

ABSTRACT

Fremover formodes mikrobiologisk diagnostik at blive en integreret del af klinisk praksis

Mundhulen er et åbent mikrobiologisk økosystem, som kontinuerligt påvirkes af udefrakommende faktorer i form af fysiske, kemiske og termiske stimuli. Det samlede orale mikrobiom er særdeles komplekst og består primært af bakterier, mens andre mikroorganismer såsom virus, protozoer, svampe og arkebakterier kan udgøre mindre dele af det orale mikrobiom. Udvikling af molekylære metoder primært baseret på analyse af generne, der koder for det fylogenetisk velbevarede 16S ribosomale RNA (16S rRNA), har dokumenteret, at det orale mikrobiom udviser væsentlig større diversitet og kompleksitet, end det hidtil var antaget baseret på resultater fra mikroskopi og dyrkningsstudier. Det har således vist sig, at den orale mikroflora udgøres af mere end 700 forskellige dominante arter, hvoraf op imod 100-200 forskellige bakteriearter kan påvises fra en enkelt person. Omkring 35 % af den orale mikroflora kan ikke dyrkes med nuværende laboratorieteknikker. Den permanente orale mikroflora menes at have en beskyttende effekt mod udvikling af orale sygdomme, mens forskydninger i denne som følge af økologiske ændringer synes afgørende for udvikling af marginal parodontitis og caries. Formålet med denne oversigtsartikel er at præsentere mikrobiologiske metoder til analyse af orale bakterier, herunder resistensbestemmelse som et led i odontologisk diagnostik. Derudover diskuteres muligheder for fremtidig udvikling af molekylærbiologiske metoder, der kan benyttes rutinemæssigt til identifikation af risikopatienter på tandlægeklinikken.



Henvendelse til forfatter:
Daniel Belstrøm, e-mail: dbel@sund.ku.dk

Mikrobiologisk diagnostik ved infektioner i mundhulen nu og i fremtiden

Daniel Belstrøm, adjunkt tandlæge, ph.d., Sektion for Parodontologi, Mikrobiologi og Samfundsodontologi, Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Tilstedeværelsen af mikroorganismer i dental plak blev først beskrevet i slutningen af det 17. århundrede via analyser gennemført ved hjælp af simple hjemmelavede mikroskoper (1). Siden da har udviklingen af avancerede molekylærbiologiske metoder medført detaljerede beskrivelser af den orale mikroflora, hvilket har demonstreret, at mundhulen er koloniseret af den næstmest komplekse mikroflora i den humane organisme kun overgået af tarmen (2). De to hyppigste orale sygdomme, marginal parodontitis og caries, er begge multifaktorielle sygdomme, hvori ændringer i sammensætningen af den lokale mikroflora synes at spille en afgørende rolle for sygdomsudvikling, hvorfor mikrobiologisk analyse ideelt set kunne være en integreret del af moderne odontologisk risikovurdering (3). Nyere molekylærbiologiske metoder har i det væsentlige afløst dyrkningsanalyser ved videnskabelige studier af den orale mikroflora, og selvom disse teknikker giver mulighed for analyse af den ikke-dyrkbare andel af den orale mikroflora, er de forbundet med praktiske begrænsninger, som skal overkommes, før de kan erstatte den nuværende brug af dyrkningsanalyser til klinisk odontologisk diagnostik (3). Således er disse metoder på nuværende tidspunkt dyre og ofte tidskrævende at gennemføre, og da de baserer sig på genetisk analyse af bakterielt DNA fremfor levende bakterier, kan der ikke foretages sufficient resistensbestemmelse af den undersøgte mikroflora

(1). Forsat teknologisk udvikling er derfor en nødvendighed, for at moderne mikrobiologiske metoder forhåbentlig engang i fremtiden vil kunne introduceres til daglig brug på tandklinikken. I denne oversigtsartikel benyttes begrebet mikrobiom ved beskrivelse af den samlede tilstedeværelse af mikroorganis-

EMNEORD

Molecular methods;
16S rRNA;
high-throughput
nucleotide sequencing;
oral microbiome;
oral microbiota

mer (bakterier, virus, protozoer, svampe og arkebakterier), mens termen mikroflora bruges synonymt omkring bakterielle sammensætninger (2). Litteratursøgning er foretaget på PubMed databasen med søgeordene "oral microbiome", "oral microbiota", "molecular methods", "16S-rRNA" og "High-Throughput Nucleotide Sequencing", og der er ligeledes foretaget MESH-søgninger med kombinationer af de valgte søgeord. Videnskabelige artikler er inkluderet i forhold til deres relevans for denne oversigtsartikel, og der er lagt vægt på inklusion af artikler af nyere dato. Brugen af mikrobiologiske metoder diskuteres for overskuelighedens skyld primært i kontekst af marginal parodontitis og caries, men deres anvendelse begrænses på ingen måde til analyse af mikrofloraens rolle ved disse sygdomme. Tværtimod findes der i dag bred indikation for anvendelse af mikrobiologiske metoder til diagnostik af sygdomstilstande, hvori mikroorganismer udgør en væsentlig ætiologisk faktor.

Mikrobiologiske metoder – fortid – nutid – fremtid

Allerede i et studie fra 1890 blev det konstateret, at kun en lille andel af de bakterier, der kunne erkendes i plakprøver ved brug af datidens mikroskoper, kunne dyrkes med daværende laboratorieteknikker (1). Således har det i mere end 100 år været kendt viden, at store dele af den orale mikroflora var vanskelig at dyrke. Den teknologiske udvikling indenfor mikrobiologiske metoder igennem det sidste århundrede har bekræftet denne antagelse og har ligeledes bekræftet, at den orale mikroflora er væsentlig

mere kompleks, end hvad der kunne konstateres baseret på resultater fra tidlige mikroskopi- og dyrkningsanalyser. Udviklingen i mikrobiologiske analysemetoder er præsenteret i Fig. 1, mens karakteristika ved udvalgte mikrobiologiske metoder er summeret i Tabel 1.

Tidlige mikrobiologiske identifikationsteknikker – mikroskopi og dyrkningsanalyse

I den første halvdel af det 20. århundrede foregik den teknologiske udvikling indenfor generel og oral mikrobiologi på tre forskellige områder: 1) brug af selektive og berigede medier til identifikation af kræsne bakterier, 2) udvikling af metoder til studie af anaerobe bakterier og, 3) forbedrede mikroskoper til detaljerede strukturelle studier af bakterielle komponenter. Identifikation af bakterier foregik således på denne tid primært ved at beskrive bakteriernes morfologiske karakteristika ved hjælp af mikroskopi. Udviklingen af selektive medier i kombination med anaerobe dyrkningsteknikker medførte identifikation af en række hidtil ukendte bakterielle medlemmer af den orale mikroflora, hvilket illustreres ved to studier fra 1982, som identificerede 190 og 171 forskellige orale bakterier i subgingivale plakprøver fra patienter med henholdsvis marginal parodontitis og gingivitis (4,5). Ligeledes blev elektronmikroskopi benyttet til at udføre detaljerede morfologiske analyser af formodede orale patogener og øgede således kendskabet til visse dyrkbare bakterier (6,7). Samlet set medførte den tekno-

Kronologisk udvikling af mikrobiologiske metoder fra kvalitative til kvantitative analyser

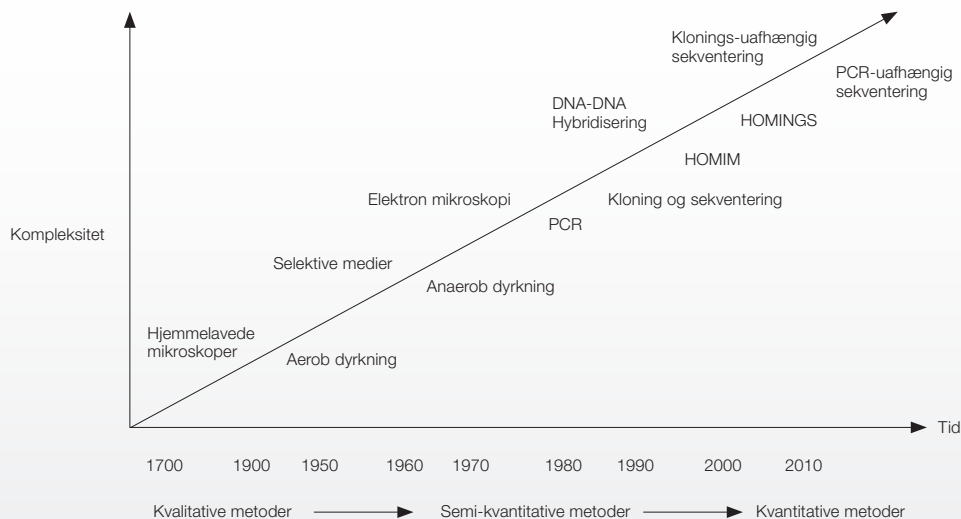


Fig. 1 Skematisk fremstilling af udviklingen af mikrobiologiske metoder. Udviklingen af avancerede molekulære metoder har medført en øget viden omkring den orale mikroflora og har muliggjort detaljerede kvantitative analyser af den orale mikroflora.

Fig. 1 Schematic presentation of the development of microbial methods. The development of sophisticated molecular methods has resulted in increased knowledge of the oral microbiota, and has enabled detailed quantitative analysis of the oral microbiota.

Karakteristika ved forskellige mikrobiologiske metoder

	Teknik	Tidsforbrug	Pris	Antal bakterier, der kan identificeres	Mulighed for identifikation af den ikke-dyrkbare andel af mikroflora	Mulighed for resistensbestemmelse
Mikroskopi og dyrkning	Dyrkning og mikroskopi	+++	+++	+	-	+
Kloning og sekventering	Kloningsafhængig sekventering	+++	+++	+	+	-
Checkerboard	DNA-DNA hybridisering	++	+	+	+	-
HOMIM	DNA-DNA hybridisering	++	+	++	+	-
Next generation sequencing	Kloningsuafhængig sekventering	+	++	+++	+	-
HOMINGS	Kloningsuafhængig sekventering	+	+	+++	+	-

Tabel 1. Sammenligning af mikrobiologiske metoder på baggrund af teknik, tidsforbrug, pris, antal bakterier, der kan identificeres, mulighed for identifikation af den ikke dyrkbare andel af mikroflora og mulighed for resistensbestemmelse. Til hver parameter er givet værdierne +, ++ og +++, hvor +++ indikerer den højeste værdi og + den laveste.

Table 1. Comparison of different microbial methods based on differences in technique, price, number of bacterial identifications, potential for identifying non-cultivable parts of the microbiota and potential for analysis bacterial resistance. Every parameter is compared based on levels +, ++ and +++, where +++ indicates the highest and + the lowest value.

logiske udvikling på det tidspunkt en øget viden omkring den dyrkbare andel af den orale mikroflora, og i den forbindelse blev biokemiske studier af visse bakterier benyttet til at afsøge deres potentielle rolle ved oral sundhed og sygdom, eksempelvis illustreret ved *Streptococcus mutans*' evne til at fermentere kulhydrater til metaboliske slutprodukter ved lavt pH i forbindelse med caries (8). Derimod var det fortsat ikke muligt at studere den ikke-dyrkbare andel af den orale mikroflora, mens kvantiteten af den undersøgte mikroflora bedst kunne beskrives som en procentuel fordeling af de identificerede bakterier. Den primære fordel ved dyrkningsmetoder, som stadig er gældende den dag i dag, er at man kan benytte disse til resistensbestemmelse af en given mikroflora. Resistensbestemmelse kan udføres ved to forskellige metoder: 1) Disc-metoden, hvor den undersøgte mikroflora udplades på en agarplade, hvorpå der er placeret flere discs med forskelligt indhold af antibiotikum. Resistensbestemmelse beskrives her ved hjælp af hæmningszonen af bakteriel vækst, som den enkelte disc resulterer i (Fig. 2). 2) E-test bruges til at bestemme Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for et givent isolat og udføres ved hjælp af en strimmel, som indeholder stigende koncentrationer af antibiotikum, der placeres på et vækstmedie. Den laveste koncentration, som frembringer komplet hæmning af bakteriel vækst, defineres som MIC. Resistensbestemmelse som led i dyrkning og mikroskopi finder således fortsat berettigelse som et led i den odontologiske diagnostik, specielt indenfor for det parodontologiske område, i forbindelse med behandlingsplanlægning ved brug af

Resistensbestemmelse ved hjælp af Disc-metoden



Fig. 2 Resistensbestemmelse ved hjælp af Disc-metoden illustreret ved forskellige forstørrelser. Varierende grad af resistens kan erkendes i relation til de forskellige typer antibiotikum.

Fig. 2 Susceptibility testing using the Disc method illustrated at different magnification. Varying degrees of resistance associated with different antibiotics can be recognised.

systemisk antibiotikum som del af konventionel parodontalbehandling af patienter med aggressiv parodontitis.

Molekylærbiologisk identifikation

Polymerase Chain Reaction

Polymerase chain reaction (PCR) er en molekylærbiologisk teknik, som bruges til at opformere og identificere en given DNA-sekvens af interesse (Fig. 3). PCR, der blev udviklet i begyndel-



Polymerase Chain Reaction (PCR)

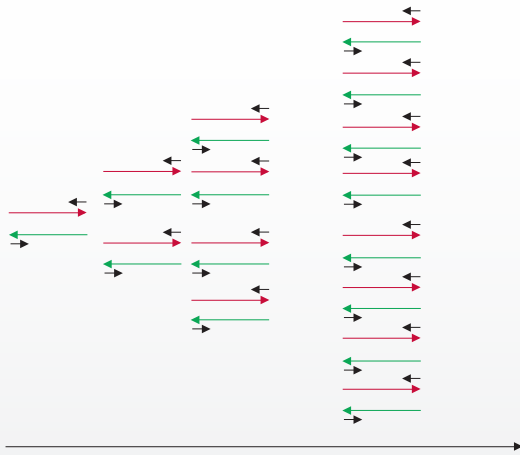


Fig. 3 Skematisk fremstilling af PCR-teknikken. Dobbeltstrengt DNA splittes, og fremadrettede og bagudrettede enkeltstrengede DNA-primere bindes til komplementært DNA. For hver PCR-cyklus fordobles mængden af DNA.

Fig. 3 Schematic presentation of the PCR technique. Breaking of double-DNA enables forward and reverse single-stranded DNA-primers to bind to complimentary DNA. In every PCR-circle the amount of DNA is doubled.

sen af 1980'erne, fungerer ved hjælp af primere (enkeltstrengt DNA), der binder komplementært til en kendt DNA-sekvens, og herefter opformerer denne ved hjælp af en syntetisk DNA-polymerase. Formålet med PCR er således at øge mængden af DNA i en prøve, som har interesse i en given sammenhæng, uden at mængden af eksempelvis humant DNA opformerer. Med tiden har PCR fundet rig udbredelse indenfor en række forskellige felter såsom retsmedicin, i fadderskabstest og ved screening for arvelige genetiske defekter. Indenfor oral mikrobiologi er forskellige typer PCR blevet benyttet til identifikation af orale bakterier, og sådanne teknikker finder fortsat anvendelse (9,10). Endnu vigtigere er det dog, at PCR-teknikken, via uspecifik opformering af bakterielt DNA, dannede grundlag for udvikling af klonings- og sekventeringsteknikken, der skabte muligheden for at studere den ikke-dyrkbare del af den orale mikroflora.

Kloning og sekventering af bakterielt

16S ribosomalt rRNA (16S rRNA)

I 1986 præsenteredes en ny og revolutionerende teknologi til bakteriell identifikation. Denne byggede på analyse af de gener, der koder for 16S ribosomalt RNA (16S rRNA), som blev vist at være phylogenetisk velbevarede, og sekvensen af disse kunne således benyttes til identifikation af levende organismer, herunder orale bakterier (11,12). I forlængelse heraf blev udviklet en hensigtsmæssig laboratorietechnik til analyse af 16S rRNA gener i komplekse prøver med mange forskellige bakteriearter, der blev kendt som "kloning og sekventering". Denne metode, som

KLINISK RELEVANS

Orale sygdomme, herunder marginal parodontitis og caries, er bakterielt inducerede multifaktorielle sygdomme, som formodes at udvikles som følge af en påvirkning af den homeostase, der normalt findes mellem værten og den permanente orale mikroflora. Udviklingen af moderne molekylærbiologiske metoder har muliggjort detaljerede studier af orale bakterier, herunder den andel af orale bakterier, der ikke kan

dyrkes i laboratoriet, og har således øget den eksisterende viden omkring den orale mikrofloras ætiologiske rolle ved orale sygdomme betragteligt. Det er derfor afgørende, at tandlægen har et indgående kendskab til moderne molekylærbiologiske metoder, da det i fremtiden må formodes, at mikrobiologisk diagnostik af patienter kan blive en integreret del af den moderne tandlægepraksis.

kunne benyttes rutinemæssigt til studier af både den dyrkbare og ikke-dyrkbare andel af en given mikroflora, består principielt af tre dele: 1) opformering af bakterielt DNA via universelle bakterielle primere ved hjælp af PCR, 2) inkorporering af bakterielt DNA (16S rRNA kodende DNA) i *Escherichia coli*-bakterier for yderligere opformering af bakterielt 16S rDNA og 3) sekventering af 16S rDNA via datidens sekventeringsmetoder (Sanger sekventering) (13). Denne metode blev benyttet i forskellige sammenhænge, herunder ved studier af mikrofloraen i subgingivale plakprøver (14). Introduktionen af 16S-baserede teknikker medførte hidtil ukendte muligheder for at studere ikke-dyrkbare medlemmer af den orale mikroflora, og baseret på et studie fra 2001 blev det foreslået, at den prædominante orale mikroflora udgjordes af mere end 500 forskellige orale bakteriearter (14). Samtidig demonstrerede et andet studie ved hjælp af 16S-baseret bakteriell identifikation store forskelle i den fundne mikroflora på forskellige orale lokalisationer (15). I takt med at nye 16S rDNA sekvenser blev identificeret, blev disse registreret i forskellige centrale databaser med henblik på at kunne bruges til bakteriell identifikation ved fremtidige undersøgelser. I dag findes samtlige kendte 16S rDNA-sekvenser for bakterier identificeret i mundhulen frit tilgængelige i Human Oral Microbiome Database (HOMD) databasen (16). Selvom kloning og sekventeringsmetoden havde åbenlyse fordele i forhold til tidligere mikrobiologiske metoder, var denne også forbundet med en række begrænsninger. Først og fremmest var den på baggrund af kloningsdelen meget tidskrævende og dyr at gennemføre. Derudover blev det klart, at det oftest ikke var muligt at identificere mere end de 50 mest dominante bakteriearter i en enkelt prøve ved hjælp af denne teknik (17). Derfor kunne denne metode ikke beskrive den sande diversitet i hver enkelt prøve, men det viste sig, at analyse af multiple prøver med samme oprindelse

kunne benyttes til at beskrive den samlede mikrobiologiske diversitet og kompleksitet i en given mikroflora (10).

DNA-DNA hybridisering – checkerboard

Udviklingen af sekventeringsmetoder gjorde det ligeledes muligt at sekventere fulde bakterielle genomer, og på den baggrund blev sekventering af det fulde genom af en række orale bakterier gennemført. Disse genomiske sekvenser dannede grundlag for udviklingen af en anden teknik til mikrobiologisk identifikation af orale bakterier, nemlig DNA-DNA checkerboard. Denne metode muliggjorde samtidig identifikation af 40 forskellige orale bakteriearter i 43 prøver via DNA-DNA hybridisering mellem enkeltstrengt bakterielt DNA og enkeltstrengede DNA-prober baseret på fulde genomsekvenser fra orale bakterier (18). DNA-DNA checkerboard var markant billigere og hurtigere at gennemføre i forhold til kloning og sekventering, hvorfor denne teknik hurtigt vandt indpas ved analyse af den orale mikroflora i forbindelse med sundhed og sygdom. I den forbindelse kan det nævnes, at det rigt citerede studie omkring farvekodede bakterielle kompleksers association til marginal parodontitis blev udført ved hjælp af DNA-DNA checkerboard-analyse (19). Den primære fordel ved DNA-DNA checkerboard i forhold til andre tidlige molekylærbioologiske teknikker var den lave pris og høje grad af reproducerbarhed, mens den væsentligste ulempe var, at metoden på forhånd var begrænset til analyse af de 40 bakterier, som teknikken kunne identificere. Der var således tale om en simplificering af den orale mikroflora, når denne blev undersøgt ved hjælp af DNA-DNA checkerboard (3,10).

Microarray-teknikker – Human Oral Microbe Identification Microarray (HOMIM)

En anden metode, der blev udviklet i 2008, var Human Oral Microbe Identification Microarray (HOMIM). HOMIM er en molekylær teknik, hvor orale bakterier identificeres ved hjælp af korte specifikke DNA-prober, der genkender bakterielt DNA svarende til 16S rDNA regionen. Identifikation sker via DNA-DNA hybridisering mellem enkeltstrengt bakterielt DNA i prøven og enkeltstrengede DNA-prober, der er specifikke for den enkelte orale bakterie (20,21). HOMIM er en microarray-baseret teknik, hvilket vil sige, at de DNA-prober, der bruges til bakteriell identifikation, er kovalent bundet til en glasplade. Således bindes bakterielt DNA til komplementære prober på en bestemt position på microarrayet, og den begrænsende faktor for, hvilke bakterier der kan identificeres ved hjælp af HOMIM, er antallet af DNA-prober, der er plads til på et enkelt microarray. Fordelen ved HOMIM i forhold til DNA-DNA checkerboard var, at HOMIM kunne identificere op imod 300 forskellige orale bakterier i den samme prøve sammenlignet med 40 forskellige bakterier ved DNA-DNA checkerboard. Denne teknik var derfor velegnet til analyse af lokale ændringer i mikrofloraen ved sundhed og sygdom (10). Den store ulempe ved HOMIM var manglen på kvantitative resultater. Derudover var det ikke muligt at identificere alle orale bakterier på speciesniveau på baggrund af de meget

korte sekvenser (18-20 baser), hvilket gjorde, at denne metode i nogle sammenhænge blev mere uspecifik end både kloning og sekventering og DNA-DNA checkerboard (10,20).

Kloningsuafhængig sekventering – next generation sequencing

Det næste store skridt i den teknologiske udvikling omkring molekylærbioologiske metoder kom i starten af det 21. århundrede, hvor de første studier omkring kloningsuafhængig sekventering (next generation sequencing) blev præsenteret (22). I årene 2008-2009 blev disse teknikker commercialiseret, og de kendes nu som 454 sekventering (pyrosekventering) (23), Illumina (17) og SOLID (17). Fordelen ved disse metoder var, at man nu kunne gennemføre sekvensanalyse uden behov for fortløbende kloning af bakterielt 16S rDNA, hvilket gør analyse via disse metoder hurtig og effektiv sammenlignet med tidligere sekvensanalyser. Sammenlignet med kloningsafhængige sekvensanalyser har det ligeledes vist sig, at det ved next-generation sequencing var muligt at udføre mere detaljerede beskrivelser af den samlede mikroflora. Generelt set viste analyser gennemført med disse metoder en hidtil ukendt diversitet i den orale mikroflora ved oral sundhed og sygdom og dokumenterede således igen, at vores viden omkring den orale mikroflora i det væsentlige begrænses af hastigheden for den teknologiske udvikling (1). De indledende begrænsninger ved kloningsuafhængig sekventering var, at disse teknikker var dyre at gennemføre og relativt følsomme for procedurefejl. Derudover genererede de første generationer af disse teknikker DNA-sekvenser af relativt kort længde (< 100 baser), hvilket umuliggjorde identifikation af en række orale bakterier på speciesniveau (17). Disse begrænsninger er i dag i det væsentlige overkommet, således at der kan genereres sekvenser af større længde (> 400 baser), hvilket gør, at størstedelen af orale bakterier nu kan identificeres på speciesniveau ved hjælp af disse teknikker (10).

Human Oral Microbe Identification using Next Generation Sequencing – HOMINGS

I 2014 blev en ny mikrobiologisk teknik, Human Oral Microbe Identification using Next Generation Sequencing (HOMINGS), præsenteret. HOMINGS, der er efterfølgeren til HOMIM, benytter next generation sequencing i kombination med 16S rDNA probe-sekvenser fra HOMIM microarrayet til simultan identifikation af op imod 500 orale bakterier i samme prøve. Fordelen ved HOMINGS er, at denne metode kan identificere et højt antal orale bakterier på speciesniveau til en meget lav pris sammenlignet med andre sekventeringsanalyser. Ulempen ved HOMINGS er, at man ved denne teknik udelukkende kan identificere de bakterier, som er inkluderet i HOMINGS analysen, hvilket gør, at information omkring hidtil ukendte orale bakterier muligvis går tabt (www.forsyth.org/HOMINGS).

PCR-uafhængig identifikation

Et fællestræk ved nyere molekylære metoder såsom next generation sequencing og HOMINGS er, at de er afhængige af, at bakterielt DNA fra det originale prøvemateriale opformerer via PCR.

Karakteristika ved forskellige medier til mikrobiologisk analyse

	Subgingivalt	Supragingivalt	Rodkanaler	Slimhinde	Saliva
Indikation for prøvetagning	Marginal parodontitis	Caries	Endodonti	Multiple	Multiple
Sværhedsgrad ved prøvetagning	+++	++	+++	++	+
Risiko for kontaminering	+++	+++	++	+++	+
Antal prøver	+++	+++	+	++	+
Pris	+++	+++	+	+	+

Tabel 2. Sammenligning af forskellige medier til mikrobiologisk analyse på baggrund af indikation for prøvetagning, sværhedsgrad ved prøvetagning, risiko for kontaminering, antal prøver, der skal indsamles, og pris. Til hver parameter er givet værdierne +, ++ og +++, hvor +++ indikerer den højeste værdi og + den laveste.

Table 2. Comparison of different media for microbial analysis based on indication for analysis, difficulty of sampling, risk of contamination, number of samples needed and cost of analysis. Every parameter is compared based on levels +, ++ and +++, where +++ indicates the highest and + the lowest value.

Dette skyldes, at det naturlige indhold af bakterielt DNA ofte er væsentligt lavere end detektionsgrænsen for disse metoder. PCR er en glimrende teknik, der på flere måder revolutionerede mulighederne for at studere genetisk materiale. På den anden side er PCR-teknikken forbundet med risiko for bias, idet det er vist, at DNA fra forskellige mikroorganismer udviser forskellig følsomhed overfor PCR-teknikker (10,24). Dette betyder i praksis, at mikrobiologisk analyse af bakterielt DNA fra en given mikroflora baseret på fortløbende PCR amplifikation ikke nødvendigvis er repræsentativ for mikrofloraen i den oprindelige prøve (24,25). I den forbindelse er det meget interessant, at der på nuværende tidspunkt er blevet introduceret første generation af PCR-ufælgelige sekventeringsmetoder (24,25), hvilket må formodes at blive fremtiden indenfor mikrobiologisk analyse.

Biologiske medier velegnet til mikrobiologisk analyse

Traditionelt er mikrobiologiske forhold ved lokale parodontitis- og carieslæsioner blevet undersøgt ved analyse af henholdsvis sub- og supragingivale plakprøver, og således har det ved studier af den orale mikroflora været lege artis at udføre separat analyse af multiple prøver fra lokale sygdomslæsioner fra samme individ (26). I den forbindelse er mikrofloraens sammensætning ved lokale parodontale læsioner demonstreret som værende forskellig fra mikrofloraen i raske pocher, først ved hjælp af dyrkningsstudier (1,2) og senere ved brug af molekylære metoder, herunder DNA-DNA hybridisering (19), kloning og sekventering (14), microarray-teknikker (20,27) og senest next generation sequencing (28-30). Den fundne mikroflora fra carieslæsioner er ligeledes blevet dokumenteret forskellig fra mikrofloraen i dental plak på sunde tandoverflader både ved dyrkningsstudier (2) samt ved brug af molekylære metoder (31,32). Endelig har mikrobiologiske prøver fra nekrotiske rodkanaler, ved apikal parodontitis, været benyttet til analyse af mikrofloraens sammensætning ved endodontiske problem-

stillinger (33,34). Samlet set er der nogenlunde overensstemmelse vedrørende den dyrkbare andel af den orale mikroflora, når data fra tidligere dyrkningsstudier sammenlignes med data fra studier, der har benyttet molekylærbiologiske metoder (10).

Hvis man skal overholde golden standard og udføre separat indsamling og analyse af mikrobiologiske prøver fra multiple sygdomslæsioner fra det samme individ, kan mikrobiologisk diagnostik blive en meget dyr og tidskrævende proces. Således må det formodes, at denne indgangsvinkel i det væsentlige kun kan efterleves i forbindelse med videnskabelige undersøgelser af den orale mikroflora ved oral sundhed og sygdom. Hvis mikrobiologiske metoder skal benyttes rutinemæssigt i klinikken, er der derimod behov for udvikling af teknikker, der nemt og billigt kan benyttes af tandlægen som supplement til den kliniske og radiologiske diagnostik. I denne sammenhæng kunne saliva-baserede mikrobiologiske metoder være en kandidat (35). I modsætning til supra- og subgingivale prøver er der ved analyse af saliva kun behov for indsamling og analyse af en enkelt prøve fra hvert individ (35). Ligeledes er indsamling af lokalt materiale (supragingival plak, subgingival plak, slimhindskrab) til mikrobiologisk analyse en teknisk vanskelig procedure, hvorfor sådanne prøver kun kan anbefales indsamlet af trænet personel. Til sammenligning kan saliva indsamles let, og dette kan således standardiseres og udføres af alle personalegrupper på klinikken (36) (Tabel 2). Samlet set synes der altså at være gode argumenter for, at saliva er en særdeles velegnet biologisk væske til rutinemæssig screening og risikovurdering af odontologiske patienter (37) (Tabel 3). I den forbindelse er det interessant, at mikrofloraen i saliva er vist at være forskellig hos patienter med marginal parodontitis (38,39) og caries (40-42) sammenlignet med oralt raske kontrolpersoner. Man kunne derfor forestille sig, at man i takt med en yderligere teknologisk udvikling ville kunne benytte screening af mikrofloraen i saliva til at identificere personer med øget risiko for at udvikle parodontitis og caries, før sygdommene kan erkendes klinisk. ➔

Fordele og ulemper ved brug af salivaprøver fremfor supra- og subgingivale plakprøver til mikrobiologisk diagnostik

Fordele ved brug af salivaprøver	Ulemper ved brug af salivaprøver
Ingen risiko for kontaminering	Manglende information omkring lokal mikroflora
Kun en prøve skal indsamles fra hver patient	Mangelfuld viden omkring ideelle forhold for standardiseret indsamling og analyse
Kan indsamles af alle personalegrupper på klinikken	Sparsom viden omkring, hvordan mikrofloraen i saliva påvirkes af vaner og livsstil
Patienten kan teoretisk selv indsamle prøven	
Ideelt til identifikation af biomarkører	

Tabel 3. Liste over de vigtigste fordele og ulemper ved at bruge salivaprøver fremfor supra- og subgingivale plakprøver til mikrobiologisk diagnostik.

Table 3. List of the major advantages and disadvantages of using saliva samples instead of supra- and subgingival plaque samples for microbial analysis.

Fremtidsperspektiver

Udviklingen af stadigt mere avancerede molekylærbiologiske metoder har medført muligheden for at udføre detaljerede studier af det orale mikrobiom, herunder hvorledes sammensætningen af den orale mikroflora lokalt ændres i relation til oral sundhed og sygdom. Ligeledes har udviklingen af DNA-baserede metoder gjort det muligt at studere den ikke-dyrkbare andel af den orale mikroflora. På denne baggrund er mere end 700 forskellige bakteriearter blevet identificeret i mundhulen, og der kommer løbende flere til (14,43). Samlet set har den teknologiske udvikling udvidet vores viden omkring mikrofloraens ætiologiske rolle ved marginal parodontitis og caries, og på baggrund af denne viden opfattes disse sygdomme at udvikles som følge af en dysbiose mellem værten og dennes mikroflora snarere end lokal tilstedeværelse af specifikke formodede patogene bakterier (44-46). Interessant i denne sammenhæng er det, at nyere sekventeringsmetoder har muliggjort analyse af bakterielt messenger RNA (mRNA) i mikrobiologiske prøver (transcriptomics). Dette gør, at man ved disse teknikker kan få et indblik i bakteriernes metaboliske tilstand og dermed en idé om, hvilke gener de udtrykker ved sundhed og sygdom. Det er derfor nærliggende at tro på, at fremtidig molekylærbiologisk diagnostik ikke vil begrænses til identifikation af bakterier, men tilmed også adressere ændringer i bakteriernes metaboliske aktivitet.

ABSTRACT (ENGLISH)**Microbiological diagnostics for oral infections now and in the future**

The oral cavity is an open microbial ecosystem that is continuously influenced by physical, chemical and thermally-derived factors of external origin. The oral microbiome is highly complex and is primarily constituted of bacteria, although virus,

Paradoksalt nok har den markante teknologiske udvikling tilsyneladende skabt en større afstand mellem teoretiske videnskabelige mikrobiologiske analyser og den kliniske brug af mikrobiologisk diagnostik. Den teoretiske mikrobiologi udføres med tiltagende dyre og avancerede metoder, der genererer kolossale mængder data, hvilket gør det svært at applicere sådanne metoder til den praktiserende tandlæges hverdag. Der er således behov for fremtidigt fokus på at udvikle simple og billige mikrobiologiske metoder, der drager nytte af den teknologiske udvikling, men som samtidig er velegnede til daglig brug i tandlægepraksis til risikovurdering for udvikling af marginal parodontitis og caries, før disse sygdomstilstande kan erkendes ved klinisk diagnostik. Tandlægen indtager en unik rolle i sundhedssystemet, da størstedelen af den voksne befolkning besøger tandlægen flere gange årligt, også selvom de føler sig oralt og systemisk raske. Dette giver tandlægen en unik mulighed for at screene patienter for tilstedeværelsen af udiagnosticerede systemiske sygdomme. Det er derfor nærliggende at spekulere i, om en fortsat teknologisk udvikling vil medføre, at tandlægen i fremtiden vil kunne udføre simpel screening i forbindelse med risikovurdering af orale og systemiske sygdomme. Dette kunne under gavnlige omstændigheder resultere i, at risikoindivider identificeres tidligt, således at relevant præventiv behandling kan iværksættes tidligt i et sygdomsforløb.

protozoa, yeast and archaea may represent minor proportions of the oral microbiome. The development of molecular methods primarily based on analysis of the phylogenetically informative 16S ribosomal RNA (16S rRNA) genes have demonstrated that the oral microbiome is far more complex and diverse, than hitherto anticipated based on result from early

culture studies. Thus, it has been shown that the oral microbiota is comprised by more than 700 predominant species, out of which approximately 100–200 species may be isolated from a single subject. At present, 35% of the oral microbiota has yet to be cultivated in the laboratory. The resident oral microbiota is believed to be critically involved in maintenance of oral homeostasis, whereas local compositional alterations

as a consequence of ecological perturbations are suggested as determinants of development of periodontitis and dental caries. The purpose of this review is to address modern molecular methods for analysis of oral bacteria, and to discuss a future perspective for development of molecular techniques that can be used chair-side for risk assessment of disease-prone individuals in the dental clinic.

Litteratur

- Wade WG. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *J Clin Periodontol* 2011;38 (Supp 11):7-16.
- Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res* 2013;69:137-43.
- Paster BJ, Dewhirst FE. Molecular microbial diagnosis. *Periodontol* 2000 2009;51:38-44.
- Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM et al. Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect Immun* 1982;38:1137-48.
- Moore WE, Holdeman LV, Smibert RM et al. Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect Immun* 1982;38:651-67.
- Listgarten MA, Socransky SS. Electron microscopy as an aid in the taxonomic differentiation of oral spirochetes. *Arch Oral Biol* 1965;10:127-38.
- Listgarten MA, Socransky SS. Electron microscopy of axial fibrils, outer envelope, and cell division of certain oral spirochetes. *J Bacteriol* 1964;88:1087-103.
- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50:353-80.
- Umeda M, Contreras A, Chen C et al. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 1998;69:828-33.
- Teles R, Teles F, Frias-Lopez J et al. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol* 2000 2013;62:95-162.
- Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987;51:221-71.
- Pace NR, Olsen GJ, Woese CR. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell* 1986;45:325-6.
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 1990;345:60-3.
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001;183:3770-83.
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN et al. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005;43:5721-32.
- Chen T, Yu WH, Izard J et al. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)* 2010;2010:baq013.
- Ansoorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol* 2009;25:195-203.
- Socransky SS, Smith C, Martin L et al. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17:788-92.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-44.
- Colombo AP, Boches SK, Cotton SL et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2009;80:1421-32.
- Preza D, Olsen I, Willumsen T et al. Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:509-17.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005;437:376-80.
- Rothberg JM, Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing. *Nat Biotechnol* 2008;26:1117-24.
- Lasken RS. Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:631-40.
- Lasken RS, McLean JS. Recent advances in genomic DNA sequencing of microbial species from single cells. *Nat Rev Genet* 2014;15:577-84.
- Teles RP, Patel M, Socransky SS et al. Disease progression in periodontally healthy and maintenance subjects. *J Periodontol* 2008;79:784-94.
- Heller D, Silva-Boghossian CM, do Souto RM et al. Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 2012;57:973-80.
- Ge X, Rodriguez R, Trinh M et al. Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. *PLoS One* 2013;8:e65520.
- Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J* 2012;6:1176-85.
- Liu B, Faller LL, Klitgord N et al. Deep sequencing of the oral microbiome reveals signatures of periodontal disease. *PLoS One* 2012;7:e37919.
- Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR et al. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One* 2012;7:e47722.
- Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol* 2010;48:4121-8.
- Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res* 2009;88:969-81.
- Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Rocas IN et al. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:275-81.
- Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ et al. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:781-91.
- Giannobile WV, Beikler T, Kinney JS et al. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. *Periodontol* 2010;50:52-64.
- Miller CS, Foley JD, Bailey AL et al. Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med* 2010;4:171-89.
- Belstrøm D, Fiehn NE, Nielsen CH. Differences in bacterial saliva profile between periodontitis patients and a control cohort. *J Clin Periodontol* 2014;41:104-12.
- Paju S, Pussinen PJ, Suominen-Taipale L et al. Detection of multiple pathogenic species in saliva is associated with periodontal infection in adults. *J Clin Microbiol* 2009;47:235-8.
- Belstrøm D, Fiehn NE, Nielsen CH et al. Altered Bacterial Profiles in Saliva from Adults with Caries Lesions: A Case-Cohort Study. *Caries Res* 2014;48:368-75.
- Crielaard W, Zaura E, Schuller AA et al. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med Genomics* 2011;4:22.
- Yang F, Zeng X, Ning K et al. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J* 2012;6:1-10.
- Dewhirst FE, Chen T, Izard J et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 2010;192:5002-17.
- Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* 2005;13:589-95.
- Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149(Pt 2):279-94.
- Marsh PD. Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am* 2010;54:441-54.