chorych oraz w grupie kontrolnej. Wartość mediany dla parametru PD wynosiła 4,55 mm w grupie chorych, natomiast w grupie kontrolnej 1,80 mm. Istotność statystyczną obserwowanej różnicy potwierdził test U Manna-Whitneya ($p < 0,01$). (Tabela 11,12) (Rycina 8)

Nie wykazano korelacji pomiędzy głębokością kieszonki dziąsłowej, a obecnością bakterii *P.gingivalis*. (Tabela 13). Obserwacja ta może wiązać się z faktem, iż niektóre szczepy *P.gingivalis* nie wykazują charakteru wzmożonej patogenności, oraz, że w stanach fizjologicznych i patologicznych mogą pojawiać się lokalnie w środowisku przyzębia różne szczepy tego patogenu. Ponadto, w prezentowanych badaniach u ponad 53% chorych z zapaleniem przyzębia nie wykryto obecności *P.gingivalis*. Brak potwierdzonej obecności tego patogenu może wskazywać na to, że u pacjentów, u których obserwowano objawy zapalenia przyzębia, bakterie były obecne na niewykrywalnym poziomie w trakcie badania.

Bakterie wchodzące w skład „czerwonego kompleksu”, takie jak *P.gingivalis*, dominują w kieszonce przyzębnej. Jednakże inny patogen, *A.actinomycetemcomitans*, również odgrywa znaczącą rolę w rozwoju choroby przyzębia. Podstawowym skutkiem patogenego oddziaływania tej bakterii jest interakcja jaka zachodzi pomiędzy jej czynnikami wirulencji a fibroblastami i komórkami nabłonkowymi gospodarza [40, 41]. Wśród 60 chorych, których zbadano testem LAMP, obecność bakterii *A.Actinmycetecommitans* wykryto w 7 próbach zabezpieczonych do izolacji DNA w soli fizjologicznej (11,67%). Obecność tego patogenu oceniono również przy użyciu klasycznego testu PCR. W wyniku tej analizy stwierdzono, że wśród 58 chorych bakterię *A.actinomycetemcommitans* wykryto w 8 próbach zabezpieczonych w buforze TE (13,79%) (Rycina 27). Natomiast detekcja tego samego patogenu przeprowadzona wśród 32 chorych za pomocą testu Real-Time PCR ujawniła obecność patogenu zaledwie w 2 próbach zabezpieczonych do izolacji buforem „Difast” (5,88%) (Rycina 30). Porównanie wyników uzyskanych technikami LAMP i PCR, wskazuje na brak istotnej statystycznie

różnicy w wykrywalności *A.Actinomyetemcomitans*. Natomiast analiza wykonana za pomocą metody Real-Time PCR w materiale zabezpieczonym buforem „Difast”, wskazuje na znacznie niższy poziom wykrywalności tego patogenu w porównaniu do metod LAMP oraz klasycznej reakcji PCR. Według Fine i wsp. obecność *A.actinomyetemcomitans* w kompleksie biofilmu wpływa na progresję oraz zaostrenie się stanu zapalnego, w związku z pogłębieniem się kieszeni dziąsłowej, prowadząc do utraty przyczepu łącznotkankowego [123]. Badania przeprowadzone przez Ardila i wsp. wskazały, że pacjenci, u których wykryto *A.actinomyetemcomitans* wykazywali istotnie różne stany kliniczne, co oceniono na podstawie parametrów klinicznych ($p < 0,001$). Analiza parametru PD wskazała, iż głębokość sondowania była istotnie wyższa u pacjentów ze wzmożoną obecnością *A.actinomyetemcomitans*. Zbliżone wyniki uzyskano po analizie parametru klinicznego CAL oraz SBI. Poziom tych parametrów był znamienne wyższy u pacjentów, u których wykryto *A.actinomyetemcomitans* i pałeczki jelitowe Gram-ujemne, w porównaniu z pacjentami bez tych bakterii. [124]

Zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy chorymi, u których wykazano obecność bakterii *A.actinomyetemcomitans*, a grupą kontrolną w zakresie wartości parametru SBI, stopniem zaawansowania stanu zapalnego przyzębia oraz głębokością kieszonek dziąsłowych (PD). (Tabela 16,17) (Rycina 17, 21). W tych przypadkach obecność *A.actinomyetemcomitans* może być spowodowana nadmierną kumulacją lokalnie produkowanych cytokin prozapalnych, których najwyższe stężenie jest osiągnięte w przyczepie łącznotkankowym, bezpośrednio po kolonizacji bakteryjnej wcześniej powstałych defektów periodontalnych [122].

Kolejnym patogenem, którego obecność ma istotny wpływ na proces destrukcji przyzębia jest *T.forsythia*. Bakteria ta jest wykrywana w próbkach biofilmu występującego w miejscach, gdzie postępuje zapalenie przyzębia [33]. Wykazano, że ma ona zdolność do współistnienia w komensalnej harmonii z gospodarzem, aczkolwiek jej potencjał zakaźny może prowadzić do zachwiania lokalnej homeostazy i przyczynia się do rozwoju choroby. Związek zwiększonego ryzyka występowania i progresji chorób przyzębia z obecnością *T.forsythia* był już wcześniej analizowany przez Hamleta i wsp. [125]. Badania wykonane przez Yost oraz wsp., potwierdziły, że *T. forsythia* przyczynia się do progresji zapalenia przyzębia, uruchamiając przy tym wiele mechanizmów, między innymi proces degradacji żelatyny oraz kolagenu typu I i III poprzez aktywność proteazy serynowej [125]. W pracy Mineoka i wsp. stwierdzono, że koagregacji bakterii, takich jak *P.gingivalis*, *T.denticola* i *T.forsythia* w płycie poddziąsłowej w kieszonkach o

głębokości PD >4 towarzyszył objaw kliniczny jakim jest krwawienie. Symbiotyczna kooperacja wyżej wymienionych patogenów świadczy o ich współistnieniu w biofilmach podziąsłowych prowadząc do rozwoju miejscowego stanu zapalnego przyzębia [126].

W zaprezentowanych w niniejszej pracy badaniach, również zaobserwowano zależność pomiędzy obecnością bakterii *T.forsythia* a wskaźnikiem CAL ($p=0,04$) w grupie badanej analizowaną poprzez PCR w buforze „Difast”, czym potwierdzono tezę, iż patogen ten wpływa na utratę przyczepu łączno-tkankowego w trakcie progresji choroby przyzębia (Rycina 25). Zależność ta może być spowodowana czynnikami wirulencji patogenu, takimi jak proteaza cysteinowa (PtrH) o aktywności hemolitycznej. Kolejnym czynnikiem, którego aktywność wskazuje na udział *T.forsythia* w degradacji tkanek przyzębia, jest aminopeptydaza dipeptydylowa IV, umożliwiająca degradację kolagenu typu I, kombinację kolagenu typu I oraz typu III [125]. W zaprezentowanych w niniejszej pracy badaniach przeprowadzonych w grupie 58 chorych, u których wykonano test PCR na matrycy DNA izolowanego z materiału zabezpieczonego buforem TE, bakterię *T.forsythia* wykryto w 48 próbkach (82,75%) (Rycina 28). Ponadto, zaobserwowano istotną statystycznie zależność pomiędzy występowaniem tego patogenu, a stopniem zaawansowania choroby ($p=0,04$), przy czym stopień zaawansowania wykazywał tendencję wzrostową podczas progresji choroby (Rycina 24).

W procesie destrukcji przyzębia i progresji choroby uczestniczą również gram-ujemne bakterie z rodzaju *Fusobacterium*. Patogeny te rozwinęły zdolność do agregacji z wczesnymi i późnymi kolonizatorami, takimi jak *P.gingivalis*. W zaprezentowanych badaniach przeprowadzonych w grupie 35 chorych, testowanych przy użyciu techniki LAMP, którą wykonano wobec DNA izolowanego z materiału zabezpieczonego przy użyciu buforu „Difast”, obecność bakterii *F.Nucleatum* stwierdzono w 5 próbkach (14,29%) (Rycina 29). Dodatkowym interesującym aspektem przeprowadzonych badań jest fakt, iż wszyscy pacjenci - 5 osób (100,00%) było aktywnymi palaczami (Rycina 23). Istnieje wiele kontrowersji dotyczących różnic w występowaniu bakterii oraz ich poziomu u osób palących. Obserwacje pochodzące z hodowli *in vitro* oraz badań wykonanych za pomocą metod molekularnych, wykazały znaczne zmiany w mikroflorze podziąsłowej palaczy, niezależnie od ich stanu przyzębia. Dostępna literatura wskazuje, że palenie ułatwia wczesną kolonizację patogenów w tkankach przyzębia, co prowadzi do powstania zorganizowanego biofilmu. W oparciu o możliwe różnice w statusie immunologicznym oraz klinicznym występujące u palaczy i osób niepalących wydaje się, iż biośrodko w okolicy podziąsłowej u osób palących, winno być inne niż u

niepalących. Jednakże dostępne dane dotyczące wpływu palenia na mikroflorę poddziąsłową nie są spójne. W badaniach Jianga i wsp. nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w mikroflorze poddziąsłowej u osób palących i niepalących, u których zdiagnozowano chorobę przyzębia. Autorzy tej publikacji zasugerowali, iż palenie miało nieznaczny wpływ na mikroflorę poddziąsłową [133]. Jakkolwiek, mikroflora w okolicy poddziąsłowej palaczy charakteryzuje się bardzo zróżnicowanym składem, w którym dominują patogenne, beztlenowe szczepy bakterii, a bakterie komensalne są reprezentowane w mniejszej ilości. Ponadto zaobserwowano, że zdrowi periodontologicznie palacze wykazują bardzo zróżnicowaną i względnie niestabilną początkową kolonizację biofilmów poddziąsłowych oraz wczesną kolonizację patogenami przyzębia należącymi do rodzajów *Fusobacterium*, *Cardiobacterium*, *Synergistes* i *Selenomonas* [134]. *Fusobacterium*, a zwłaszcza *F.nucleatum*, odgrywa kluczową rolę w bezpośrednich interakcjach pomiędzy Gram pozytywnymi oraz Gram ujemnymi gatunkami mikrobiomu. Bakteria ta uważana jest za kolonizatora pośredniego, wpływającego na adhezję bakterii komensalnych zasiedlających zewnętrzną strukturę zęba i nabłonka, jak również przez patogenne szczepy bakterii [135]. Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej pracy, są zgodne ze wcześniejszymi obserwacjami Kumara i wsp., którzy wykorzystali sekwencję genu 16S rRNA, do ilościowego określenia poziomów 27 mediatorów immunologicznych, potencjalnie wywierających wpływ na kompozycję poddziąsłowej mikrobioty. Osoby palące charakteryzowały się bardzo zróżnicowaną, niestabilną, początkową kolonizacją biofilmów brzeżnych i poddziąsłowych, z mniejszym nasyceniem niszy bakteryjnej niż osoby niepalące. Bakterie *Fusobacterium* kolonizowały wczesne biofilmy palaczy i były obecne przez cały okres obserwacji. Dane te sugerują, że biofilmach jamy ustnej u osób palących ma miejsce wczesne nabycie i kolonizacja tego patogenu [134].

Podobne wyniki badań przedstawiono w pracy opublikowanej przez Shchipkova i wsp., którzy korzystając z materiału klinicznego pobranego od osób palących z umiarkowanym oraz ciężkim przewlekłym zapaleniem przyzębia przeprowadzili analizę sekwencyjną genu kodującego podjednostkę 16S RNA. Na podstawie analizy sekwencji obejmujących miejsca stałe i zmienne w obrębie badanego genu, Autorzy stwierdzili częstsze występowanie bakterii typu *Parvimonas*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Bacteroides* i *Treponema* oraz mniej częste *Veillonella*, *Neisseria* i *Streptococcus* [135]. Natomiast badania przeprowadzone przez Yu i wsp., którzy także wykonali sekwencjonowanie genu kodującego podjednostkę 16S, w grupie palących uczestników bez objawów zapalenia w

przyzębiu, wykazały, iż palenie papierosów nie miało wpływu na skład drobnoustrojów [136]. W 2008 roku Cogo i wsp. przeprowadzili badania w celu uzyskania odpowiedzi na pytanie czy nikotyna i kotynina wykazują znaczący wpływ na wzrost siedmiu wybranych gatunków bakterii jamy ustnej, w tym *P.gingivalis*. Na podstawie uzyskanych wyników, badacze nie stwierdzili wpływu tych związków na wzrost żadnego z badanych patogenów [137]. Jak dotąd nie zaobserwowano bezpośredniego wpływu palenia papierosów na wzrost patogenów przyzębia, jednakże wykazano, że może mieć ono wpływ na wystąpienie aberracji czynników wirulencji bakterii. Potwierdzeniem tej tezy może być wynik doświadczenia, w którym stwierdzono, że wyciąg z dymu papierosowego spowodował zmianę fenotypu *P.gingivalis*, polegającą na zwiększeniu ekspresji genów głównego antygeny fimbrialnego (FimA), indukcji ekspresji białek błony zewnętrznej RagA i RagB, hamowaniu wytwarzania polisacharydów otoczkowych i neutralizacji odpowiedzi prozapalnej. Efekt ten ulegał odwróceniu, gdy bakterie eksponowane na wyciąg z dymu papierosowego umieszczono w świeżym medium bez dodatku ekstraktu nikotynowego [138]. W podsumowaniu, autorzy stwierdzili, że patogeny powodujące zapalenie przyzębia wytwarzają wysoce wyspecjalizowane adaptacyjne mechanizmy obronne, obejmujące m.in. zmienność czynników zjadliwości, które przyczyniają się do ich ochrony przed wpływem złożonej mieszaniny toksyn wydzielanych w procesie palenia. W badaniach zaprezentowanych w niniejszej pracy również nie wykazano bezpośredniej korelacji pomiędzy paleniem papierosów a obecnością bakterii *P.gingivalis*, *T.forsythia* oraz *A.acintomycescomitans*, z wyjątkiem *F.Nucleatum*, gdzie związek był istotny statystycznie (Tabela 19).

Zgodnie z danymi literaturowymi, utrata przyczepu klinicznego jest bardzo często obserwowanym zjawiskiem związanym z wiekiem [142,143]. W celu wyjaśnienia tego fenomenu przedstawiono trzy hipotezy. Pierwsza - hipoteza „kumulacji” przewlekłych zmian zapalnych w przyzębiu spowodowanych gromadzeniem się czynników prozapalnych, druga - hipoteza podatności wskazująca wiek jako czynnik zwiększający ryzyko zapalenia przyzębia poprzez rozregulowanie układu odpornościowego [144] oraz trzecia - hipoteza zatrzymania się proliferacji komórek [145] poprzez czynniki uszkodzające DNA, takie jak reaktywne formy tlenu, promienie rentgenowskie lub starzenie komórek zależne od długości telomerów [146]. Wraz z wiekiem postępujące pogarszanie się stanu tkanek przyzębia, może być również spowodowane zmniejszeniem wytwarzania kolagenu typu I oraz istotnym brakiem odpowiedzi gospodarza na ciągłą ekspozycję na uraz zapalny, podobnie jak ma to miejsce podczas infekcji bakteryjnej

[147,148]. Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza statystyczna dla większości periodontopatogenów nie wykazała istotnego związku z wiekiem pacjentów, z wyjątkiem *A.actinomycetemcomitans* (Rycina 18,19).

Czynniki takie jak pochodzenie genetyczne, dieta, status społeczno-ekonomiczny, mogą również wywierać wpływ na nadmierne namnażanie się *A.actinomycetemcomitans* w kieszonkach przyzębnych młodszej grupy badanej [121]. Natomiast obecność głębokich kieszeni przyzębnych (PD >5) charakterystycznych dla zapalenia przyzębia w populacji starszej, *A.actinomycetemcomitans*, może zostać wyparty przez bakterie ściśle beztlenowe, takie jak *F.nucleatum*, *P.intermedia*, *T.denticola*, *P.gingivalis* [119,120,121]. Pomimo, iż *A.actinomycetemcomitans* jest najczęściej wykrywanym drobnoustrojem w przyzębiu osób do 35 roku życia, zaawansowanie zapalenia przyzębia oraz obecność tego patogenu może być spowodowana nadmierną kumulacją lokalnie produkowanych cytokin prozapalnych bezpośrednio w przyczepie łącznotkankowym po zasiedleniu bakterii we wcześniej powstałych uszkodzeniach tkanek periodontium [122]. Wyniki badań pozwalają przypuszczać, że degradacja tkanek oraz utrata przyczepu łącznotkankowego u osób w podeszłym wieku może być spowodowana wieloma bodźcami wpływającymi na progresję zapalenia przyzębia prowadząc do nieodwracalnej utraty tkanek przyzębia.

Kolejnym bardzo ważnym czynnikiem wpływającym na przebieg oraz progresję choroby przyzębia jest płeć. W badaniu przeprowadzonym przez grupę badawczą Choi i wsp., która oceniała obecność 9 periopatogenów za pomocą testu Real-Time PCR, między innymi *P.gingivalis*, nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie w częstości występowania tej bakterii u kobiet i mężczyzn. Jednakże ilościowa ocena, w której porównano liczbę kopii DNA wszystkich bakterii, wykazała znacznie wyższą ilość badanych patogenów u mężczyzn niż u kobiet. Wyniki te były zbliżone do badań przeprowadzonych przez Lira-Junior i wsp., którzy również poddali ocenie wpływ płci na obecność bakterii powodujących zapalenie przyzębia [108,114]. W zaprezentowanych badaniach wykazano, że częstość występowania bakterii *P.gingivalis* w kieszonkach dziąsłowych różniła się w zależności od płci uczestników badania. Jednakże, w teście ilościowym nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w liczbie kopii DNA w materiale pobranym od kobiet i mężczyzn dla żadnego z 4 badanych periodontopatogenów. W teście Real-Time PCR przeprowadzonym wśród 52 chorych, w którym wykorzystano materiał do izolacji DNA zabezpieczony buforem TE, stwierdzono częstszą obecność tego patogenu u mężczyzn (13 próbek; 61,90%) niż u kobiet (8 próbek;

38.10%) ($p=0,006$) (Rycina 16). Wynik ten można uznać za znaczący, ponieważ ciężkie zapalenie przyzębia występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet. Zjawisko to można tłumaczyć obserwacją wyższych stężeń przeciwciał IgG przeciwko *Porphyromonas gingivalis* u kobiet w porównaniu z mężczyznami [115]. Ponadto, w wyniku badań przeprowadzonych przez Ghazeeri i wsp. stwierdzono, iż u kobiet wrodzona odpowiedź immunologiczna może być bardziej kontrolowana i bardziej intensywna niż u mężczyzn, oraz że działanie układu immunologicznego kobiet jest bardziej skuteczne w eliminacji patogenów w porównaniu z mężczyznami [116]. Taka różnica wiąże się z oddziaływaniem estrogenów, które wpływając na komórki (NK; ang Natural Killers) powodują wzrost wydzielania INF- γ , czynnika, który ma potencjał hamujący osteoklastogenezę [117]. Interesującym aspektem podkreślającym pozytywny wpływ płci kobiecej na skuteczniejszą eliminację zapalenia przyzębia jest endogenna ochrona śródbłonna, w szczególności poprzez silne właściwości przeciwzapalne rezolwin [155]. Natomiast, Shiau i wsp. sugerują, iż wyższe poziomy rezolwin, z powodu zwiększonej syntezy długołańcuchowych kwasów n-3 PUFA, potencjalnie prowadzą do skuteczniejszej eliminacji zapalenia przyzębia [118].

Progresja stanu zapalnego przyzębia spowodowana jest obecnością wielu szczepów bakteryjnych, a w szczególności patogenów czerwonego oraz pomarańczowego kompleksu Socrańskiego [113]. W prezentowanej pracy, w celu określenia ilości kopii DNA badanych patogenów zastosowano metodę LAMP oraz Real-Time PCR z wykorzystaniem nieinwazyjnej, powtarzalnej metody akwizycji płynu dziąsłowego. Liczbę kopii DNA u osób bez objawów zapalenia przyzębia (grupa kontrolna) oraz pacjentów z zapaleniem przyzębia (grupa chorych) określono w oparciu o wykreślenie krzywych wzorcowych dla wszystkich czterech periopatogenów (Ryciny 36-43). Ilości kopii badanych sekwencji bakteryjnych odczytano z krzywych wzorcowych, które wykreślono przy użyciu serii rozcieńczeń skoncentrowanej puli, składającej się ze zweryfikowanego poprzez sekwencjonowanie, bakteryjnego DNA, zawierającego znane stężenia wyjściowe powielanych sekwencji. Jest to tzw. metoda bezwzględna, która charakteryzuje się mniejszym odsetkiem dokładności. Alternatywnym podejściem jest metoda względna, która jest dokładniejsza, jednakże wymagająca znacznie większych nakładów finansowych. Metoda względna wyraża poziom badanych sekwencji w nieznanymi próbkach jako wielokrotność ich zawartości w próbce wzorcowej, zwanej także kalibratorem, tzw. *housekeeping gene*, pełniącym rolę punktu odniesienia dla prowadzonych badań [149].

W prezentowanych badaniach w większości przypadków nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy liczbami kopii DNA poszczególnych periopatogenów. Dla przykładu, liczba kopii DNA *A.actinomycetemcomitans* zabezpieczonego do izolacji buforem TE oznaczonych przy pomocy metody Real-Time PCR, wykazała brak istotnej różnicy w liczbie kopii DNA w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 46). Kim oraz wsp. wykorzystując technikę Real-Time PCR również nie wykazali istotności statystycznej różnicy pomiędzy liczbami kopii DNA *A.actinomycetemcomitans* obserwowanej u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia i w grupie kontrolnej [150].

W badaniach przeprowadzonych przy użyciu Real-Time PCR przez grupę badawczą Choi i wsp., stwierdzono obecność *A.actinomycetemcomitans* (1.16 kopii/ul) w najmniejszym odsetku z 9 badanych patogenów u osób zdrowych, pomimo wykrycia tego patogenu aż u 75,5% uczestników badania [108]. Różnice w częstości detekcji i ilości kopii bakterii obserwowane w prezentowanych badaniach oraz badaniach w/w autorów, można wyjaśnić różną wielkością badanych grup, jak również rozbieżnościami związanymi z rodzajem badanego materiału. Podobnie, zarówno zastosowanie metody LAMP, jak i Real-Time PCR nie pozwoliło stwierdzić różnic istotnych statystycznie w liczbie kopii bakterii w zależności od płci badanych osób (Tabele 31, 32). Choi oraz wsp. także nie wykazali różnicy istotnej statystycznie w występowaniu periodontopatogenów czerwonego oraz pomarańczowego kompleksu Socrańskiego u żadnej z płci, jednakże u mężczyzn wykazano większą liczbę kopii DNA badanych patogenów niż u kobiet [108]. Analogicznie, Lira Junior i wsp. również wykazali wyższe ilości patogenów w grupie mężczyzn [114]. Wyniki te można uznać za znaczące, ponieważ w większości przypadków ciężkie zapalenie przyzębia występuje częściej u mężczyzn niż u kobiet.

Jak wskazano powyżej, istnieje wiele kontrowersji odnośnie występowania periopatogenów oraz ich ilości u osób palących. Według analiz zaprezentowanych w niniejszej pracy, zaobserwowano brak statystycznie istotnej różnicy pomiędzy liczbą kopii bakteryjnego DNA w grupie palących i niepalących (Tabela 29,30). Natomiast badania przeprowadzone przez Lira Junior i wsp. wykazały, iż osoby niepalące o zbliżonych wartościach parametrów periodontologicznych (PD, GI, CAL) wykazywały zwiększoną liczbę gatunków periopatogenów. Ta obserwacja pozwoliła autorom wysunąć sugestię, że palenie ma wpływ na załamanie równowagi mikrobioty śliny [114]. Porównanie liczby kopii DNA metodą LAMP, w obu badanych grupach, pod względem płci oraz statusu palenia, nie wykazały statystycznej różnicy. Natomiast analiza liczby

kopii *A.actinomycetemcomitans*, przeprowadzona metodą LAMP z użyciem DNA zabezpieczonego do izolacji buforem TE, wykazała zależność na poziomie $p=0,06$. Zależność ta jest bardzo zbliżona do wartości istotnie statystycznie, czego przyczyną mogła być ograniczonej ilości osób w grupie badanej (62 osób) (Rycina 44).

W rzeczywistości w patogenezie zapalenia przyzębia najistotniejszym czynnikiem jest odpowiedź gospodarza na kompleksy bakteryjne obecne w środowisku poddziąsłowym. Objawy kliniczne choroby stają się ewidentne w sytuacji, kiedy podatność gospodarza, czynniki warunkujące kolonizację periopatogenów oraz zmiany mikrobiologiczne sprzyjają patogennym gatunkom bakterii prowadząc do progresji choroby przyzębia [151,152].

Pomimo tego, że nie wykazano znaczącej różnicy w liczbie kopii bakteryjnego DNA, uważa się, że najistotniejszym czynnikiem wpływającym na rozwój choroby przyzębia jest liczba bakterii w tkankach periodontium, a nie częstotliwość ich obecności w środowisku przyzębia [153]. Dlatego też, wykorzystanie metody molekularnej jaką jest LAMP, pozwala w warunkach gabinetu stomatologicznego na bardzo skrupulatne monitorowanie stanu przyzębia danego pacjenta w restrykcyjnie wyznaczonych przedziałach czasowych. Dzięki zastosowaniu tej techniki analitycznej możliwe jest efektywne zahamowanie rozwoju procesu zapalnego, nie tylko w obrębie jamy ustnej, ale również w środowisku ogólnoustrojowym [154].

WNIOSKI

1. Izotermalna amplifikacja kwasów nukleinowych (LAMP) jest techniką analityczną, która może być wykorzystywana do szybkiej oceny obecności periopatogenów prowadzonej w warunkach ambulatoryjnych.
2. Czulość metody LAMP w wykrywaniu periopatogenów jest porównywalna lub wyższa w niektórych przypadkach z metodami uznawanymi za złote standardy diagnostyczne: PCR i Real-Time PCR.
3. Metoda LAMP charakteryzowała się większą czulością i swoistością podczas detekcji *F.nucleatum* oraz *T.Forsythia* z materiału zabezpieczonego do izolacji buforem TE w porównaniu z uważaną za złoty standard metoda Real-Time PCR.
4. Szybka detekcja periopatogenów za pomocą techniki LAMP umożliwia celowane leczenie stanów zapalnych przyzębia w warunkach ambulatoryjnych.
5. Bufor „Difast” pozwala na usprawnienie i skrócenie procesu ekstrahowania bakteryjnego DNA z pozyskanego materiału biologicznego, aczkolwiek bufor TE charakteryzuje się większą powtarzalnością i czulością.
6. Badane grupy nie różniły się między sobą pod względem liczby kopii DNA badanych peridontopatogenów.
7. Nie stwierdzono zależności pomiędzy płcią i statusem palenia a liczbą kopii DNA badanych periopatogenów.

BIBLIOGRAFIA

1. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Dec;16(12):745–59.
2. Chapple ILC, Genco R. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol.* 2013 Apr;40 Suppl 14:S106-112.
3. Zhang Y, He J, He B, Huang R, Li M. Effect of tobacco on periodontal disease and oral cancer. *Tob Induc Dis [Internet].* 2019 May 9 [cited 2020 Dec 3];17(May). Available from: <http://www.journalssystem.com/tid/Effect-of-tobacco-on-periodontal-disease-and-oral-cancer,106187,0,2.html>
4. Van der Velden U, Kuzmanova D, Chapple ILC. Micronutritional approaches to periodontal therapy: Micronutrients and periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2011 Mar;38:142–58.
5. Mester A, Irimie A, Oprita L, Dima D, Petrushev B, Lucaciu O, et al. Oral manifestations in stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *Med Hypotheses.* 2018 Dec;121:191–4.
6. Al-Jasser RN. The effect of overbite and overjet on clinical parameters of periodontal disease: A case control study. *Saudi Dent J.* 2020 Feb;S1013905219312428.
7. Ortún-Terrazas J, Cegoñino J, Pérez del Palomar A. In silico study of cuspid' periodontal ligament damage under parafunctional and traumatic conditions of whole-mouth occlusions. A patient-specific evaluation. *Comput Methods Programs Biomed.* 2020 Feb;184:105107.
8. Tettamanti L. GENETIC SUSCEPTIBILITY AND PERIODONTAL DISEASE: A RETROSPECTIVE STUDY ON A LARGE ITALIAN SAMPLE. *Oral Implantol.* 2017;10(1):20.

9. Feng X, Liu J. Association between IL-1A (-889C/T) polymorphism and susceptibility of chronic periodontitis: A meta-analysis. *Gene*. 2020 Mar;729:144227.
10. Amirisetty R, Patel RP, Das S, Saraf J, Jyothy A, Munshi A. Interleukin 1 β (+3954, -511 and -31) polymorphism in chronic periodontitis patients from North India. *Acta Odontol Scand*. 2015 Jul 4;73(5):343–7.
11. Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Reynolds LM, Hsueh W-C, et al. Exploring the genetic basis of chronic periodontitis: a genome-wide association study. *Hum Mol Genet*. 2013 Jun 1;22(11):2312–24.
12. da Silva MK, de Carvalho ACG, Alves EHP, da Silva FRP, Pessoa L dos S, Vasconcelos DFP. Genetic Factors and the Risk of Periodontitis Development: Findings from a Systematic Review Composed of 13 Studies of Meta-Analysis with 71,531 Participants. *Int J Dent*. 2017;2017:1–9.
13. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci*. 2017 Jun;11(2):72–80.
14. Kornman KS, Papapanou PN. Clinical application of the new classification of periodontal diseases: Ground rules, clarifications and “gray zones.” *J Periodontol*. 2020 Mar;91(3):352–60.
15. Armitage GC. The complete periodontal examination. *Periodontol 2000*. 2004 Feb;34(1):22–33.
16. Preshaw PM. Detection and diagnosis of periodontal conditions amenable to prevention. *BMC Oral Health*. 2015 Dec;15(S1):S5.
17. Chen C, Hemme C, Beleno J, Shi ZJ, Ning D, Qin Y, et al. Oral microbiota of periodontal health and disease and their changes after nonsurgical periodontal therapy. *ISME J*. 2018 May;12(5):1210–24.

18. Valm AM. The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *J Mol Biol.* 2019 Jul;431(16):2957–69.
19. Arweiler NB, Marx VK, Laugisch O, Sculean A, Ausschill TM. Clinical evaluation of a newly developed chairside test to determine periodontal pathogens. *J Periodontol.* 2020 Mar;91(3):387–95.
20. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):134–44.
21. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000.* 2006 Oct;42(1):47–79.
22. Bourgeois D, Bravo M, Llodra J-C, Inquimbert C, Viennot S, Dussart C, et al. Calibrated interdental brushing for the prevention of periodontal pathogens infection in young adults - a randomized controlled clinical trial. *Sci Rep.* 2019 Dec;9(1):15127.
23. Muras A, Mayer C, Otero-Casal P, Exterkate RAM, Brandt BW, Crielaard W, et al. Short-Chain *N*-Acylhomoserine Lactone Quorum-Sensing Molecules Promote Periodontal Pathogens in *In Vitro* Oral Biofilms. McBain AJ, editor. *Appl Environ Microbiol.* 2019 Nov 22;86(3):e01941-19, /aem/86/3/AEM.01941-19.atom.
24. Jiang Q, Chen J, Yang C, Yin Y, Yao K. Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *BioMed Res Int.* 2019 Apr 4;2019:1–15.
25. Frias J, Olle E, Alsina M. Periodontal Pathogens Produce Quorum Sensing Signal Molecules. O'Brien AD, editor. *Infect Immun.* 2001 May 1;69(5):3431–4.
26. Zhang Y, Shi W, Song Y, Wang J. Metatranscriptomic analysis of an *in vitro* biofilm model reveals strain-specific interactions among multiple bacterial species. *J Oral Microbiol.* 2019 Jan 1;11(1):1599670.

27. Jia L, Han N, Du J, Guo L, Luo Z, Liu Y. Pathogenesis of Important Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* via Toll-Like Receptors. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019 Jul 18;9:262.
28. Yilmaz Ö, Young PA, Lamont RJ, Kenny GE. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiology.* 2003 Sep 1;149(9):2417–26.
29. Wang M, Shakhathreh M-AK, James D, Liang S, Nishiyama S, Yoshimura F, et al. Fimbrial Proteins of *Porphyromonas gingivalis* Mediate In Vivo Virulence and Exploit TLR2 and Complement Receptor 3 to Persist in Macrophages. *J Immunol.* 2007 Aug 15;179(4):2349–58.
30. Sochalska M, Potempa J. Manipulation of Neutrophils by *Porphyromonas gingivalis* in the Development of Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 May 23;7:197.
31. Nobre dos Santos-Lima EK, Araújo Paiva Andrade Cardoso K, Mares de Miranda P, Cirino de Carvalho-Filho P, Passos Rocha T, Ferreira de Moura-Costa L, et al. Novel synthetic peptide derived from *Porphyromonas gingivalis* Lys-gingipain detects IgG-mediated host response in periodontitis. *Anaerobe.* 2020 Feb;61:102140.
32. Chaiyarit P, Jaresitthikunchai J, Phaonakrop N, Roytrakul S, Potempa B, Potempa J. Proteolytic effects of gingipains on trefoil factor family peptides. *Clin Oral Investig.* 2018 Mar;22(2):1009–18.
33. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005 Jun;38(1):135–87.
34. Hamlet SM, Taiyeb-Ali TB, Cullinan MP, Westerman B, Palmer JE, Seymour GJ. *Tannerella forsythensis prTH* Genotype and Association With Periodontal Status. *J Periodontol.* 2007 Feb;78(2):344–50.
35. Bloch S, Zwicker S, Bostanci N, Sjöling Å, Boström EA, Belibasakis GN, et al. Immune response profiling of primary monocytes and oral keratinocytes to

- different *Tannerella forsythia* strains and their cell surface mutants. *Mol Oral Microbiol.* 2018 Apr;33(2):155–67.
36. Inagaki S, Onishi S, Kuramitsu HK, Sharma A. Porphyromonas gingivalis Vesicles Enhance Attachment, and the Leucine-Rich Repeat BspA Protein Is Required for Invasion of Epithelial Cells by “Tannerella forsythia.” *Infect Immun.* 2006 Sep;74(9):5023–8.
37. Kaplan CW, Lux R, Haake SK, Shi W. The *Fusobacterium nucleatum* outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm. *Mol Microbiol.* 2009 Jan;71(1):35–47.
38. Yoneda M, Yoshikane T, Motooka N, Yamada K, Hisama K, Naito T, et al. Stimulation of growth of Porphyromonas gingivalis by cell extracts from Tannerella forsythia. *J Periodontal Res.* 2005 Apr;40(2):105–9.
39. Jung Y-J, Jun H-K, Choi B-K. Gingipain-dependent augmentation by *Porphyromonas gingivalis* of phagocytosis of *Tannerella forsythia*. *Mol Oral Microbiol.* 2016 Dec;31(6):457–71.
40. Tsuzukibashi O, Saito M, Kobayashi T, Umezawa K, Nagahama F, Hiroi T, et al. A gene cluster for the synthesis of serotype g-specific polysaccharide antigen in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Arch Microbiol.* 2014 Apr;196(4):261–5.
41. Rosen G, Nisimov I, Helcer M, Sela MN. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b lipopolysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*. *Infect Immun.* 2003 Jun;71(6):3652–6.
42. Tsai C-C, Ho Y-P, Chou Y-S, Ho K-Y, Wu Y-M, Lin Y-C. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* leukotoxin and human periodontitis - A historic review with emphasis on JP2. *Kaohsiung J Med Sci.* 2018 Apr;34(4):186–93.

43. Belibasakis GN, Johansson A, Wang Y, Chen C, Kalfas S, Lerner UH. The Cytolethal Distending Toxin Induces Receptor Activator of NF- κ B Ligand Expression in Human Gingival Fibroblasts and Periodontal Ligament Cells. *Infect Immun*. 2005 Jan;73(1):342–51.
44. Tsukasaki M. RANKL and osteoimmunology in periodontitis. *J Bone Miner Metab* [Internet]. 2020 Oct 17 [cited 2020 Dec 11]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00774-020-01165-3>.
45. Hassan KS, El Tantawi MM, Alagl AS, Alnimr AM, Haseeb YA. Sensitivity and specificity of subgingival bacteria in predicting preterm birth- a pilot cohort study. *Int J Health Sci*. 2016 Oct;10(4):532–41.
46. Slots J, Slots H. Periodontal herpesvirus morbidity and treatment. *Periodontol 2000*. 2019 Feb;79(1):210–20.
47. Sztukowska MN, Dutton LC, Delaney C, Ramsdale M, Ramage G, Jenkinson HF, et al. Community Development between *Porphyromonas gingivalis* and *Candida albicans* Mediated by InlJ and Als3. Biswas I, editor. *mBio*. 2018 Apr 24;9(2):e00202-18, /mbio/9/2/mBio.00202-18.atom.
48. Lourenço AG, Ribeiro AERA, Nakao C, Motta ACF, Antonio LGL, Machado AA, et al. Oral *Candida* spp carriage and periodontal diseases in HIV-infected patients in Ribeirão Preto, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* [Internet]. 2017 [cited 2020 Dec 12];59(0). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652017005000216&lng=en&tlng=en
49. Vieira Colombo AP, Magalhães CB, Hartenbach FARR, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog*. 2016 May;94:27–34.
50. Wolf DL, Lamster IB. Contemporary Concepts in the Diagnosis of Periodontal Disease. *Dent Clin North Am*. 2011 Jan;55(1):47–61.

51. Hiranmayi Kv, Sirisha K, Ramoji Rao M, Sudhakar P. Novel pathogens in periodontal microbiology. *J Pharm Bioallied Sci.* 2017;9(3):155.
52. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples: Comparison of cultivation and PCR. *J Clin Periodontol.* 2002 Jul;29(7):638–44.
53. Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2004 Feb;34(1):49–56.
54. Danišová O, Halánová M, Valenčáková A, Luptáková L. Sensitivity, specificity and comparison of three commercially available immunological tests in the diagnosis of *Cryptosporidium* species in animals. *Braz J Microbiol.* 2018 Jan;49(1):177–83.
55. Draghici S, Khatri P, Eklund A, Szallasi Z. Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends Genet.* 2006 Feb;22(2):101–9.
56. Jervoe-Storm P-M, Koltzsch M, Falk W, Dorfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.* 2005 Jul;32(7):778–83.
57. Wagner K, Springer B, Pires VP, Keller PM. High-throughput screening of bacterial pathogens in clinical specimens using 16S rDNA qPCR and fragment analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019 Apr;93(4):287–92.
58. Hu Y, Sun F, Liu W. The heat shock protein 70 gene as a new alternative molecular marker for the taxonomic identification of *Streptomyces* strains. *AMB Express.* 2018 Dec;8(1):144.
59. Valones MAA, Guimarães RL, Brandão LAC, Souza PRE de, Carvalho A de AT, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz J Microbiol.* 2009 Mar;40(1):1–11.

60. Kumawat R, Ganvir S, Hazarey V, Qureshi A, Purohit H. Detection of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in chronic and aggressive periodontitis patients: A comparative polymerase chain reaction study. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(4):481.
61. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. *J Clin Microbiol*. 2001 Feb 1;39(2):485–93.
62. Sidstedt M, Rådström P, Hedman J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. *Anal Bioanal Chem*. 2020 Apr;412(9):2009–23.
63. Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard S. Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res*. 2014;3(1):85.
64. Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol Aspects Med*. 2006 Apr;27(2–3):254–98.
65. Tomás I, Regueira-Iglesias A, López M, Arias-Bujanda N, Novoa L, Balsa-Castro C, et al. Quantification by qPCR of Pathobionts in Chronic Periodontitis: Development of Predictive Models of Disease Severity at Site-Specific Level. *Front Microbiol*. 2017 Aug 9;8:1443.
66. Lochman J, Zapletalova M, Poskerova H, Izakovicova Holla L, Borilova Linhartova P. Rapid Multiplex Real-Time PCR Method for the Detection and Quantification of Selected Cariogenic and Periodontal Bacteria. *Diagnostics*. 2019 Dec 22;10(1):8.
67. Mani A, Anarthe R, Marawar P, Mustilwar R, Bhosale A. Diagnostic kits: An aid to periodontal diagnosis. *J Dent Res Rev*. 2016;3(3):107.
68. Urbán E, Terhes G, Radnai M, Gorzó I, Nagy E. Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method. *Anaerobe*. 2010 Jun;16(3):283–8.

69. Santigli E, Leitner E, Wimmer G, Kessler HH, Feierl G, Grube M, et al. Accuracy of commercial kits and published primer pairs for the detection of periodontopathogens. *Clin Oral Investig*. 2016 Dec;20(9):2515–28.
70. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):63e–63.
71. Lim HSY, Zheng Q, Miks-Krajnik M, Turner M, Yuk H-G. Evaluation of Commercial Kit Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Low Levels of Uninjured and Injured Salmonella on Duck Meat, Bean Sprouts, and Fishballs in Singapore. *J Food Prot*. 2015 Jun 1;78(6):1203–7.
72. Kaneko H, Iida T, Aoki K, Ohno S, Suzutani T. Sensitive and Rapid Detection of Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Clin Microbiol*. 2005 Jul 1;43(7):3290–6.
73. Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, et al. Rapid Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infection by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *J Clin Microbiol*. 2005 Feb 1;43(2):951–5.
74. Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. Real-Time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of West Nile Virus. *J Clin Microbiol*. 2004 Jan 1;42(1):257–63.
75. Lau YL, Meganathan P, Sonaimuthu P, Thiruvengadam G, Nissapatorn V, Chen Y. Specific, Sensitive, and Rapid Diagnosis of Active Toxoplasmosis by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Using Blood Samples from Patients. *J Clin Microbiol*. 2010 Oct 1;48(10):3698–702.
76. Zoheir KMA, Allam AA. A rapid method for sexing the bovine embryo. *Anim Reprod Sci*. 2010 May;119(1–2):92–6.
77. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin Chem*. 2001 Sep;47(9):1742–3.

78. Chen H-W, Weissenberger G, Atkins E, Chao C-C, Suputtamongkol Y, Ching W-M. Highly Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of *Leptospira*. *Int J Bacteriol*. 2015 Jan 27;2015:1–6.
79. Li Y, Fan P, Zhou S, Zhang L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microb Pathog*. 2017 Jun;107:54–61.
80. Martineau RL, Murray SA, Ci S, Gao W, Chao S, Meldrum DR. Improved Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays via Swarm Priming. *Anal Chem*. 2017 Jan 3;89(1):625–32.
81. Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LP, Kirrmaier D, et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med*. 2020 Aug 12;12(556):eabc7075.
82. Sahoo PR, Sethy K, Mohapatra S, Panda D. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet World*. 2016 May;9(5):465–9.
83. Wong Y-P, Othman S, Lau Y-L, Radu S, Chee H-Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol*. 2018 Mar;124(3):626–43.
84. Dhama K, Karthik K, Chakrabort S, Tiwari R, Kapoor S, Kumar A, et al. Loop-mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP): A New Diagnostic Tool Lights the World of Diagnosis of Animal and Human Pathogens: A Review. *Pak J Biol Sci*. 2014 Jan 15;17(2):151–66.
85. Yoshida A, Nagashima S, Ansai T, Tachibana M, Kato H, Watari H, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, and *Treponema denticola*. *J Clin Microbiol*. 2005 May;43(5):2418–24.
86. Maeda H, Koikeguchi S, Fujimoto C, Tanimoto I, Yoshizumi W, Nishimura F, et al. Detection of periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* by loop-

- mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005 Feb;43(2):233–9.
87. Miyagawa J, Maeda H, Murauchi T, Koikeguchi S, Yamabe K, Tanimoto I, et al. Rapid and simple detection of eight major periodontal pathogens by the loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Aug;53(3):314–21.
88. Al-Hamdoni SASM, Al-Rawi AMM. Colorimetric LAMP Molecular Method for Immediate Detection of Three Periodontal Pathogens [Internet]. In Review; 2020 Jan [cited 2020 Dec 14]. Available from: <https://www.researchsquare.com/article/rs-11352/v1>
89. Liu W, Huang S, Liu N, Dong D, Yang Z, Tang Y, et al. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay. *Sci Rep*. 2017 Mar;7(1):40125.
90. Sakai J, Maeda T, Tarumoto N, Misawa K, Tamura S, Imai K, et al. A novel detection procedure for mutations in the 23S rRNA gene of *Mycoplasma pneumoniae* with peptide nucleic acid-mediated loop-mediated isothermal amplification assay. *J Microbiol Methods*. 2017 Oct;141:90–6.
91. Zhang F, Ma L, Xu Z, Zheng J, Shi Y, Lu Y, et al. Sensitive and rapid detection of *Karenia mikimotoi* (Dinophyceae) by loop-mediated isothermal amplification. *Harmful Algae*. 2009 Sep;8(6):839–42.
92. Karthik K, Rathore R, Thomas P, Arun TR, Viswas KN, Dhama K, et al. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX*. 2014;1:137–43.
93. Srisrattakarn A, Lulitanond A, Wilailuckana C, Charoensri N, Wonglakorn L, Saenjamla P, et al. Rapid and simple identification of carbapenemase genes, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{VIM}, bla_{IMP-14} and bla_{KPC} groups, in Gram-negative bacilli by in-house loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017 Jul;33(7):130.

94. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008 May;3(5):877–82.
95. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K-I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques.* 2009 Mar;46(3):167–72.
96. Arimatsu Y, Kaewkes S, Laha T, Hong S-J, Stripa B. Rapid detection of *Opisthorchis viverrini* copro-DNA using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitol Int.* 2012 Mar;61(1):178–82.
97. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature.* 2011 Jul;475(7356):348–52.
98. Toumazou C, Shepherd LM, Reed SC, Chen GI, Patel A, Garner DM, et al. Simultaneous DNA amplification and detection using a pH-sensing semiconductor system. *Nat Methods.* 2013 Jul;10(7):641–6.
99. Tanner NA, Zhang Y, Evans TC. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques.* 2015 Feb;58(2):59–68.
100. Lau Y-L, Lai M-Y, Teoh B-T, Abd-Jamil J, Johari J, Sam S-S, et al. Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. Coffey LL, editor. *PLOS ONE.* 2015 Sep 18;10(9): e0138694.
101. Stratakos ACh, Linton M, Millington S, Grant IR. A loop-mediated isothermal amplification method for rapid direct detection and differentiation of nonpathogenic and verocytotoxigenic *Escherichia coli* in beef and bovine faeces. *J Appl Microbiol.* 2017 Mar;122(3):817–28.
102. Moonga LC, Hayashida K, Kawai N, Nakao R, Sugimoto C, Namangala B, et al. Development of a Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Simultaneous Detection of Spotted Fever Group Rickettsiae and

- Malaria Parasites by Dipstick DNA Chromatography. *Diagn Basel Switz*. 2020 Nov 2;10(11).
103. Oriero EC, Okebe J, Jacobs J, Van Geertruyden J-P, Nwakanma D, D'Alessandro U. Diagnostic performance of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the apicoplast genome for malaria diagnosis in a field setting in sub-Saharan Africa. *Malar J*. 2015 Oct 9;14:396.
104. Oriero CE, van Geertruyden J-P, Jacobs J, D'Alessandro U, Nwakanma D. Validation of an apicoplast genome target for the detection of *Plasmodium* species using polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Jul;21(7):686.e1-7.
105. Díaz CM, Bullon B, Ruiz-Salmerón RJ, Fernández-Riejos P, Fernández-Palacín A, Battino M, et al. Molecular inflammation and oxidative stress are shared mechanisms involved in both myocardial infarction and periodontitis. *J Periodontal Res*. 2020 Aug;55(4):519–28.
106. Zhang S, Yu N, Arce RM. Periodontal inflammation: Integrating genes and dysbiosis. *Periodontol 2000*. 2020 Feb;82(1):129–42.
107. Ram-Mohan N, Meyer MM. Comparative Metatranscriptomics of Periodontitis Supports a Common Polymicrobial Shift in Metabolic Function and Identifies Novel Putative Disease-Associated ncRNAs. *Front Microbiol*. 2020 Apr 9;11:482.
108. Choi H, Kim E, Kang J, Kim H-J, Lee J-Y, Choi J, et al. Real-time PCR quantification of 9 periodontal pathogens in saliva samples from periodontally healthy Korean young adults. *J Periodontal Implant Sci*. 2018;48(4):261.
109. Kye W, Davidson R, Martin J, Engebretson S. Current Status of Periodontal Risk Assessment. *J Evid Based Dent Pract*. 2012 Sep;12(3):2–11.
110. Mdala I, Olsen I, Haffajee AD, Socransky SS, Thoresen M, Blasio BF. Comparing clinical attachment level and pocket depth for predicting periodontal disease

- progression in healthy sites of patients with chronic periodontitis using multi-state Markov models. *J Clin Periodontol.* 2014 Sep;41(9):837–45.
111. Könönen E, Gursoy M, Gursoy U. Periodontitis: A Multifaceted Disease of Tooth-Supporting Tissues. *J Clin Med.* 2019 Jul 31;8(8):1135.
112. Schätzle M, Loe H, Bärgin W, Ånerud Å, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis: I. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2003 Oct;30(10):887–901.
113. Haffajee AD, Bogren A, Hasturk H, Feres M, Lopez NJ, Socransky SS. Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *J Clin Periodontol.* 2004 Nov;31(11):996–1002.
114. Lira-Junior R, Åkerman S, Klinge B, Boström EA, Gustafsson A. Salivary microbial profiles in relation to age, periodontal, and systemic diseases. Komaki M, editor. *PLOS ONE.* 2018 Mar 14;13(3):e0189374.
115. Furuta M, Shimazaki Y, Tanaka S, Takeuchi K, Shibata Y, Takeshita T, et al. Gender-Specific Associations of Serum Antibody to *Porphyromonas gingivalis* and Inflammatory Markers. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1–9.
116. Ghazeeri G, Abdullah L, Abbas O. Immunological Differences in Women Compared with Men: Overview and Contributing Factors: GENDER IMMUNOLOGICAL DIMORPHISM. *Am J Reprod Immunol.* 2011 Sep;66(3):163–9.
117. Valerio MS, Basilakos DS, Kirkpatrick JE, Chavez M, Hathaway-Schrader J, Herbert BA, et al. Sex-based differential regulation of bacterial-induced bone resorption. *J Periodontal Res.* 2017 Jun;52(3):377–87.
118. Shiau HJ, Reynolds MA. Sex Differences in Destructive Periodontal Disease: Exploring the Biologic Basis. *J Periodontol.* 2010 Nov;81(11):1505–17.

119. Takasaki K, Fujise O, Miura M, Hamachi T, Maeda K. *Porphyromonas gingivalis* displays a competitive advantage over *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in co-cultured biofilm. J Periodontal Res. 2013 Jun;48(3):286–92.
120. Haraguchi A, Miura M, Fujise O, Hamachi T, Nishimura F. *Porphyromonas gingivalis* gingipain is involved in the detachment and aggregation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm. Mol Oral Microbiol. 2014 Jun;29(3):131–43.
121. Claesson R, Höglund-Åberg C, Haubek D, Johansson A. Age-related prevalence and characteristics of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in periodontitis patients living in Sweden. J Oral Microbiol. 2017 Jan 1;9(1):1334504.
122. Dioguardi M, Crincoli V, Laino L, Alovise M, Sovereto D, Mastrangelo F, et al. The Role of Periodontitis and Periodontal Bacteria in the Onset and Progression of Alzheimer’s Disease: A Systematic Review. J Clin Med. 2020 Feb 11;9(2):495.
123. Fine DH, Schreiner H, Velusamy SK. *Aggregatibacter*, a Low Abundance Pathobiont That Influences Biogeography, Microbial Dysbiosis, and Host Defense Capabilities in Periodontitis: The History of a Bug, and Localization of Disease. Pathogens. 2020 Mar 2;9(3):179.
124. Ardila C, Alzate J, Guzmán I. Relationship between Gram negative enteric rods, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and clinical parameters in periodontal disease. J Indian Soc Periodontol. 2012;16(1):65.
125. Yost S, Duran-Pinedo AE. The contribution of *Tannerella forsythia* dipeptidyl aminopeptidase IV in the breakdown of collagen. Mol Oral Microbiol. 2018 Dec;33(6):407–19.
126. Mineoka T, Awano S, Rikimaru T, Kurata H, Yoshida A, Ansai T, et al. Site-Specific Development of Periodontal Disease Is Associated With Increased Levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in Subgingival Plaque. J Periodontol. 2008 Apr;79(4):670–6.

127. Pieczul K, Wąsowska A. The application of next-generation sequencing (NGS) for monitoring of *Zymoseptoria tritici* QoI resistance. *Crop Prot.* 2017 Feb;92:143–7.
128. Huck O, Mulhall H, Rubin G, Kizelnik Z, Iyer R, Perpich JD, et al. *Akkermansia muciniphila* reduces *Porphyromonas gingivalis* -induced inflammation and periodontal bone destruction. *J Clin Periodontol.* 2020 Feb;47(2):202–12.
129. Yoon D-L, Kim S, Song H, Kim Y-G, Lee J-M, Kim J. Detection of Bacterial Species in Chronic Periodontitis Tissues at Different Stages of Disease Severity. *J Bacteriol Virol.* 2015;45(4):364.
130. Hyvärinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, et al. Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immun.* 2009 Aug;15(4):195–204.
131. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *ScientificWorldJournal.* 2020;2020:2146160.
132. Ramazzotti M, Bacci G. 16S rRNA-Based Taxonomy Profiling in the Metagenomics Era. In: *Metagenomics* [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2021 Jan 24]. p. 103–19. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081022689000057>
133. Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol 2000.* 2013 Jun;62(1):95-162.
134. Jiang Y, Zhou X, Cheng L, Li M. The Impact of Smoking on Subgingival Microflora: From Periodontal Health to Disease. *Front Microbiol.* 2020;11:66.
135. Kumar PS, Matthews CR, Joshi V, de Jager M, Aspiras M. Tobacco smoking affects bacterial acquisition and colonization in oral biofilms. *Infect Immun.* 2011 Nov;79(11):4730–8.
136. Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D. *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol.* 2011;13(2):25–36.

137. Shchipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS. Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis. *J Dent Res*. 2010 Nov;89(11):1247–53.
138. Yu G, Phillips S, Gail MH, Goedert JJ, Humphrys MS, Ravel J, et al. The effect of cigarette smoking on the oral and nasal microbiota. *Microbiome*. 2017 Jan 17;5(1):3.
139. Bagaitkar J, Williams LR, Renaud DE, Bemakanakere MR, Martin M, Scott DA, et al. Tobacco-induced alterations to *Porphyromonas gingivalis*-host interactions. *Environ Microbiol*. 2009 May;11(5):1242–53.
140. Loe H, Silness J. PERIODONTAL DISEASE IN PREGNANCY. I. PREVALENCE AND SEVERITY. *Acta Odontol Scand*. 1963 Dec;21:533–51.
141. Mühlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gingivitis. *Helv Odontol Acta*. 1971 Oct;15(2):107–13.
142. Renvert S, Persson RE, Persson GR. Tooth loss and periodontitis in older individuals: results from the Swedish National Study on Aging and Care. *J Periodontol*. 2013 Aug;84(8):1134–44.
143. Thomson WM, Shearer DM, Broadbent JM, Foster Page LA, Poulton R. The natural history of periodontal attachment loss during the third and fourth decades of life. *J Clin Periodontol*. 2013 Jul;40(7):672–80.
144. Hajishengallis G. Too old to fight? Aging and its toll on innate immunity. *Mol Oral Microbiol*. 2010 Feb;25(1):25–37.
145. Childs BG, Durik M, Baker DJ, van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med*. 2015 Dec;21(12):1424–35.
146. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):729–40.

147. Cáceres M, Oyarzun A, Smith PC. Defective Wound-healing in Aging Gingival Tissue. *J Dent Res*. 2014 Jul;93(7):691–7.
148. Lim WH, Liu B, Mah S-J, Chen S, Helms JA. The molecular and cellular effects of ageing on the periodontal ligament. *J Clin Periodontol*. 2014 Oct;41(10):935–42.
149. Tyburski J, A. S, Daca-Roszak P, Tretyn A. PCR in real time. The methods of data analysis. *Biotechnologia*. 2008 Jan 1;80:86–96.
150. Kim E-H, Joo J-Y, Lee YJ, Koh J-K, Choi J-H, Shin Y, et al. Grading system for periodontitis by analyzing levels of periodontal pathogens in saliva. *PLoS One*. 2018;13(11):e0200900.
151. Bartold PM, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017 Oct;75(1):317–29.
152. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol 2000*. 2013 Jun;62(1):203–17.
153. Nonnenmacher C, Dalpke A, Rochon J, Flores-de-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. *J Periodontol*. 2005 Sep;76(9):1542–9.
154. Lenkowski M, Nijakowski K, Kaczmarek M, Surdacka A. The Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique in Periodontal Diagnostics: A Systematic Review. *JCM*. 2021 Mar 12;10(6):1189.
155. Van Dyke TE. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. *Mol Aspects Med*. 2017 Dec;58:21–36.
156. Zhang Y, Tanner NA. Isothermal Amplification of Long, Discrete DNA Fragments Facilitated by Single-Stranded Binding Protein. *Sci Rep*. 2017 Dec;7(1):8497.

STRESZCZENIE

Zapalenie przyzębia jest chorobą będącą wynikiem oddziaływania na tkanki przyzębia różnych czynników, szeroko rozpowszechnioną wśród populacji ludzkiej.

Celem prezentowanej pracy była detekcja przy użyciu techniki izotermalnej amplifikacji kwasów nukleinowych (LAMP) czterech periodontopatogenów: *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Fusobacterium nucleatum* (F.n.) oraz *Tannerella forsythia* (T.f.) w materiale klinicznym pochodzącym od chorych z agresywnym i przewlekłym zapaleniem przyzębia.

Materiał do badań pochodził od 62 pacjentów ze zdiagnozowanym zapaleniem przyzębia oraz od 56 osób, u których nie stwierdzono objawów zapalenia przyzębia. Badane próbki poddano ocenie jakościowej (określono obecność DNA patogenów) oraz ilościowej (zmierzone liczbę kopii DNA patogenów), porównano czułość i swoistość metody LAMP z technikami PCR oraz Real-Time PCR, a także przeanalizowano relacje pomiędzy wykrywalnością w/w periopatogenów a najważniejszymi stomatologicznymi parametrami klinicznymi zapalenia przyzębia, tj. głębokością kieszonki dziąsłowej (PD), utratą przyczepu łącznotkankowego (CAL) i wskaźnikiem krwawienia z kieszonki dziąsłowej (SBI).

Analiza porównawcza trzech wykorzystanych w badaniu metod analitycznych w zakresie czułości i specyficzności, przy jednoczesnej ocenie dwóch różnych metod izolacji materiału genetycznego z wykorzystaniem buforów TE oraz „Difast”, pozwoliła na wskazanie najbardziej optymalnego testu umożliwiającego szybką i wiarygodną detekcję periopatogenów w praktyce klinicznej. W odniesieniu do technik PCR i Real-Time PCR, metoda LAMP wykazała porównywalny poziom czułości oraz specyficzności, cechowała się krótszym czasem wykonania badania oraz łatwością interpretacji otrzymanych wyników. Detekcja bakterii *F.nucleatum* oraz *T.forsythia* z materiału zabezpieczonego do izolacji buforem TE metodą LAMP okazała się szybsza i bardziej precyzyjna w porównaniu do Real-Time PCR.

Wyniki uzyskane w trakcie przeprowadzonych analiz wskazują, że metoda LAMP spełnia kryteria niezbędne do wykorzystania jej w warunkach ambulatoryjnych. Wszechstronność LAMP, która w ostatnim czasie również została doceniona poprzez wykorzystanie jej do wykrywania wirusa SARS-COV-2, sprawia, że technika ta może okazać się niezbędnym narzędziem w celu szybkiego diagnozowania oraz celowanego leczenia chorób przyzębia.

SUMMARY

Periodontitis is a highly prevalent oral disease occurring across the globe, resulting from an interaction of many predisposing factors.

The aim of the presented study was the utilization of isothermal amplification of nucleic acids technique (LAMP) for the detection of four periodontopathogens: *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Fusobacterium nucleatum* (Fn) *Tannerella forsythia* (Tf) obtained from the clinical specimen, acquired from 62 people diagnosed with periodontitis and from 56 people exhibiting no signs of the disease.

The tested samples were assessed qualitatively (the presence of pathogen DNA was determined) and quantitatively (the number of pathogen DNA copies was measured), the sensitivity and specificity of the LAMP method were compared with the PCR and Real-Time PCR techniques, and the relationship between the detectability of the above-mentioned periopathogens and important periodontal parameters such as probing pocket depth (PD), connective tissue attachment loss (CAL) and sulcular bleeding index (SBI) were analyzed.

A comparative analysis of the three analytical methods used in the study in terms of sensitivity and specificity, with the simultaneous evaluation of two different methods of isolating genetic material with the use of TE and “Difast” buffers, allowed to indicate the most optimal test enabling quick and reliable detection of periopathogens in clinical practice. With regard to the PCR and Real-Time PCR techniques, the LAMP method showed a comparable level of sensitivity and specificity. It was also characterized by a shorter duration of the test and exhibiting ease of interpretation of the obtained results. Detection of *F.nucleatum* and *T. Forsythia* bacteria from material protected for isolation with TE buffer by LAMP method turned out to be faster and more precise compared to Real-Time PCR.

The results obtained during the conducted analysis, indicate that the LAMP method meets the criteria necessary for its use in an outpatient setting. The versatility of LAMP, which has recently also been appreciated for its use in the detection the SARS-COV-2 virus, makes this technique an indispensable tool for the rapid diagnosis and targeted treatment of periodontal diseases.

SPIS TABEL

TABELA 1 - ZMIENNE DLA GRUPY BADANEJ (CHORYCH) ORAZ GRUPY KONTROLNEJ.....	32
TABELA 2 - KRYTERIA OCENY STANU DZIAŚEŁ WG WSKAŹNIKA DZIAŚŁOWEGO (GI).....	34
TABELA 3 - SEKWENCJE STARTERÓW WRAZ Z TEMPERATURĄ TOPNIENIA WYKORZYSTANE DO IDENTYFIKACJI POSZCZEGÓLNYCH PATOGENÓW ZA POMOCĄ METODY LAMP (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	41
TABELA 4 - PODSUMWANIE POSZCZEGÓLNYCH SKŁADNIKÓW ORAZ ICH OBJĘTOŚCI WYKORZYSTANYCH DO DETEKЦИИ PERIODONTOPATOGENÓW (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	42
TABELA 5 - WARUNKI AMPLIFIKACJI METODY LAMP (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	42
TABELA 6 - STARTERY OLIGONUKLEOTYDOWE WYKORZYSTANE W REAKCJACH PCR I REAL-TIME PCR (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	46
TABELA 7 - GRADIENT TEMPERATUROWY WYKORZYSTANY DLA METODY KONWENCJONALNEGO PCR (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	47
TABELA 8 - PODSUMOWANIE POSZCZEGÓLNYCH SKŁADNIKÓW ORAZ ICH OBJĘTOŚCI WYKORZYSTANYCH DO DETEKЦИИ PERIODONTOPATOGENÓW ZA POMOCĄ METODY PCR.....	48
TABELA 9 - WARUNKI PRZEPROWADZANIA REAKCJI PCR (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	48
TABELA 10 - PODSUMOWANIE POSZCZEGÓLNYCH SKŁADNIKÓW ORAZ ICH OBJĘTOŚCI WYKORZYSTANYCH DO DETEKЦИИ PERIODONTOPATOGENÓW ZA POMOCĄ METODY REAL TIME PCR (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	51
TABELA 11 - STAN DZIAŚEŁ I PRZYŻĘBIA W GRUPIE BADANEJ I KONTROLNEJ.....	54
TABELA 12 - WYKRYWALNOŚĆ BAKTERII P. GINGIVALIS, ZA POMOCĄ TESTU LAMP BUFOR TE, W ZALEŻNOŚCI OD POSZCZEGÓLNYCH ZMIENNYCH.	58
TABELA 13 - WYKRYWALNOŚĆ BAKTERII P.GINGIVALIS ZA POMOCĄ TESTU PCR W BUFORZE TE W ZALEŻNOŚCI OD POSZCZEGÓLNYCH ZMIENNYCH.	60
TABELA 14 - WYKRYWALNOŚĆ BAKTERII P.GINGIVALIS ZA POMOCĄ TESTU REAL-TIME PCR W BUFORZE TE W ZALEŻNOŚCI OD BADANYCH ZMIENNYCH.	62
TABELA 15 - WYKRYWALNOŚĆ BAKTERII A.ACTINOMYCETEMCOMMITANS ZA POMOCĄ TESTU LAMP W BUFORZE TE, W ZALEŻNOŚCI OD BADANYCH ZMIENNYCH.	65
TABELA 16 - WYKRYWALNOŚĆ BAKTERII A.ACTINOMYCETEMCOMMITANS ZA POMOCĄ TESTU PCR DLA W BUFORZE TE, W ZALEŻNOŚCI OD BADANYCH ZMIENNYCH.	67

TABELA 17 - WYKRYWALNOŚĆ BAKTERII A.ACTINOMYCETEMCOMMITANS ZA POMOCĄ TESTU REAL TIME DLA (BUFOR „DIFAST”) W ZALEŻNOŚCI OD BADANYCH ZMIENNYCH.	70
TABELA 18 - WYKRYWALNOŚĆ BAKTERII F. NUCLEATUM ZA POMOCĄ TESTU LAMP (BUFOR DIFAST) W ZALEŻNOŚCI OD BADANYCH ZMIENNYCH. ZMIENNYMI.....	72
TABELA 19 - WYKRYWALNOŚĆ BAKTERII T. FORSYTHIA ZA POMOCĄ METODY PCR W BUFORZE „DIFAST” W ZALEŻNOŚCI OD BADANYCH ZMIENNYCH.....	76
TABELA 20 - WARTOŚCI KONTYNGENCJI DLA P.GINGIVALIS (BUFOR TE) ANALIZOWANEJ ZA POMOCĄ METODY PCR.	82
TABELA 21 - WARTOŚCI KONTYNGENCJI DLA P.GINGIVALIS W BUFORZE TE ANALIZOWANEJ ZA POMOCĄ METODY PCR.....	82
TABELA 22 - WARTOŚCI KONTYNGENCJI DLA T. FORSYTHIA (BUFOR TE) ANALIZOWANEJ ZA POMOCĄ METODY LAMP.....	84
TABELA 23 - WARTOŚCI KONTYNGENCJI DLA T. FORSYTHIA (BUFOR TE) ANALIZOWANEJ ZA POMOCĄ METODY REAL-TIME PCR.	84
TABELA 24 - WARTOŚCI KONTYNGENCJI DLA F.NUCLEATUM (BUFOR „DIFAST”) ANALIZOWANEJ ZA POMOCĄ METODY LAMP.	86
TABELA 25 - WARTOŚCI KONTYNGENCJI DLA F.NUCLEATUM (BUFOR „DIFAST”) ANALIZOWANEJ ZA POMOCĄ METODY REAL-TIME PCR.	87
TABELA 26 - LICZBA KOPII POSZCZEGÓLNYCH SZCZEPÓW BAKTERII UZYSKANYCH ZA POMOCĄ METODY LAMP (BUFOR TE ORAZ „DIFAST”) W GRUPIE BADANEJ.	93
TABELA 27 - LICZBA KOPII POSZCZEGÓLNYCH SZCZEPÓW BAKTERII UZYSKANYCH ZA POMOCĄ METODY REAL-TIME PCR (BUFOR TE ORAZ „DIFAST”) W GRUPIE BADANEJ.	93
TABELA 28 - LICZBA KOPII POSZCZEGÓLNYCH SZCZEPÓW BAKTERII UZYSKANYCH ZA POMOCĄ METODY LAMP (BUFOR TE ORAZ „DIFAST”) DLA GRUPY BADANEJ I KONTROLNEJ.....	94

SPIS RYCIN

RYCINA 1 - AMPLIFIKACJA IZOTERMICZNA ZA POŚREDNICTWEM PĘTLI (LAMP) WYKORZYSTUJE MIESZANINĘ 4-6 STARTERÓW ROZPOZNAJĄCYCH 6-8 ODREBYNYCH REGIONÓW DOCELOWEGO DNA. POLIMERAZA DNA WYPIERAJĄCA NIĆ INICJUJE SYNTEZĘ, A 2 STARTERY TWORZĄ STRUKTURY PĘTLOWE, W CELU UŁATWIENIA KOLEJNYCH ETAPÓW AMPLIFIKACJI HTTPS://INTERNATIONAL.NEB.COM	24
RYCINA 2 - PROCES POBRANIA MATERIAŁU KLINICZNEGO. MIEJSCE BIORCZE ZOSTAŁO ADEKWATNIE OCZYSZCZONE. MATERIAŁ BIOLOGICZNY ZOSTAŁ UMIEJSCOWIONY W STERYLNYCH PROBÓWKACH TYPU EPPENDORF (1,5 ML) (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	36
RYCINA 3 - SCHEMAT PRZEDSTAWIAJĄCY POSZCZEGÓLNE PRIMERY STOSOWANE W METODZIE LAMP. SZCZEGÓLOWY OPIS ZAWARTY W TEKŚCIE PONIŻEJ (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	39
RYCINA 4 - PRZYKŁADOWE PRZEDSTAWIENIE PRZEBIEGU AMPLIFIKACJI ORAZ TEMPERATURY (ŹRÓDŁO WŁASNE).	43
RYCINA 5 - PROCES AMPLIFIKACJI BAKTERYJNEGO DNA ZA POMOCĄ KLASYCZNEJ METODY PCR (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	44
RYCINA 6 - METODA REAL TIME PCR DO OCENY ILOŚCIOWEJ ZA POMOCĄ BARWNIKA FLUOROSCENCYJNEGO SYBR I. (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	50
RYCINA 7 - KRZYWA WZORCOWA DLA ILOŚCI KOPII BIAŁKA TERMINACYJNEGO/ANTYTERMINACYJNEGO TRANSCRYPCJI (NUSG) F. NULEATUM. WARTOŚĆ WSPÓŁCZYNNIKA NACHYLENIA KRZYWEJ $R = 0.98$ DLA REAKCJI O WYDAJNOŚCI = 1.00 (ŹRÓDŁO WŁASNE).....	52
RYCINA 8 - GŁĘBOKOŚĆ KIESZONKI PRZYŻĘBNEJ W GRUPIE BADANEJ (CHOREJ) I KONTROLNEJ.....	54
RYCINA 9 - STAN DZIAŚEŁ (NA PODSTAWIE WSKAŹNIKA GI) W GRUPIE BADANEJ I KONTROLNEJ.....	55
RYCINA 10 - STAN DZIAŚEŁ (NA PODSTAWIE WSKAŹNIKA KRWAWIENIA SBI) W GRUPIE BADANEJ I KONTROLNEJ.....	55
RYCINA 11 - STAN PRZYŻĘBIA (NA PODSTAWIE WSKAŹNIKA CAL) W GRUPIE BADANEJ I KONTROLNEJ. MEDIANA WSKAŹNIKA CAL W GRUPIE BADANEJ WYNOŚIŁA 3,45 MM, NATOMIAST W KONTROLNEJ 0,13MM.	56

RYCINA 12 - ZALEŻNOŚĆ WYKRYWALNOŚCI P.GINGIVALIS ZA POMOCĄ TESTU LAMP (BUFOR TE) OD ZMIENNEJ GI.....	57
RYCINA 13 - ZALEŻNOŚĆ WYKRYWALNOŚCI P.GINGIVALIS ZA POMOCĄ TESTU LAMP (BUFOR TE) OD ZMIENNEJ SBI.....	57
RYCINA 14 - PRZEWLEKŁY ORAZ AGRESYWNY WARIANT CHOROBY W GRUPIE BADANEJ U OSÓB Z DODATNIM WYNIKIEM NA OBECNOŚĆ P. GINGIVALIS UZYSKANY ZA POMOCĄ METODY PCR.....	59
RYCINA 15 - ZALEŻNOŚĆ WYKRYWALNOŚCI P.GINGIVALIS ZA POMOCĄ TESTU PCR (BUFOR TE) OD ZMIENNEJ SBI.....	60
RYCINA 16 - WYKRYWALNOŚĆ P. GINGIVALIS ZA POMOCĄ TESTU REAL TIME PCR W ZALEŻNOŚCI OD PŁCI.....	61
RYCINA 17 - ZALEŻNOŚĆ WYKRYWALNOŚCI A.ACTINOMYCETEMCOMMITANS ZA POMOCĄ TESTU LAMP (BUFOR TE) OD ZMIENNEJ SBI.....	63
RYCINA 18 - WYKRYWALNOŚĆ A.ACTINOMYCETECOMMITANS ZA POMOCĄ TESTU LAMP (BUFOR TE) W ZALEŻNOŚCI OD WIEKU.....	64
RYCINA 19 - WYKRYWALNOŚĆ A.ACTINOMYCETECOMMITANS ZA POMOCĄ METODY PCR (BUFOR TE) W ZALEŻNOŚCI OD WIEKU.....	66
RYCINA 20 - WYKRYWALNOŚĆ A.ACTINOMYCETECOMMITANS ZA POMOCĄ METODY PCR (BUFOR TE) W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ZAAWANSOWANIA CHOROBY PRZYŻĘBIA..	66
RYCINA 21 - ZALEŻNOŚĆ WYKRYWALNOŚCI A.ACTINOMYCETEMCOMMITANS ZA POMOCĄ TESTU REAL TIME PCR (BUFOR DIFAST) OD ZMIENNEJ PD.	68
RYCINA 22 - ZALEŻNOŚĆ WYKRYWALNOŚCI A.ACTINOMYCETEMCOMMITANS ZA POMOCĄ TESTU REAL TIME PCR (BUFOR DIFAST) OD ZMIENNEJ SBI.	69
RYCINA 23 - WYKRYWALNOŚĆ BAKTERII F.NUCLEATUM ZA POMOCĄ TESTU LAMP W BUFORZE DIFAST W ZALEŻNOŚCI OD STATUSU PALENIA.....	71
RYCINA 24 - WYKRYWALNOŚĆ T. FORSYTHIA ZA POMOCĄ METODY PCR (BUFOR DIFAST) W ZALEŻNOŚCI OD STOPNIA ZAAWANSOWANIA CHOROBY PRZYŻĘBIA.	74
RYCINA 25 - ZALEŻNOŚĆ WYKRYWALNOŚCI T. FORSYTHIA ZA POMOCĄ TESTU PCR (BUFOR DIFAST) OD ZMIENNEJ CAL.	75
RYCINA 26 - PORÓWNANIE CZĘSTOTLIWOŚCI WYSTĘPOWANIA BAKTERII W GRUPIE CHORYCH (BADANEJ) ORAZ KONTROLNEJ WYKRYTYCH TESTEM LAMP W BUFORZE TE.....	77

RYCINA 27 - PORÓWNANIE CZĘSTOTLIWOŚCI WYSTĘPOWANIA BAKTERII W GRUPIE CHORYCH ORAZ KONTROLNEJ WYKRYTYCH TESTEM REAL TIME PCR W BUFORZE TE.	77
RYCINA 28 - PORÓWNANIE CZĘSTOTLIWOŚCI WYSTĘPOWANIA BAKTERII W GRUPIE CHORYCH ORAZ KONTROLNEJ WYKRYTYCH TESTEM PCR W BUFORZE TE.....	78
RYCINA 29 - CZĘSTOTLIWOŚĆ WYSTĘPOWANIA BAKTERII W GRUPIE CHORYCH (BADANA) WYKRYTYCH TESTEM LAMP W BUFORZE DIFAST.	78
RYCINA 30 - CZĘSTOTLIWOŚĆ WYSTĘPOWANIA BAKTERII W GRUPIE CHORYCH WYKRYTYCH TESTEM REAL TIME PCR W BUFORZE „DIFAST”.....	79
RYCINA 31 - CZĘSTOTLIWOŚĆ WYSTĘPOWANIA BAKTERII W GRUPIE CHORYCH WYKRYTYCH TESTEM PCR W BUFORZE DIFAST.	79
RYCINA 32 - WYKRES KRZYWYCH ROC DLA P. GINGIVALIS (BUFOR TE).....	83
RYCINA 33 - WYKRES KRZYWYCH ROC DLA T. FORSYTHIA (BUFOR TE).....	85
RYCINA 34 - WYKRES KRZYWYCH ROC DLA F. NUCLEATUM (BUFOR DIFAST).....	88
RYCINA 35 - PROCES ELUCJI BAKTERYJNEGO DNA W CELU UZYSKANIA KRZYWEJ WZORCOWEJ NA BAZIE, KTÓREJ ZOSTAŁ WYGENEROWANY WYJŚCIOWY NUMER KOPII BAKTERYJNEGO DNA.	89
RYCINA 36 - KRZYWA WZORCOWA WRAZ Z WYKRESEM TEMPERATURY TOPNIENIA UZYSKANA METODĄ LAMP DLA P.GINGIVALIS. UZYSKANO WARTOŚĆ R2 = 0.89 ORAZ EFEKTYWNOŚCI 1.01.....	89
RYCINA 37 - KRZYWA WZORCOWA WRAZ Z WYKRESEM TEMPERATURY TOPNIENIA UZYSKANA METODĄ LAMP DLA A.ACTINOMYCETEMCOMITANS. UZYSKANO WARTOŚĆ R2 =0.89 o WYDAJNOŚCI 1.00.	90
RYCINA 38 - KRZYWA WZORCOWA WRAZ Z WYKRESEM TEMPERATURY TOPNIENIA UZYSKANA METODĄ LAMP DLA F.NUCLEATUM. UZYSKANO WARTOŚĆ R2 = 0.87, o EFEKTYWNOŚCI 0.99.	90
RYCINA 39 - KRZYWA WZORCOWA WRAZ Z WYKRESEM TEMPERATURY TOPNIENIA UZYSKANA METODĄ LAMP DLA T. FORSYTHIA. UZYSKANO WARTOŚĆ R2 = 0.87, o EFEKTYWNOŚCI 0.99.	91
RYCINA 40 - KRZYWA WZORCOWA WRAZ Z WYKRESEM TEMPERATURY TOPNIENIA UZYSKANA METODĄ REAL-TIME PCR DLA T.FORSYTHIA. UZYSKANO WARTOŚĆ R2 = 0.90, o EFEKTYWNOŚCI 1.00.	91

RYCINA 41 - KRZYWA WZORCOWA WRAZ Z WYKRESEM TEMPERATURY TOPNIENIA UZYSKANA METODĄ REAL-TIME PCR DLA P.GINGIVALIS. UZYSKANO WARTOŚĆ R2 = 0.90, O EFEKTYWNOŚCI 1.00.	92
RYCINA 42 - KRZYWA WZORCOWA WRAZ Z WYKRESEM TEMPERATURY TOPNIENIA UZYSKANA METODĄ REAL-TIME PCR DLA A.ACTINOMYCETEMCOMITANS. UZYSKANO WARTOŚĆ R2 = 0.80, O EFEKTYWNOŚCI 1.11.....	92
RYCINA 43 - KRZYWA WZORCOWA WRAZ Z WYKRESEM TEMPERATURY TOPNIENIA UZYSKANA METODĄ LAMP DLA F.NUCLEATUM. UZYSKANO WARTOŚĆ R2 = 0.95, O EFEKTYWNOŚCI 1.00.	93
RYCINA 44 - PORÓWNANIE LICZBY KOPII DLA BAKTERII A.ACTINOMYCETEMCOMITANS (METODA LAMP (BUFOR TE) W GRUPIE BADANEJ I KONTROLNEJ.	95