

**Masteroppgave 8.- 10. semester**

**KAN PERIODONTITT VÆRE  
SMITTSOMT?**

- En litteraturstudie

*Odontologistudenter Timothy John Aprieto H-07*

*Hannah Stapnes Elvestad H-07*

*Veileder: Professor Hans Ragnar Preus*

**INNHALDSFORTEGNELSE**

1.0 Innledning.....	s. 4
2.0 Periodontitt.....	s. 5
2.1 Klassifisering av periodontale sykdommer.....	s. 5
2.2 Forskjellige lesjoner.....	s. 5
2.3 Infeksjonshypoteser.....	s. 6
2.3.1 Den ikke-spesifikke infeksjonshypotesen.....	s. 6
2.3.2 Den spesifikke infeksjonshypotesen.....	s. 6
2.3.3 Den økologiske infeksjonshypotesen.....	s. 6
2.3.4 Hypotesen om en superinfeksjon.....	s. 7
2.4 Periodontale patogener.....	s. 7
2.4.1 A. actinomycetemcomitans.....	s. 8
2.4.2 P. gingivalis.....	s. 9
2.4.3 T. forsythia.....	s. 9
2.4.4 Spirocheter.....	s. 9
2.4.5 P. intermedia/P.nigrescens.....	s. 10
2.4.6 F. nucleatum.....	s. 10
2.5 Mikrobielle virulensfaktorer.....	s. 11
2.6 Modifiserende faktorer.....	s. 12
2.6.1 Arv.....	s. 13
2.6.2 Mikroorganismer.....	s. 13
2.6.3 Stress.....	s. 13
2.6.4 Uvaner.....	s. 13
2.6.5 Diabetes mellitus.....	s. 13
2.6.6 Plakk kontroll.....	s. 13
2.6.7 Sosioøkonomisk status.....	s. 14
2.6.8 Medikamenter.....	s. 14
3.0 Infeksjon.....	s. 15
3.1 Unike egenskaper ved periodontale infeksjoner.....	s. 16
4.0 Smitte.....	s. 17
4.1 Eksempler på smittsomme sykdommer.....	s. 17
5.0 Transmisjon.....	s. 18
5.1 Intraoral transmisjon.....	s. 19
5.2 Intrafamiliær transmisjon.....	s. 19

5.2.1	Intrafamiliær transmisjon av sort-pigmenterte periodontale patogener.....	s. 20
5.2.2	Transmisjon av <i>A. actinomycetemcomitans</i> i familier med lokalisert juvenil periodontitt.....	s. 21
5.2.3	Sannsynlighet for transmisjon av <i>A. actinomycetemcomitans</i> og <i>P. gingivalis</i> i familier med periodontitt.....	s. 21
6.0	Molekylærgentiske metoder.....	s. 22
6.1	Biofilm.....	s. 22
6.1.1	Definisjon.....	s. 22
6.1.2	Karakteristika.....	s. 22
6.1.3	Bestemmelse av mikrofloraen.....	s. 23
6.1.3.1	Prøvetaking av orale bakterier.....	s. 23
6.2	Metoder.....	s. 24
6.2.1	Dyrkning av orale bakterier.....	s. 24
6.2.2	Mørkefeltmikroskopi.....	s. 26
6.2.3	Molekylære teknikker.....	s. 26
6.2.3.1	Bakterielyse.....	s. 26
6.2.3.2	Gel elektroforese og Southern blotting.....	s. 27
6.2.4	Restriksjonsanalyse.....	s. 28
6.2.5	DNA-DNA hybridisering.....	s. 28
6.2.6	Checkerboard-teknikk.....	s. 29
6.2.7	Polymerase chain reaction (PCR).....	s. 29
6.2.8	Random primer PCR.....	s. 32
6.3	Evaluering av metoder.....	s. 32
7.0	Forutsetninger.....	s. 35
	Referanser.....	s. 36

## **1.0 INNLEDNING**

Patogenesen av periodontal sykdom avhenger av vertens immunsystem og bakterienes virulens. Funksjonen til vertens immunsystem er genetisk betinget. Bakterier har forskjellige mekanismer for vevsødeleggelse som for eksempel aktivering av destruktive elementer i immunsystemet eller ved andre direkte egne virulensfaktorer.<sup>(1)</sup> Bakterier overføres mellom mennesker i forskjellige (livs)situasjoner. Denne overføringen er årsaken til etablering av en endogen bakterieflora, men også en årsak til smitte.

Sannsynligheten for transmisjon mellom individer er spesielt større for individer som omgås oftere. Praktisk sett finnes slike forhold hos familier, for eksempel mellom ektefeller eller foreldre til barn. Det har blitt utført studier som undersøker nettopp dette, og det har blitt vist at bakterier faktisk overføres mellom individer innenfor familien.

I denne oppgaven skal vi belyse transmisjonen av periodontale mikroorganismer mellom individer, og hvorvidt dette kan føre til sykdom. Transmisjon som en mulig etiologisk faktor for periodontal sykdom skal bli undersøkt.

Målet med denne oppgaven er for oss å bestemme om periodontitt kan regnes som en smittsom sykdom i den forstand at bakterier overføres mellom personer, og forårsaker sykdom. Dette skal vi finne ut ved å definere smitte, infeksjon, og periodontitt, samtidig som vi skal se på undersøkelsesmetodene for transmisjon mellom individer. Deretter skal vi ut ifra definisjonen vi har av smitte og infeksjon, se om vi kan regne periodontitt som en smittsom sykdom.

## **2.0 PERIODONTITT**

Periodontitt er en inflammasjon i periodontalt vev med feste- og bentap som følge. Den blir ofte induert av bakterielt plakk. Inflammasjonen kan sees både klinisk og mikroskopisk.<sup>(1)</sup> Klinisk tegn på sykdom er blødning ved sondering, økte lommedybder, mobilitet av tenner og furkasjonsinvolvement. Bentapet er også synlig på røntgen.

Inflammasjonen er ment å beskytte mot bakterier, men kroppens forsvarsmekanismer kan også skade naboceller og bindevevsceller. De involverte bakteriene varierer i de forskjellige stadiene av sykdommen. Videre bidrar forskjellige mikroorganismer til sykdommen. Ikke alle behøver å være patogene, men noen kan for eksempel bidra til vekst av andre patogene bakterier.<sup>(1)</sup>

Gingival inflammasjon kjennetegnes histologisk ved vasodilatasjon og økt karpermeabilitet som fører til eksudasjon av væsker og proteiner til vevet. Dette gir ødem og hevelse. Inflammasjonsceller forlater blodkarene og akkumulerer seg i bindevevet. Når infiltratet vokser, kommer plasmaceller til å dominere, og kollagenedbrytningen blir betydelig.<sup>(1)</sup>

## **2.1 KLASSIFISERING AV PERIODONTALE SYKDOMMER**

Periodontale sykdommer blir klassifisert ifølge "Workshop on Classification of Periodontal Diseases" fra 1999 slik.<sup>(2)</sup>

- Gingivale sykdommer
- Kronisk periodontitt, generell/lokalisert
- Aggressiv periodontitt, generell/lokalisert
- Periodontitt som manifestasjon av systemiske sykdommer
- Nekrotiserende periodontale sykdommer
- Abscesser i periodontiet
- Periodontitt assosiert med endodontiske lesjoner
- Utviklings- eller tilførte deformiteter og tilstander

## **2.2 FORSKJELLIGE LESJONER**

Periodontal sykdom kan deles inn i forskjellige lesjoner, etter graden av alvorlighet: initial, tidlig, etablert og avansert lesjon. Alle lesjonene kjennetegnes ved vasodilatasjon, økt karpermeabilitet, eksudasjon av proteiner og migrasjon av inflammasjonsceller. De varierer derimot med stigende grad. Det er også forskjell på hvilke celler som dominerer i de forskjellige lesjonene. Man må derimot merke seg at det bare er i den avanserte lesjonen det både blir feste- og bentap. Da har inflammasjonen spredt seg fra gingivalt vev til periodontalt vev.<sup>(1)</sup>

## **2.3 INFEKSJONSHYPOTESER**

Det finnes flere infeksjonshypoteser som prøver å beskrive infeksjonens natur. Disse er omtalt som den spesifikke, non-spesifikke og økologiske infeksjonshypotesen. I tillegg føyer vi til en hypotese om en superinfeksjon, som forklares nedenfor.

### **2.3.1 Den non-spesifikke infeksjonshypotesen**

Dette er en infeksjon i periodontiet der bakterier organiserer seg i en biofilm på tennenes overflate. Et annet, og klinisk ord for denne biofilmen er plakk. Bakterier i plakk har evnen til å produsere forskjellige irritanter som for eksempel syrer, endotoksiner og antigener. Disse kan i sin tur stimulere til en inflammatorisk reaksjon.

I begynnelsen skilte man ikke mellom de forskjellige bakteriene, og man så ikke på variasjonen i bakterieflora i friske og syke områder. Individuer syntes å være syke enten på grunn av dårlig immunforsvar eller dårlig hygiene. Akkumulasjon av bakterier enten ved eller under gingivalranden ville føre til inflammasjon på stedet, og inflammasjonen til vevsdestruksjon. Det var ikke hvilke typer bakterier som var i fokus, men mengden av bakterier i de aktuelle områdene. Man trodde at mengden bakterier var proporsjonalt med graden av sykdommen.

Ut ifra denne hypotesen kan sannsynligheten for å gi infeksjon være større enn for de andre hypotesene, siden den ikke tar hensyn til type bakterier.

### **2.3.2 Den spesifikke infeksjonshypotesen**

Denne hypotesen sier det motsatte av den ovenfor. Spesielle, spesifikke bakterier bidrar til sykdom, og eliminering av disse fører til oral helse. Denne hypotesen blir begrunnet med at ikke alle gingivitter utvikler seg til periodontitt, og at de fleste periodontale stedene ikke viser tegn til inflammasjon selv om disse stedene er koloniserte med en variasjon av bakterier. Studier viste i tillegg at det finnes en økt risiko for periodontal sykdom der det er et økt antall av bestemte patogene bakterier.

I dette tilfelle må det være en eller flere spesielt patogen(e) bakterie(r) som overføres for å forårsake infeksjon. Dermed vil risikoen for infeksjon være litt mindre enn tilfellet ovenfor.

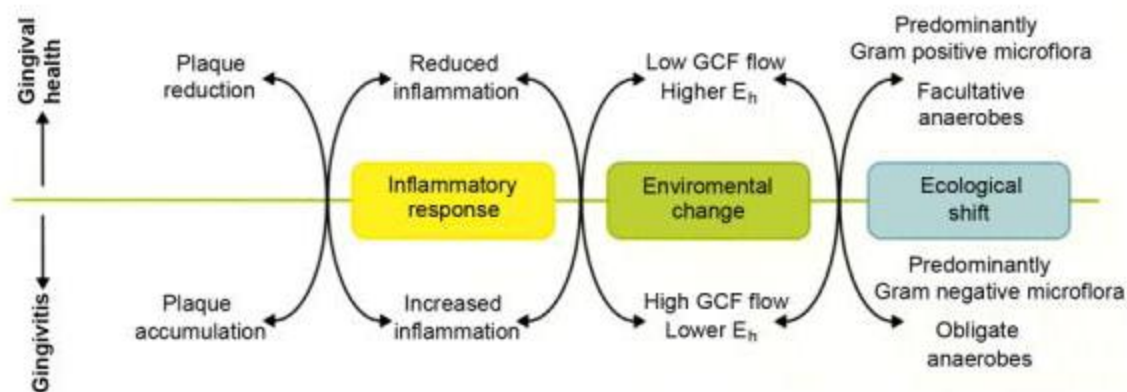
### **2.3.3 Den økologiske infeksjonshypotesen**

Denne går ut på at bakteriefloraen både med hensyn til fordelingen og forekomsten av forskjellige mikrobielle arter, avhenger av miljøet. Det finnes en direkte sammenheng mellom miljøet og balansen i mikrofloraen. Hvis balansen i mikrofloraen brytes kan det gå mot en mer patogen sammensetning av bakterier, som da kan føre til sykdom. Denne hypotesen viser gjennom en økologisk modell at plakk fører til inflammasjon. Det gir økt strøm av gingivalvæske, det vil si at miljøet blir forandret. Bakteriefloaraen blir dermed også forandret – fra Gram-positive bakterier hos friske til Gram-negative bakterier hos personer med periodontal sykdom.

En viss balanse i bakterieflora må til for å føre til sykdom. Denne sammensetning vil være mer avhengig av verten enn selve overføringen.

### 2.3.4 Hypotese om en superinfeksjon

Man kan definere en superinfeksjon ved at vi har med en spesifikk infeksjon å gjøre, det vil si infeksjonen har de samme egenskapene som ved den spesifikke infeksjonshypotesen, men at i dette tilfellet er det ikke primærinfeksjonen som fører til sykdom, men den sekundære. Hvis vi ser for oss en vert som får infeksjon av noen bakterier, men ikke får sykdom, og når man da senere blir infisert av andre typer bakterier, og sykdom forekommer. Den primære infeksjonen kan derimot bidra til den sekundære, og de kan derfor også stå sammen, og bidra til sykdommen.



Figur 1 viser den økologiske modellen for periodontal sykdom.

## 2.4 PERIODONTALE PATOGENER

The World Workshop of Periodontology slo fast i 1996 at *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* og *T. forsythia* er periodontale patogener.<sup>(4)</sup> Disse omtales som del av "det røde komplekset"<sup>(34)</sup> som består av tre bakterier, nemlig: *P. gingivalis*, *T. forsythia* og *T. denticola*.

Man har funnet ut at typen periodontal sykdom avhenger av hvilke type bakterier som er tilstede. *A. actinomycetemcomitans* er for eksempel ofte assosiert med aggressiv periodontitt. "Det røde komplekset" finnes oftere hos dem som har kronisk marginal periodontitt, når lesjonen har kommet forbi den etablerte lesjonen og går mot den avanserte lesjonen. Det vil si at biofilmen har vandret mer i apikal retning, og dermed får man en mikroflora bestående for det meste av anaerobe bakterier.

Både *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* er vist å kunne overføres mellom personer; forskjellen er bare tidspunktet de blir overført på. Den førstnevnte etablerer seg hos et barn mellom 5 og 7 år, mens den andre koloniserer munnhulen hovedsaklig bare etter puberteten, og bare ved periodontal sykdom etter det.<sup>(25)</sup> Dette kan være en sannhet, men kan også skyldes at bakterien er til stede i så liten grad at den ikke kan oppdages med dagens metoder.

Ved hjelp av en BANA-test kan man finne bakterier som har et trypsin-lignende enzym. Eksempler på slike bakterier er "det røde komplekset" dvs. *P. gingivalis*, *T. denticola*, og *T. forsythia*. En studie viser at 56 % av 157 barn testet positivt på BANA-testen. Det indikerer at disse barna hadde minst en av bakteriene i "det røde komplekset". Videre har man funnet at barn med foreldre som hadde BANA-positive bakterier, hadde nesten 10 ganger større sjanse for å bli kolonisert av BANA-positive bakterier enn barn med foreldre som var BANA-test-negative.<sup>(30)</sup>

I motsetning til kariogene bakterier er periodontale bakterier proteolytiske. Nedbrytningen av proteiner fører da til et mer basisk miljø som favoriserer vekst av andre patogener og da særlig Gram-negative anaerobes.<sup>(32)</sup> Dermed er muligheten for etablering av infeksjon større når et passende miljø er tilstede.

Arter i "de gule, grønne og lilla kompleksene"<sup>(34)</sup> finnes vanligvis hos friske personer. Man kan si at de er "vertskompatible". Det oransje komplekset kan man finne i dype lommer. Tilstedeværelsen av dette komplekset synes å gi grunnlag for vekst av det røde komplekset (se økologisk infeksjonshypotese). Kronisk marginal periodontitt er et resultat av en blanding av bakterier som interagerer med hverandre. Det er forskjell på bakteriesammensetningen i en lomme hos en frisk person og en lomme hos en person med gingivitt eller periodontitt. Den mest sannsynlige forandringen i miljøet hos verten er økt inflammatorisk respons. Dette gir økt strøm av gingivalvæske som gir grunnlag for vekst av asakkarolytisk (periodontale bakterier som ikke bruker karbohydrater til sin metabolisme), anaerobe bakterier. Dette medfører bedre vekstforhold for andre periodontale patogener f eks det røde komplekset.<sup>(32)</sup>

#### 2.4.1 A. actinomycetemcomitans

Er en Gram-negativ stav som danner små kolonier med en stjerneformet kjerne på TSBV (agar). Bakteriens rolle i periodontal sykdom ble funnet da man fant større mengder av bakterien i lesjoner med lokal aggressiv periodontitt hos unge (tidligere kalt Lokalisert Juvenil Periodontitt)<sup>(33)</sup>. Bakterien invaderer epitel- og vaskulære endotelceller in vitro og bukkale epitelceller in vivo. Denne arten har en evne til å skille ut potensielt ødeleggende metabolitter som inkluderer en leukotoksin og en celle-drepende toksin. Studier har også vist at bakterien induserer apoptose. Bakterien har blitt funnet i lesjoner som er i utvikling.<sup>(62)</sup>

Bakterien regnes som eksogen da den sjeldnere finnes hos friske personer. Den er grundig dokumentert i transmisjonsstudier. Videre fører en bakterieinfeksjon av denne arten til en omfattende vertsrespons.<sup>(13)</sup> Selv om bakterien er assosiert med lokal aggressiv periodontitt hos unge voksne, så er prevalensen i befolkningen ikke høy.<sup>(13)</sup>

#### 2.4.2 P. gingivalis

Er en Gram-negativ, anaerob stav som tilhører gruppen sort-pigmenterte bakteroider. Organismer i denne gruppen danner brune og svarte kolonier på blodagar. Disse har i tillegg blitt assosiert med periodontale sykdommer fra tidlig i 1920-tallet. Denne gruppen av bakterier ble tidlig oppdaget på grunn av tilstedeværelse i blandede infeksjoner<sup>(63)</sup>, og at de



produserte en rekke virulensfaktorer som kollagenase, proteaser, hemolysiner, endotoksiner og fettsyrer. Bakterien har også evnen til å invadere epitelceller in vitro. *P. gingivalis* ble funnet mindre i friske steder eller steder med bare gingivitt enn i mer destruktive lesjoner.<sup>(64)</sup>

Som *A. actinomycetemcomitans* regnes *P. gingivalis* som en eksogen bakterie av de samme grunnene som ble nevnt ovenfor.<sup>(13)</sup> Både *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* har evnen til å invadere periodontale steder ved å binde seg til epitelceller, andre mikroorganismer eller tannoverflaten. Deretter klarer de å konkurrere mot de eksisterende mikroorganismene, og til slutt unngå både det cellulære og humorale vertsresponsen. Etter dette skiller de ut toksiner og enzymer som enten er vevsødeleggende eller som induserer immunopatologiske reaksjoner.<sup>(13)</sup>

Bakterien finnes mer av i periodontale lesjoner enn hos friske eller steder med gingivitt. Det er høyere verdier av bakterien i lesjoner som er i utvikling. Her fører også eliminering av bakterien til behandlingssuksess og oral helse.<sup>(65)</sup>

#### 2.4.3 *T. forsythia*

Er en Gram-negativ, anaerob, pleomorf stav som tilhører fusiforme bakteroider. Bakterien er vanskelig å dyrke på kunstige medier, og det kan ta opptil 7-14 dager før de danner små kolonier. Den ble ofte funnet i subgingivale lesjoner. Studier har vist at høyere verdier av bakterien er assosiert med dypere lommer. Bakterien synes å finnes generelt mer i periodontale lesjoner enn hos friske.<sup>(66)</sup> Det er også eleverte verdier av bakterien i periodontale abscesser. Dens tilstedeværelse gir destruksjon av alveolært bein, og fører til tann- og festetap. Eliminering av bakterien gir behandlingssuksess og oral helse.<sup>(67)</sup>

*T. forsythia* har evnen til å invadere epitelceller både in vitro og in vivo. Eksempler på virulensfaktorer som denne bakterien har er endotoksin, fettsyre- og metylglyoksalproduksjon. Videre kan bakterien indusere apoptose, samt cytokinproduksjon av forskjellige vertsceller.<sup>(68)</sup>

#### 2.4.4 Spirocheter

Er Gram-negative, anaerobe, heliksformede mikroorganismer som vanligvis finnes i periodontale lommer. Det er antatt at spirocheter er den klare etiologiske faktoren til akutt, nekrotiserende periodontal sykdom, ved undersøkelse av biopsier fra affiserte områder. Deres rolle i forbindelse med andre periodontale sykdommer er ennå uklart. Videre har det blitt vist at de finnes mer i dype lommer enn i områder med bare gingivitt eller friske lommer.<sup>(69,70)</sup>

Disse organismene er ofte lokalisert ved epitel, og dermed kan det tenkes at disse adhererer til epitelet, og senere kan invadere omkringliggende vev.<sup>(69,70)</sup> Spirocheter produserer en rekke potensielle virulensfaktorer blant annet dentilisin, som er et enzym som affiserer et vidt spekter med proteinsubstrater som fibronektin, laminin og fibrinogen<sup>(71)</sup>. Man antar at disse artene også forlenger tilhelingstiden hos pasienter etter systematisk periodontittbehandling.<sup>(72)</sup>

Det har vært vanskeligheter med å finne ut mer om spirocheter først og fremst på grunn av at det er rett og slett vanskelig, til og med umulig, å dyrke dem på kunstige medier. Det finnes ca. 10 arter som har blitt dyrket.<sup>(72)</sup>

*T. denticola* er ett eksempel og er ett av medlemmene i "det røde komplekset". Det viser seg at denne arten finnes mer i subgingival enn supragingival plakk. Arten forekommer også oftere hos pasienter med alvorlig periodontitt enn hos dem som er friske.<sup>(73)</sup>

Vellykket behandling, med klinisk frisk gingiva, gir derimot et redusert antall av spirocheter. Denne reduksjonen er ganske konsistent at man bruker det som et mål på om pasienter har fulgt antibiotikaregimet de har blitt tildelt.<sup>(74)</sup>

#### 2.4.5 *P. intermedia*/*P. nigrescens*

*P. intermedia* er en også en "black-pigmented bacteroidesart". Den er en Gram-negativ, kort, anaerob stav som forekommer i høyere nivåer hos dem med akutt, nekrotiserende ulcerativ gingivitt og i områder med utviklende kronisk periodontitt<sup>(75,76)</sup>. Isolater av *P. intermedia* har vist seg å indusere bentap hos forsøksrotter.<sup>(77)</sup>

Antibiotikabehandling blant annet med amoxicillin og metronidazole har gitt et redusert antall av *P. intermedia*. Dette sammen med mekanisk rensing gir et generelt redusert antall av periodontale patogener.<sup>(78)</sup>

*P. intermedia* har en rekke av de samme virulensfaktorer som *P. gingivalis* som blant annet gir økt utskillelse av MMP-8 og MMP-9 i gingivale lommer, og MMP-9 i plasma.<sup>(79)</sup> Disse matriksmetalloproteiner har som ansvar å remodellere og degradere matriks komponenter i periodontiet.

*P. nigrescens* er også en sort-pigmentert anaerob bakterie som i noen tilfeller har blitt funnet i den friske lommen. Den tilhører det oransje komplekset.<sup>(32)</sup>

#### 2.4.6 *F. nucleatum*

Er en Gram-negativ, anaerob stav som har blitt anerkjent som en del av den subgingivale mikrobiotaen i over 100 år<sup>(80)</sup>. Denne bakterien er prevalent hos pasienter med periodontitt<sup>(81)</sup> og blir også assosiert med periodontale abscesser<sup>(82)</sup>. Prevalensen går derimot ned etter en klinisk vellykket periodontalbehandling<sup>(83)</sup>. Man prøver å finne bakteriens rolle i periodontal sykdom ved å se på de forskjellige underartene av bakterien, i forhold til sykdomsstatus og sykdomsprogresjon.

Det har blitt funnet høyere verdier av lipopolysakkarid (LPS) fra *F. nucleatum* hos dem med periodontitt sammenlignet med friske<sup>(84)</sup>. Tilstedeværelse av bakterien gir økt sekresjon av IL-8 fra epitelceller og invasjon av gingivale epitelceller. Denne arten kan også indusere apoptose hos mono- og polymorfonukleære celler<sup>(85)</sup>. Videre har bakterien evnen til å skille ut en serin protease. Andre effekter forårsaket av bakterien er økt cytokin-, elastase- og oksygenradikalfrigjøring fra leukocytter. Bakteriens viktigste rolle i det subgingivale

Økssystemet er dens funksjon som en "bro" som muliggjør koaggregering av forskjellige bakteriearter.

## **2.5 MIKROBIELLE VIRULENSFAKTORER**

For at periodontale patogener skal kunne gi sykdom, er det essensielt at de er i stand til: <sup>(8)</sup>

- Å kolonisere det subgingivale området
- Å produsere faktorer som direkte gir skade hos verten, eller får verten til å skade vevet selv

For at de skal kunne kolonisere subgingivale områder, må de kunne: <sup>(8)</sup>

- Feste seg til en eller flere tilgjengelige overflater
- Reproducere seg
- Konkurrere mot andre arter
- Forsvare seg mot vertens forsvarmekanismer

Følgende er mikrobielle virulensfaktorer som brukes for bakterienes overlevelse hos verten:

### Adhesiner

For at patogener skal kunne etablere seg i periodontale steder, må de kunne feste seg til en eller flere overflater, inkludert tannen, epitel og andre bakterier. Den enkleste mekanismen som finnes er reseptorer hos verten der "adhesiner" hos bakterier kan feste seg. Noen av adhesinene som har blitt funnet hos bakterier inkluderer fimbria<sup>(86)</sup> og celle-assosierte proteiner<sup>(9)</sup>. Reseptorer på vevsoverflater inkluderer blant annet prolin-rike proteiner eller statherin, eller type I eller IV kollagener.

### Koaggregering

Koaggregering er bakterienes evne til å feste seg til andre bakterier som allerede er festet til overflater f eks tannen. Mekanismen for dette er ved lektin-lignende interaksjoner der et spesifikt protein på overflaten til en art binder seg til en spesifikk karbohydrat på overflaten til en annen.<sup>(14)</sup>

### Reproduksjon

Den gingivale lommen gir begrensede muligheter for mikrober å reproducere seg i forhold til temperatur, pH og redokspotensial. Det fører til en seleksjon av bakterier, der de "sterkeste" overlever. I tillegg er det begrenset med næring. Bakteriene har tre kilder for næring i den gingivale lommen: mat, verten eller andre subgingivale arter. Vitamin-K-analoger og hydrogen eller format, som noen arter trenger for overlevelse blir f eks produsert av andre arter.

### Interbakterielle forhold

Bakterier kan enten samarbeide eller ødelegge for hverandre. Noen av dem bidrar med vekstfaktorer eller adhesjonsmuligheter for andre mikrober, mens andre konkurrerer om næring for overlevelse (se koaggregering og reproduksjon ovenfor).

### Bakterienes forsvar mot verten

Verten har ulike mekanismer for å forsvare seg mot mikrober. Bakteriene derimot må kunne unngå eller forhindre disse mekanismene for deres overlevelse. Saliva og gingivalvæske skyller bort bakterier slik at de ikke kan feste seg på overflater. De har i tillegg substanser som forhindrer binding av bakterier som f eks spesifikke antistoffer, salivære glykoproteiner, muciner og prolin-rike proteiner.<sup>(16)</sup>

### Invasjon

Stammer av *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* har vist evnen til å invadere epitelceller, som er tatt fra humane periodontale lommer. Høyere verdier av *T. forsythia* har også blitt funnet i prøver fra humane epitelceller fra periodontale lommer, og at disse ble funnet innenfor cellene. Dette betyr at bakterien vil da kunne unngå vertsforsvaret.

### Faktorer som kan føre til vevsødeleggelse

Virulensfaktorer kan deles inn i tre kategorier:

- Stoffe som ødelegger celler (f eks hydrogensulfid)
- Stoffe som får celler til å skille ut biologisk aktive stoffer (f eks LPS)
- Stoffe som kan påvirke den intracellulære matrixen (f eks kollagenase)

Bakterier har enzymer som metaboliserer ekstracellulære proteiner til sin vekst, og deres avfallsprodukter kan være skadelige. Eksempler på slike enzymer er proteaser, leukotoksin og endotoksin (lipopolysakkarid). Proteaser kan metabolisere kollagen, elastin, fibronectin og fibrin. *P. gingivalis* produserer en rekke proteaser. Dette inkluderer dem som degraderer kollagen, immunoglobuliner og fibronectin.

## **2.6 MODIFISERENDE FAKTORER**

De mest sentrale modifierende faktorene for periodontal sykdom er bakteriespesifitet, røyking og diabetes mellitus. De andre faktorene er potensielle modifierende faktorer som holder på å bli studert og undersøkt. Vi skal konsentrere oss om de faktorene som spiller en viktig rolle i overføringen av bakterier mellom individer. Det finnes en rekke faktorer som kan tas med under denne klassifikasjonen:

### 2.6.1 Arv

Tvillingsstudier tyder på at genetiske determinanter kan påvirke fenotypen av periodontal sykdom. I 1997 slo Kornman<sup>(11)</sup> fast at en bestemt genotype av sykdommen kan ha blitt forårsaket av polymorfismer i en IL-1 gengruppe, og det fant han hos ikke-røykere med alvorlig periodontitt. Etter dette ble flere studier utført på andre interleukiner, f eks TNF- $\alpha$  og TGF- $\beta$ 1.<sup>(11)</sup> Man kan ikke se bort ifra at noen kan være mer predisponerte enn andre i forhold til å motta bakterier. Det kommer selvfølgelig an på vertsforsvaret til verten.

### 2.6.2 Mikroorganismer: se 2.4 Periodontale patogener

### 2.6.3 Stress

Måten stress kan påvirke utviklingen av periodontal sykdom hos personer kan være kompleks. Det har blitt foreslått at stress for eksempel kan føre til at én begynner å røyke eller ha dårlig munnhygiene.<sup>(10)</sup> Dårlig hygiene gir mer plakk og økt inflammasjon som fører til en miljøforandring i lommen som disponerer for veksten av andre periodontale patogener. Det viser seg at det finnes en korrelasjon mellom periodontitt og alder, sosio-økonomisk status, grad av fornøyelse med jobben eller personlighetstrekk.<sup>(10)</sup>

### 2.6.4 Uvaner (røyking, alkohol)

Tobakk inneholder mange forskjellige stoffer som kan påvirke vaskulaturen, humorale og cellulære immunresponser, cellekommunikasjon og vevshomeostase. Studier viser at røykere har større sannsynlighet for å få periodontitt. De har i tillegg dårligere hygiene.<sup>(31)</sup>

Videre har det blitt demonstrert at lommer som ikke er så dype har blitt kolonisert av bakterier som *T. forsythia*, *T. denticola* og *P. gingivalis* hos røykere.<sup>(7,31)</sup>

### 2.6.5 Diabetes mellitus

Det finnes en sammenheng mellom dårlig kontrollert diabetes og periodontitt. Det har blitt vist større festetap hos dem med dårlig kontrollert diabetes. Hyperglykemi hos ukontrollerte diabetikere påvirker regional mikrobiota. Dette kan da påvirke utviklingen av karies og periodontitt.<sup>(31)</sup>

Kronisk hyperglykemi fører til glykolisering av proteiner. Det blir da dannet "advanced glycolytic enzymes" (AGE) som binder seg til makrofager. Dette gir makrofager økt sensitivitet til stimuli og forsinket sårtilheling.<sup>(31)</sup>

Hyperglykemi kan hemme vekst, proliferasjon og matrikssyntese av fibroblaster og osteoblaster i gingiva og periodontiet. Dette fører også til dårlig sårtilheling.<sup>(31)</sup>

### 2.6.6 Plakk kontroll

Plakk er en bakteriell biofilm som ikke kan fjernes lett fra tennenes overflater. God oral hygiene samt profesjonell mekanisk rensing av tenner spiller en viktig rolle for forebygging

av gingivale og periodontale sykdommer. Primær forebygging av gingivitt samt primær og sekundær forebygging av periodontitt er basert på om mekanisk rensing har vært vellykket eller ikke. Jo mer plakk, dess større risiko for etablering av andre bakterier f eks "det røde komplekset".<sup>(32)</sup>

### 2.6.7 Sosioøkonomisk status

Den sosioøkonomiske statusen kan påvirke en persons munnhygiene, tilgang til hygieneutstyr og tilgang til tannhelsetjenester. Når det gjelder folks tilgang og bruk av tannhelseutstyr (tannbørste, fluortannkrem) viser en studie at henholdsvis 97 og 92 % av de utvalgte i studien oppga at de brukte tannbørste og fluortannkrem. Regelmessig interdental renhold er derimot mindre vanlig enn tannpuss, men er på lik linje med andre land Norge kan sammenliknes med. I tillegg viser denne studien at alder, kjønn, tannstatus og regelmessig tannlegebesøk kan predikere oral hygieneatferd.<sup>(20)</sup>

Spørsmålet om lav sosioøkonomisk status har en innvirkning på folks tannhelse (munnhygiene, tilgang og bruk av hygieneutstyr, tilgang til tannbehandling) er vanskelig å påvise i Norge pga. at forskjellene på folk i befolkningen ikke er så store sammenlignet med andre land.<sup>(20)</sup>

Det kan tenkes at pga. den lave sosioøkonomiske status hos noen, som da fører til dårlig hygiene, tilgang til tannhelsetjenester osv., påvirker risikoen for smitte innenfor hjemmet også. Jo trangere man bor med forskjellige personer og jo mer uhygieniske forhold man lever i, dess større er sjansen for at bakterier overføres mellom beboerne.

### 2.6.8 Medikamenter

Medikamenter kan både ha primære og sekundære effekter på periodontiet. Primære effekter blir forårsaket av medikamenter som blir brukt spesifikt i behandlingen av periodontale sykdommer. Eksempler på slike medikamenter er antibiotika og analgetika.<sup>(29)</sup>

Videre har vi medikamenter som blir brukt til behandlingen av andre tilstander, men som har sekundære effekter på periodontiet. Det viser seg at NSAIDs reduserer periodontal patologi, og lav-dose doksisyklin, som blokkerer metalloproteinase og reduserer vevsinflammasjon hos pasienter med periodontitt.<sup>(29)</sup>

Andre medikamenter gir ofte sekundære effekter på periodontiet som redusert saliva flow, rundt 400 forskjellige medikamenter gir denne bivirkningen. Dette fører til plakkakkumulering, og økt vevsinflammasjon. En annen bivirkning (f. eks. av antiepileptika, kalsium-kanalblokkere, cyklosporin) er gingival hyperplasi.<sup>(29)</sup>

Alle de overnevnte faktorene påvirker den fysiologiske responsen, betennelsesresponsen, hjerte-/karsystemet, immunsystemet og vevsregenerasjon. Det betyr at de kan modifisere vertens mottakelighet for sykdom, egenskapene til plakket/biofilmen, kliniske symptomer, sykdomutviklingen og respons på behandling.<sup>(12)</sup>

### 3.0 INFEKSJON

En infeksjon er en patologisk tilstand der en patogen mikroorganisme invaderer en vert. Et patogen er en organisme som klarer å overleve overføring mellom individer, unngå resipientens primærforsvar ved overføring, etablere seg i receptorsites og der kunne gi infeksjon på tross for resipientens forsvarsmekanismer. De fleste bakteriene i periodontal sykdom finnes i små mengder hos friske personer. Disse sees på som mulige opportunistiske organismer når de forårsaker infeksjon. Andre bakterier som for eksempel *P. gingivalis* og *A. actinomycetemcomitans* regnes som eksogene bakterier, siden de ikke finnes så mye av hos friske.

Transmisjon av bakterier mellom personer behøver ikke føre til sykdom. Dette gjelder for smittsomme sykdommer generelt, men også for periodontale sykdommer.

Virulens er definert som en mikrobes evne til å forårsake en infeksjon. Eksempler på slike egenskaper er å: <sup>(13)</sup>

- Invadere en vert
- Finne en unik økologisk nisje
- Motstå vertsresponsen
- Reproducere seg i det nye miljøet
- Uttrykke spesialiserte patogene egenskaper

*A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* har disse egenskapene. Mikroorganismer generelt har i tillegg evnen til å uttrykke nye genprodukter i respons til miljøforandringer i lommen. <sup>(13)</sup>

Den tyske forskeren i mikrobiologi, Robert Koch, gjorde noen av de tidligste arbeidene med stor innflytelse innen bakterielle infeksjoner. I 1884 formulerte han postulater som skal bestemme sykdomsfremkallelse av mikroorganismer. Disse postulater lyder slik; for at en organisme kan gi en bestemt sykdom: <sup>(13)</sup>

- Må den kunne finnes i sykdommen man ser på, og ikke i andre sykdommer.
- Organismen må kunne bli dyrket på kunstige medier.
- En rendyrket organisme må kunne indusere en lignende sykdom hos forsøksdyr.
- Organismen må kunne hentes igjen fra den inokulerte verten.

Disse kriteriene blir vanskelig å oppfylle for organismer som ikke kan dyrkes (for eksempel store spirocheter i periodontitt), som har vist en lang inkubasjonstid, og som bare viser patogenitet når en annen mikroorganisme gir infeksjon og gjør vertens immunrespons svakere. Et annet problem i forhold til periopatogener er at forskjellige bakterier kan gi de samme symptomene, mens en og samme patogen organisme kan gi opphav til mange kliniske tegn og symptomer. <sup>(13)</sup>

I 1976 formulerte Evans noen kriterier for bakterielle årsakssammenhenger, som kan brukes til akutte og kroniske sykdommer: <sup>(13)</sup>

- Prevalensen av sykdommen må være høyere hos den eksponerte enn hos kontrollpersoner som ikke er veldig eksponerte.
- Eksponering til den antatte bakterien må være tilstede oftere hos de som har sykdommen enn hos dem uten sykdommen, når alle risikofaktorer er konstante.
- Insidensen av sykdommen må være høyere hos de eksponerte enn de ikke-eksponerte.
- Sykdommen må følge en "bell-shaped" kurve ved eksponering til den antatte bakterien.
- Det skal være et spekter av vertsresponser etter eksponering til den antatte bakterien, som kan graderes fra mild til alvorlig.
- En målbar vertsrespons etter eksponering til den antatte bakterien må kunne sees hos dem som mangler den før eksponering.
- Eksperimentell reproduksjon av sykdommen må kunne ha en høyere insidens hos eksponerte dyr eller personer enn hos dem som ikke er eksponert.
- Eliminering eller modifisering av den antatte bakterien må kunne redusere insidensen av sykdommen.
- Forhindring eller modifisering av vertsresponsen mot eksponering til den antatte bakterien må kunne redusere eller eliminere sykdommen.
- Hele greia må kunne gi biologisk og epidemiologisk mening.

### **3.1 UNIKE EGENSKAPER VED PERIODONTALE INFEKSJONER**

Selv om periodontale infeksjoner er lik andre infeksjoner, har de også andre egenskaper som skiller seg ut fra dem. Dette kan skyldes den unike strukturen av tannen – med en eksponert del av tannen som er i kontakt med miljøet og roten som er "vevd" sammen med periodontalt vev. Tannen har en overflate der bakterier kan feste seg og formere. I motsetning til andre deler av kroppen, har ikke tannen evnen til å "shedde" epitel for å bli kvitt bakterier. <sup>(4)</sup>

Bakterier organiserer seg i en biofilm, som beskytter dem, og som bidrar med metabolske egenskaper som gjør det mulig for mikroorganismene å eksistere. Dette hadde vært umulig uten biofilmen. <sup>(4)</sup>

Bakteriesammensetningen i periodontal sykdom forandrer seg etter hvert som inflammasjon og vertsresponsen oppstår. Som nevnt tidligere fører tilstedeværelsen av det oransje komplekset ofte til etablering av det røde komplekset. <sup>(32)</sup> Forebyggende behandling spiller en sentral rolle i forhold til utviklingen av sykdommen. Videre fører vertsresponsen til tanntap i verste tilfelle, altså at kroppen "ødelegges" for å bli kvitt infeksjonen. <sup>(4)</sup>

Det finnes to prinsipper for behandling av en periodontitt: ved depurasjon (mekanisk behandling) eller ved bruk av antibiotika (kjemisk behandling). Periodontitt er unik i den forstand at bakteriene sitter utenfor kroppen (i lommen), mens inflammasjonen er inne i



kroppen (i peridontalmembranen). Antibiotika blir brukt i behandlingen når mekanisk rensing ikke eliminerer sykdommen. Når bakteriene sitter fast på en overflate har antibiotika mindre effekt sammenlignet med tilfeller der bakterier sitter "løst" dvs. at man får et tilbakefall av sykdommen når antibiotikakuren avsluttes.<sup>(35,36)</sup>

## **4.0 SMITTE**

Smitte er direkte eller indirekte overføring av et smittestoff fra en organisme til en annen. Smittestoffet kan etablere seg hos verten uten å gi sykdom, og man har da en bærertilstand. Hvis mikroben gir symptomer, har verten fått en infeksjonssykdom.<sup>(15)</sup> Kochs postulater er beskrevet ovenfor, og hvis man strengt skal følge postulatene, vil de ikke være gjeldende for de aller fleste smittsomme sykdommer. Periodontitt er ikke et unntak, da sykdomsbildet er komplekst og avhenger blant annet av interaksjon mellom flere mikroorganismer.

Det finnes flere måter å bli smittet på:

- Dråpekontakt: ved hosting eller nysing
- Direkte fysisk kontakt: ved berøring av en smittet person inkludert seksuell kontakt
- Indirekte fysisk kontakt: ved berøring av en kontaminert overflate
- Lufttransmisjon: hvis bakterien klarer å overleve i lufta over lange perioder
- Oral transmisjon: ofte ved kontaminert mat eller vann

Ved en transmisjon må det være ett punkt på kroppen der bakteriene kan komme inn:

- Dråpe- og lufttransmisjon skjer via lungsystemet.
- Transmisjon ved direkte fysisk kontakt skjer gjennom et sår eller gjennom slimhinnen.
- Oral transmisjon skjer selvfølgelig gjennom munnen.
- Ved vektor-båret transmisjon, skjer det via en sting eller et bitt.

## **4.1 EKSEMPLER PÅ SMITTSOMME SYKDOMMER**

### Influenza

Influenza er en svært smittsom virusinfeksjon forårsaket av influensaviruset. Man kan skille mellom forskjellige typer influensa hos mennesker:<sup>(17)</sup>

- Sesonginfluensa: er en type influensa som bare er litt forskjellig fra forrige års virus slik at mange er immune mot den. Sykdommen er da ikke så alvorlig.
- Influenza fra dyr: sykdommen starter som regel hos dyr, og viruset kan bli overført til mennesker. Det kan da ikke oppstå smitte til en annen person etterpå.
- Pandemisk influensa: oppstår på grunn av et virus som ingen er immune mot. Dette viruset vil da spre seg veldig raskt, og kan gi mer alvorlig sykdom.

Influenza smitter ved nærdråpe- eller kontaktsmitte. Luftsmitte kan også forekomme. Smittedosen er lav. Den er smitteførende fra symptomdebut til 3-5 dager senere. Personer med svekket immunforsvar kan ha lenger smitteførende tid.<sup>(17)</sup>

### H. pylori-infeksjon

Denne type infeksjon forårsaker magesår og gastritt. Bakterien som tidligere ble kalt *Campylobacter pylori* produserer permanente toksiner som invaderer celler i mageslimhinnen. Infeksjon fører ikke til systemisk sykdom, men affiserer bare den overflatiske mageslimhinnen. Bakterien har blitt funnet hos henholdsvis 90 % og 75 % av pasienter diagnostisert med ulcus duodeni og ulcus ventriculi.<sup>(17)</sup>

Smittemåten er uvisst, men er antakelig gjennom fekal-oral eller munnkontakt.<sup>(17)</sup>

### Herpes-simplexvirus-infeksjoner

Disse infeksjonene resulterer i lokaliserte, smertefulle og væskefylte vesikler i både slimhinne og hud. Viruset forblir latent i kroppen, og kan reaktiveres. Det finnes to typer av viruset – *HSV-1* og *HSV-2*. Begge typene kan gi lesjoner rundt og i munnen og genitalia. *HSV-1* er derimot vanligst i munnsår, mens *HSV-2* er vanligst å finne i genitalia. *HSV-1* finnes derimot mer og mer i genitalia også.<sup>(17)</sup>

Smittemåten er direkte kontaktsmitte ved slimhinnekontakt og ved seksuell kontakt. Primærinfeksjonen er ofte asymptomatisk. Barn kan derimot ha feber og blærer i slimhinnen, men symptomene forsvinner vanligvis etter 1-2 uker.<sup>(17)</sup>

## **5.0 TRANSMISJON/SMITTE I PERIODONTIEN**

Et viktig tema innen periodontal mikrobiologi er periodontal infeksjon og transmisjonen av bakterier fra vert til vert. Man kan da spørre seg om disse periopatogene bakteriene kan forårsake infeksjoner og er overførbare mellom individer, eller om disse bare fører til infeksjon pga vertens dårlige immunforsvar.<sup>(13)</sup>

De fleste bakterieartene assosiert med periodontitt finnes i normalfloraen hos en frisk person, bare i lavere antall. Med høy-sensitive PCR teknikker, har man funnet *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* hos friske personer, men også bare et fåtall.<sup>(23)</sup>

Ved ulike typing-teknikker viser det seg at det bare finnes én klontype av *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* per forsøksperson. Dette sier at begge disse to bakteriene er overførbare. Det er derimot ikke bevist om denne transmisjonen nødvendigvis fører til sykdom. Hvis transmisjonen øker risikoen for sykdom kan kontroll av transmisjon være en metode for forebygging av periodontitt.<sup>(23)</sup>

De viktigste faktorer for transmisjon er verten, miljøet og mottakeren. Arten må kunne forlate verten, og være mange nok for å kunne overleve. Faktorene som bestemmer om det blir sykdom eller ikke forblir ukjent.<sup>(23)</sup> Oppførselen til en patogen mikroorganisme avhenger av interaksjonen mellom verten, patogenet og miljøet. Forandringer i noen av disse faktorene kan påvirke sannsynligheten for transmisjon. Vertsfaktorer påvirker risikoen for eksponering til en mikroorganisme, sjansen for kolonisering og respons til kolonisering. Eksempler på slike faktorer er sexvaner, hygiene, jobb, ernæring, immunitet og generell helse. Mikrobielle faktorer inkluderer infeksjonsfare, patogenisitet, virulens og overlevelse hos mennesker og dyr.<sup>(28)</sup>

Essensielle faktorer for transmisjon:<sup>(28)</sup>

- Kilden: Isolasjon er en effektiv måte for å bli kvitt infeksjøs agenter, men dette er vanskelig når bakteriene finnes hos friske personer.
- Antall organismer som blir tatt med: Jo flere, jo større sjanse for at de finner en ny vert. Antallet bakterier som trengs for å kolonisere en vert varierer mellom artene. Transmisjon avhenger også av mikroorganismenes genetiske faktorer, da noen er lettere overførbare.
- Frekvens av kontakt: kontakt mellom den infiserte og mulige mottakere er en viktig faktor for hvor rask en infeksjon sprer seg.

## **5.1 INTRAORAL TRANSMISJON**

Det har blitt vist i en studie at intraoral transmisjon av bakterier kan skje. Dette ble funnet ut ved å bruke 10 ubehandlede pasienter med kronisk marginal periodontitt, og bruke én og samme interdentalbørste til fire forskjellige approximalrom. Etterpå ble bakterier isolert fra periodontallommen, og sammenlignet med hverandre. Studien konkluderer med at det ikke finnes store forskjeller på de spesifikke bakterielle artene på prøvene. Dette sier at kontaminering (av id-børster i dette tilfellet) kan være en faktor ved intraoral spredning av bakterier.<sup>(19,24,27,28)</sup>

## **5.2 INTRAFAMILIÆR TRANSMISJON**

*A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* er hovedpatogener i lokal aggressiv periodontitt og kronisk marginal periodontitt (voksen periodontitt). Begge bakterier finnes sjeldent hos personer uten sykdommen. Det viser seg at det orale økosystemet ikke støtter veksten av disse bakteriene i barndommen. Andre periodontale bakterier har blitt funnet hos barn, men i lave antall som regel. Studier viser at *A. actinomycetemcomitans* koloniserer barn i 5 til 7 års alderen. *P. gingivalis* derimot koloniserer munnen hovedsaklig etter puberteten. *P. gingivalis* fantes sjeldent hos barn før puberteten, selv om foreldrene testet positive for den. Bakterien er derimot overført fra foreldrene hvis barna hadde den. *P. gingivalis* er ikke lett overførbart til barn, men er hovedsaklig overført mellom voksne. For begge bakterier er det viktig å redusere deres antall i saliva til en potensiell kilde for å forhindre horisontal transmisjon.<sup>(25)</sup>

Periopatogener blir spredt fra person til person via saliva. Derfor er det essensielt å se på bakterieinnholdet på saliva. Det viser seg at de fleste pasienter har de samme genetiske klonene av periopatogener i saliva og i dype periodontale lommer. Periodontal behandling førte til et redusert antall periopatogener i saliva. Frekvensen av eksponering til "smittsom" saliva og en persons mottakelighet til mikrobiell kolonisering bidrar til sannsynligheten for munn-til-munn transmisjon.<sup>(25)</sup>

Å finne de samme bakterieartene i munnene til ektefeller behøver ikke nødvendigvis å bevise intrafamilær transmisjon av bakteriene. Det er mulig at en av ektefellene har fått bakteriene tidligere i barndommen av en forelder eller besteforelder. For å beskrive transmisjon mellom personer må man bruke "mikrobielle fingerprinting teknikker" for å skille mellom ulike kloner av bakterien. Bare nå i det siste har det vært mulig å sammenligne dem på DNA-nivå. Dess mer heterogene forskjellige stammer av en bakterieart er, jo sterkere bevis må man ha for transmisjon når personer viser identiske genotyper av bakterien. Det er derimot vanskelig å påvise transmisjon når en person har flere stammer av samme bakterien.<sup>(25)</sup>

Studier viser at horisontal transmisjon (mellom ektefeller) med like periodontale genotyper ikke er vanlig. Dette foreslår at slike bakterier ikke overføres lett hos voksne, selv hos personer som har tett kontakt. En nyere studie viser at *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* fantes mer hos ektefellene til personer med periodontitt og som i tillegg testet positiv for bakteriene, enn hos personer med periodontitt som testet negativ for bakteriene. I en studie av 20 gifte par viser det seg at ektefellene til personer med periodontitt hadde en alvorligere periodontal sykdom enn dem som hadde ektefeller uten periodontitt.<sup>(25)</sup>

Den vertikale transmisjonen skjer pga foreldrenes ansvar for barna. *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* som vanligvis finnes hos voksne, kan eksponeres til barna. En studie viser at det ble oppdaget *A. actinomycetemcomitans* 26 ganger mer hos barn under 3 år som hadde en mor som testet positiv for bakterien.<sup>(5,25)</sup>

### 5.2.1 Intrafamilær transmisjon av sort-pigmenterte periodontale patogener

*P. gingivalis* og *P. intermedia* er sort-pigmenterte periopatogener som kan overføres mellom mennesker og gi periodontal sykdom hos mottakelige personer. Studien har blitt gjort innenfor familien, og det har blitt vist transmisjon av bakteriene mellom ektefeller, og fra foreldre til barn.<sup>(26)</sup>

Ved hjelp av restriksjonsenzym elektroforese har man funnet ut at stammer av *P. gingivalis* er heterogene. Ved å bruke multilokus enzym elektroforese skulle man finne ut om pasienter hadde like fenotyper av *P. gingivalis* på prøver tatt fra forskjellige regioner i munnen.<sup>(26)</sup>

En etablert flora motsetter seg inntrenging/etablering av en ny mikroorganisme. Transmisjonsmulighetene blir påvirket av miljøet, og adferden til ektefellene (hygiene, deling av bestikk). Den periodontale tilstanden til ektefellen har også noe å si om utfallet, da personer med gingival inflammasjon har større risiko for å få progressiv periodontal sykdom.<sup>(26)</sup>

Kolonisering av periopatogener kan forekomme i tidlig alder pga inadekvat vertsrespons og ikke-etablert mikroflora. Det kan også være en av faktorene for initiering av periodontal ødeleggelse. Periodontal sykdom hos en av foreldrene blir sett på som en risikofaktor for at et barn blir kolonisert av en eller flere BANA-bakterier. Van Steenbergem hadde undersøkt 14 barn og deres foreldre, og fant to barn med identiske ribotyper av *P. intermedia*. Blant 6 barn, hadde ett barn *P. nigrescens* av samme type som forelderens.<sup>(26)</sup>

### 5.2.2 Transmisjon av *A. actinomycetemcomitans* i familier med lokalisert juvenil periodontitt

Epidemiologiske studier foreslår at *A. actinomycetemcomitans* overføres primært i familier med lokal aggressiv periodontitt og generell voksen periodontitt (kronisk marginal periodontitt). *A. actinomycetemcomitans* har vansker med å bli overført til en balansert mikroflora, og introduksjon av bakterien til en vert er basert på gjentakelig kontakt med høye doser fra donor til mottaker.<sup>(27)</sup>

Studien fra Brasil tok ut 25 pasienter med lokal juvenil periodontitt, 10 av dem møtte kravet om *A. actinomycetemcomitans*, og at en annen person hjemme også hadde det. Forsøkspersonene hadde lav sosioøkonomisk status; hygienen var ikke særlig bra og de hadde ikke tilgang til tannhelsepersonell. 3 av 36 barn som var positiv for *A. actinomycetemcomitans* hadde samme amplitype som foreldrene. Bare 4 familier hadde en eller flere barn som var bærer av samme amplitype som en av foreldrene. Ingen av foreldrene hadde samme amplitype som ektefellen, hvis begge var bærer av *A. actinomycetemcomitans*.<sup>(27)</sup>

Transmisjon er et resultat av en kombinasjon av en stor og konsentrert inokulum for overlevelse i passasje- og etableringsfasen, kombinert med en "window of opportunity" der mottakerens makro- og mikromiljø aksepterer en inntrengende organisme.<sup>(27)</sup>

### 5.2.3 Sannsynlighet for transmisjon av *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* i familier med periodontitt

Funn av identiske genotyper av *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* blant familiemedlemmer som lever i nær kontakt med hverandre beviser overførbare periodontale infeksjoner.<sup>(22)</sup>

Studien viser at periodontitt var funnet i 82 % av ektefellene til pasienter undersøkt for *A. actinomycetemcomitans* og 85 % for *P. gingivalis*. 5 % av barn for *A. actinomycetemcomitans*, og ingen for *P. gingivalis*.<sup>(22)</sup>

Ektefeller av periopasienter var 7 ganger for *A. actinomycetemcomitans* og dobbel så ofte for *P. gingivalis* infisert av bakteriene enn pasienter som testet negativ for dem.<sup>(22)</sup>

Funnene tyder på transmisjonsmuligheter for periopatogener mellom individer som bor i nær kontakt med hverandre. Forskjellige genotyper av bakteriene *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* derimot tyder på at disse bakteriene ikke lett overføres mellom voksne personer. 20-30 % for voksne å ha *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis*. Barn har 30 %

risiko for å få *A. actinomycetemcomitans* fra en forelder. Videre har barn mye lavere risiko for å få *P. gingivalis* fra en forelder.<sup>(22)</sup>

## **6.0 MOLEKYLÆRGENETISKE METODER**

For å kunne identifisere bakterier i munnhulen må det tas en bakterieprøve. En slik prøve kan tas på ulike måter, og dette skal vi gå nærmere innpå i denne delen av oppgaven. For å forstå fordelene og ulempene med de ulike metodene å ta bakterieprøver på er det viktig å forstå hva en biofilm er. Vi vil derfor begynne med å definere en biofilm og dens egenskaper. Deretter vil vi beskrive de forskjellige måtene å ta en bakterieprøve på. Biofilmen spiller en viktig rolle i forhold til smitte. Overføring av bakterier avhenger av overføringsformen (beskrevet ovenfor) og egenskaper hos mottakeren. Bakterien skal kunne etablere seg til tross for vertens immunforsvar og den etablerte bakteriefloraen. Det må også være overføring en stor mengde bakterier for at overlevelse av noen få av dem blir mulig. Som nevnt tidligere har man funnet at f eks *A. actinomycetemcomitans* overføres fra foreldre til barn når de er mellom 5-7 år dvs. når bakteriefloraen ennå er umoden.

### **6.1 BIOFILM**

#### **6.1.1 Definisjon**

En biofilm er en matriksomsluttet bakteriell populasjon festet til hverandre eller til overflater.<sup>(50)</sup> Cellene ligger i en egenprodusert intercellulærsubstans som består av ekstracellulært DNA fra bakteriene, proteiner og polysakkarider.<sup>(47)</sup> I munnhulen kan vertsorganismen selv bidra med sakkarider til matriksdannelsen slik at det raskt dannes dentalt plakk på tennene.<sup>(49)</sup> Biofilmer kan dannes på både levende og ikke-levende overflater. De mikrobielle cellene som vokser i en biofilm er fysiologisk forskjellig fra planktoniske celler hos den samme organisme. Planktoniske celler er enkelt celler som befinner seg i et flytende medium.<sup>(47)</sup>

#### **6.1.2 Karakteristika**

Biofilmer er økologiske systemer bestående av individer hvor hvert individs aktivitet er til for å bevare systemet som en helhet. Den innehar metabolsk samarbeid og et primitivt sirkulatorisk system (i odontologien kalt vannkanaler). Den er i større grad resistent mot vertens forsvarsmekanismer og mot kjemiske antimikrobielle midler<sup>(50)</sup> enn når bakteriene flyter fritt omkring. Når bakterietettheten i en biofilm når en terskelverdi, dannes det signalstoffer, som oftest peptider, med flere spesifikke virkninger. Bakteriene kan reagere på signalene slik at en genaktivering skjer synkront. De kan også utveksle gener og få nye egenskaper.<sup>(49)</sup>

### 6.1.3 Bestemmelse av mikrofloraen

Det er flere utfordringer man står ovenfor når man skal bestemme sammensetningen av den mikrobielle floraen i munnen. Et stort problem kan være å fjerne majoriteten av mikroorganismene fra deres habitat for å kunne identifisere de. Mange er fast bundet til en overflate eller til hverandre og kan derfor være vanskelig å få adgang til.<sup>(51)</sup>

#### Prøvetaking av orale bakterier

Munnhulen inneholder mange forskjellige nisjer som inneholder ulike samfunn av bakterier. En periodontal lomme er for eksempel et mekanisk beskyttet område som inneholder gingival væske, mens den supragingivale overflaten til tannen er dekket av saliva og periodevis med mat. Som et resultat av disse miljøforandringene er bakteriesamfunnene i lommen og på tannens krone forskjellige. Felles for begge områdene er at de er dekket av biofilmer. Planktoniske bakterier forsvinner fort fra munnhulen fordi de blir vasket vekk av biologiske væsker. Studier av ulike nisjer i munnhulen har påvist ulike mikrobielle områder for tunge, tannen, lommen, buccale slimhinne og gingivalvæsken.

Innsamling av biofilm fra spesifikke steder er avgjørende for å få en representativ prøve. Det er to teknikker som er mye brukt for å samle inn dentalt plaque. En metode er å bruke en kyrette for å skrape av biofilmen fra tannen. Dette er den mest brukte metoden for å samle inn supragingival plaque. Kyrettemetoden brukes også ofte for å samle inn subgingivalt plaque, men det er vanskelig å samle inn plakk fra dype lommer hos pasienter med periodontal sykdom. Hvor dypt kyretten kan settes inn avhenger av tannens anatomi, og vil sjelden gå dypere enn cirka 6 mm.<sup>(56)</sup> Tuppen på kyretten kan kobles fra og plasseres med en gang i rør som inneholder anaerob transportvæske.<sup>(51)</sup>

En alternativ metode er å bruke en papirspiss som puttes ned i den periodontale lommen. Der tiltrekker den seg væske som inneholder bakterier. Et stort antall bakterier kan samles inn på denne måten, selv fra de dypeste lommene, men antallet mikroorganismer man får med seg som er godt festet til roten på tannen vil være lite, og man vil samle inn mer av den planktoniske delen av bakteriefloraen.<sup>(53)</sup> For å sikre seg en representativ metode kan man ta flere prøver fra samme sted. Ved å først bruke papirspiss, deretter en kyrette vil man kunne få tilgang på store deler av bakteriefloraen i lommen.<sup>(56)</sup>

Prøver har også blitt tatt ved irrigasjon av lommen og opphenting av materiale ved hjelp av sprøytespisser. Svakheten ved denne metoden er at den kun vil få med den løstsittende floraen.<sup>(56)</sup>

Mikrofloraen kan variere i sammensetning over relativt små avstander. Derfor kan store plakkansamlinger være av liten verdi fordi viktige stedsspesifikke ulikheter kan bli skjult. En utfordring kan også være at man ikke får med seg store nok mengder av bakterien man leter etter. Små prøver fra særskilte steder er foretrukket. Ved sykdomstilstander (periodontitt) vil bakteriene i fronten mot sykdomslesjonen være av interesse, dvs i basis av den periodontale lommen. Det er viktig å unngå å fjerne plaque fra andre områder i lommen for å ikke dekke over signifikante forhold mellom en spesiell bakterie og sykdom.<sup>(51)</sup>

## 6.2 METODER

Metoder for å identifisere og klassifisere orale bakterier kan deles inn i to hovedkategorier:

- 1) Teknikker som krever dyrkning av organismene og
- 2) molekylære teknikker som ikke krever dyrkning. I tillegg vil vi beskrive mørkefeltmikroskopi.

Nå det gjelder de molekylære metodene skal vi ta for oss restriksjonsanalyse, DNA-DNA hybridisering, checkerboardteknikk, PCR analyse og random primer PCR, og diskutere fordeler og ulemper med metodene.

I løpet av de siste to tiårene har de molekylære metodene fått en viktigere rolle i analysen av orale bakterier, og de har blitt standarden.<sup>(53)</sup>

### 6.2.1 Dyrkning av orale bakterier

Munnhulen inneholder en bred gruppe av bakterier som krever et bredt spekter av fysiske og kjemiske betingelser. For å dyrke bakterier i laboratoriet må dyrkningsforholdene tilpasses de varierende betingelsene. Etter innsamlingen av prøven og plassering i et transportmedium må bakteriene spres ved opphøring eller ultralyd før de plasseres i petriskåler. Deretter gjøres flere fortyninger. Bakteriene dyrkes i en inkubator på omtrent 37 grader celsius. Nå kan bakteriene isoleres for vekst i ren kultur ved å plukke ut en koloni, og subkulturere den.<sup>(53)</sup>

### Oksygenbehov

Mengde oksygen i atmosfæren er en kritisk betingelse for bakterievekst. Subgingivale arter er nesten alltid utelukkende anaerobe. Oksygen fjernes fra beholderen med en kjemisk reaksjon som involverer hydrogenutvikling og dannelse av vann fra hydrogen og oksygen under tilstedeværelse av en palladium katalysator. Man kan også koke mediet eller flushe det med oksygenfri gass.<sup>(53)</sup>

### Dyrkningsmedium

Dyrkning på bredspektrede, ikke-selektive medier som blod agar gir gode vekstvilkår for mange arter orale bakterier. Arter som utgjør en liten andel av det totale bakterieantallet kan lett overses. Selektive medier som inneholder ingredienser som hemmer veksten av nesten alle arter, bortsett fra noen få, kan være nyttig for å isolere individuelle arter.

Noen bakterier har spesielle behov for næringsstoffer for å kunne dyrkes. For eksempel var det ikke mulig å isolere *T.forsythia* før det ble oppdaget at bakterien hadde et metabolsk behov for N-acetylmuramic syre(NAM), en komponent i celleveggen som de fleste andre bakterier syntetiserer.<sup>(53)</sup>





Bilde av bakteriedyrking<sup>(61)</sup>

### Klassifisering av dyrkede bakterier

Etter en ny bakterie er funnet dokumenteres koloni morfologi; størrelsen, formen og fargen på koloniene blir registrert. Vekst av bakterien på ulike medier kan imidlertid danne totalt forskjellig morfologi. Mikroskop undersøkelse brukes for å undersøke formen på de individuelle cellene (staver, kokker etc.), og hvorvidt bakterien er positiv eller negativ til Gram farging. For å klassifisere etter biokjemisk profil kan man teste for tilstedeværelse av metabolitter, ved å bruke gass kromatografi. Resultatene kan også her påvirkes av dyrknings betingelsene. Andre metoder tester for aktiviteten til forskjellige enzymer, eller deres evne til å fermentere ulike typer sukker. Den biokjemiske profilen til arter som er nært beslektet kan variere, og individuelle arter kan karakteriseres.<sup>(53)</sup>

Dyrkning er en veldig god metode for å finne ut hvordan bakteriene reagerer på antibiotika, og for å måle de individuelle artenes patogenisitet. Ikke alle av de mest brukte antibiotikatyperne er effektive mot periopatogener, og pasienter kan reagere ulikt på samme type antibiotika. For å oppnå det beste behandlingseresultatet, kan man teste ut bakterienes respons på en type antibiotika før man behandler pasienten, og dermed kunne administrere den mest effektive antibiotikabehandlingen. Dette er metoder som krever sofistikert utstyr og erfarne medarbeidere og er relative tidskrevende og dyrt.<sup>(17,15)</sup>

Hovedproblemet med konvensjonell dyrkning og analysemetoder som baserer seg på dyrkning er at mindre enn halvparten av bakterieartene i en biologisk prøve er dyrkbare, og er derfor ikke egnet for helhetlige studier.<sup>(57)</sup> Denne metoden er alene ikke tilstrekkelig i transmisjonsstudier, da det trengs mer analyse av prøvene for å påvise klonal overføring. Dyrkning alene kan bare skille mellom bakterier morfologisk. Selv om den ikke kan påvise klonal transmisjon kan den f.eks ved bruk av antibiotika utelukke en slik transmisjon. Dette

gjør man f eks ved å se på resistensen mellom to prøver for et bestemt antibiotikum som man mistenker har samme opphav.

### 6.2.2 Mørkefeltmikroskopi

Mørkefeltmikroskopi omfatter mikroskopbaserte metoder, både lysmikroskopi og elektronmikroskopi, og fungerer ved at lyset ledes gjennom en kondensor, slik at prøven kun får lys opp fra siden. Derfor vil objekter som blir observert gjennom mørkefeltmikroskopet lyse opp mot en mørk bakgrunn.<sup>(60)</sup> Metoden brukes for å se hvilke bakterier som finnes i en prøve.

Fordelen med mørkefeltmikroskopi er at det er en veldig enkel og effektiv teknikk, og kan brukes på levende og ufargede biologiske prøver. Metoden gir også god bildekvalitet. Ulempen med metoden er at prøven må lyses opp så sterkt at det kan skade prøven. Mørkefeltmikroskopi er nesten helt uten artefakter, men tolkningen av bildene kan være utfordrende siden naturlige mørke strukturer kan være usynlig.<sup>(47)</sup> Mørkefeltmikroskopi kan heller ikke si noe om klonal transmisjon, kun om to prøver som man sammenligner har samme morfologisk struktur.

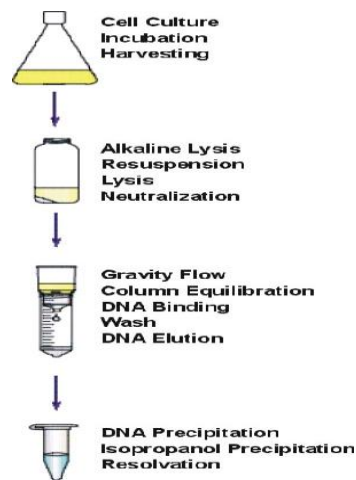
### 6.2.3 Molekylære teknikker

For å benytte de molekylære metodene må cellene åpnes og DNA ekstraheres. DNA segmentene må også skilles ved elektroforese og overføres til en membran for å kunne analyseres. Vi vil derfor først beskrive bakterielyse, elektroforese og Southern blotting.

#### 6.2.3.1 Bakterielyse

Lyse er et begrep som brukes om nedbrytning av en celle, ofte ved virale, enzymatiske eller osmotiske mekanismer som ødelegger cellens integritet.<sup>(47)</sup> For å trekke DNA ut fra bakteriecellen så det kan analyseres, må bakteriens cellevegg lyses uten å skade DNA. DNA felles ut ved å tilføre en alkohol(vanligvis etanol eller isopropanol), eller en fenol-kloroform blanding. Siden DNA er uløselig i alkohol vil det aggregere.

Det finnes flere typer kommersielt tilgjengelige kits for å isolere bakterielt DNA, som igjen har forskjellige metoder på å lysere cellene. Disse kitsene har ofte spesifikke typer av bakterier som mål(for eksempel Gram-negative).<sup>(53)</sup>



Bilde av DNA-isolering<sup>(59)</sup>

### 6.2.3.2 Gel elektroforese og Southern blotting

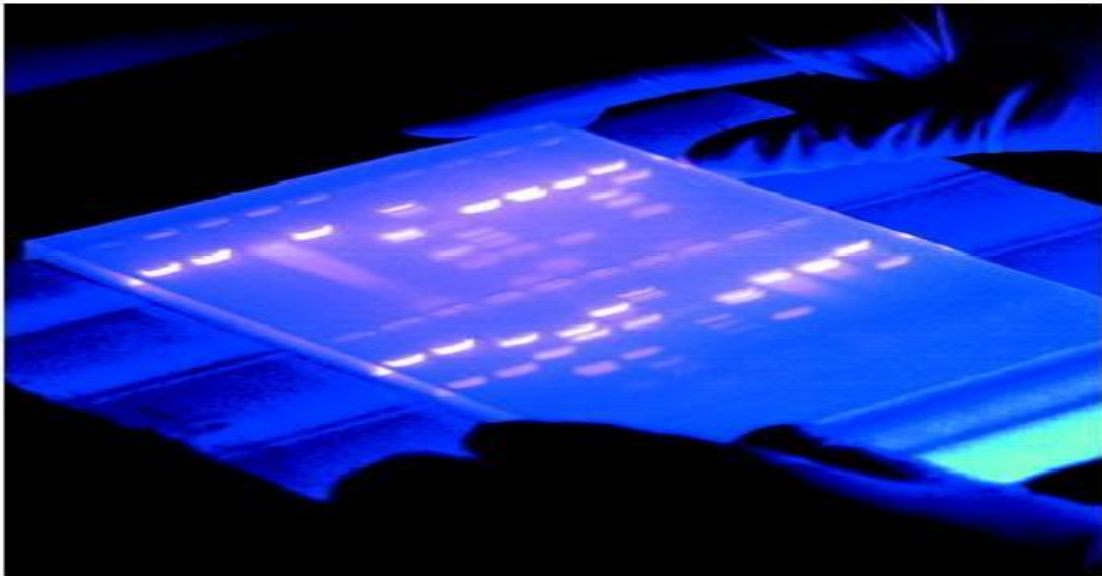
Reaksjonsproduktet anbringes i en fordypning i den ene enden av en agarose eller polyakrylamidgel mellom to elektriske poler. En spenning tilføres geleen. DNA-fragmentene, som er negativt ladet på grunn av fosfatgruppene, vil da vandre mot den positive polen, hurtigere dess mindre fragmentene er, siden gelstrukturen skaper forhindringer for bevegelsen. Hvor i gelen DNA-fragmentene sitter etter endt elektroforese, finner en ut ved å ha et stoff som bindes til DNA-molekylene, og som avgir lys, fluorescerer, når gelen bestråles med ultrafiolett lys.<sup>(54)</sup>

Vil en vite hvilket av DNA-fragmentene som inneholder et aktuelt gen eller en genbit, må en ha en probe, en gensøker, som kan være et lite stykke DNA som en har fått kjemisk syntetisert ut fra tidligere kunnskap om angjeldende gen. Proben lages slik at den inneholder radioaktivt fosfat. En tar da et avtrykk av DNA-mønsteret på et nitrocelluloseark ved å la væske strømme på tvers av gelen og nitrocellulosearket etter at DNA-et er blitt denaturert med alkali, såkalt Southern blotting. Setter en nå til proben, ved en temperatur på cirka 20 grader Celsius under denatureringstemperaturen for DNA-et, og kjøler ned igjen, vil proben hybridisere, dvs finne sin komplementære DNA tråd i ett eller to av de om lag 20 DNA – feltene på arket og fester seg der, idet den gjendanner dobbelt heliksstrukturen. Ved å legge arket sammen med en røntgenfilm en stund, får en et autoradiogram som viser hvor på arket radioaktiviteten sitter. Ut fra dette kan det angjeldende gelområdet om ønskelig skjæres ut fra en parallell gel og DNA-biten isoleres fra gelen.<sup>(14, 1)</sup>

### 6.2.4 Restriksjonsanalyse

Restriksjonsendonukleaser er en spesiell gruppe bakterielle enzymer som katalyserer hydrolyse av fosfodiester bindinger i nukleinsyrer. En restriksjonsendonuklease kutter dobbelttrådig DNA på bestemte steder, som bestemmes av en kort sekvens av nukleotide par.<sup>(41)</sup> Enzymene brukes eksperimentelt for å skaffe presist definerte DNA segmenter kalt restriksjons fragmenter.<sup>(42)</sup> Det finnes hundrevis av disse enzymene med forskjellige kutte egenskaper som er kommersielt tilgjengelig. Disse enzymene varierer både i nukleotidsekvens de gjenkjenner og lengde på gjenkjennelsesstedet. Resultatet blir DNA

fragmenter med forskjellige lengder som tilsettes en gel og skilles ved elektroforese (beskrevet ovenfor). Båndene i gelen kan fotograferes i UV lys og sammenlignes med prøver av kjent bakterie DNA som også er kuttet opp i fragmenter. Hvis bakterien man leter etter er tilstede i prøven vil båndene som dannes være lik de kjente DNA båndene fra bakterien som man sammenligner med.



Bilde av elektroforese<sup>(48)</sup>

### 6.2.5 DNA-DNA hybridisering

Hybridisering er en prosess som etablerer ikke-kovalente, sekvens-spesifikke bindinger mellom to eller flere komplementære nukleinsyretråder. Det dannes dermed et enkelt hybrid.<sup>(47)</sup> DNA hybridisering er en teknikk der man benytter nukleinsyreprober for å lokalisere spesifikke nukleinsyresekvenser. Utgangspunktet er at man har en kjent DNA sekvens(probe) som er unik for bakterien man vil påvise i prøven. Man lyserer så prøven som tidligere beskrevet slik at man får ut DNA fra alle bakteriene. Deretter separerer man DNA i en gel slik at DNA fra forskjellige bakterier spres utover, og splitter DNA molekylets dobbelhelix for å få enkeltrådet DNA. Ved hjelp av blotting teknikk overføres DNA fra geleen til en membran. Så tilsetter man den enkeltrådede DNA proben som vil bindes til sin komplementære basesekvens slik at det igjen dannes dobbeltrådet DNA. Nukleinsyre prober merkes med fluorescente farger eller med radioaktive isotoper. Den delen av DNA molekylet som binder den merkede proben kan dermed visualiseres.<sup>(41)</sup> og man kan dermed påvise at det har skjedd en DNA-DNA hybridisering. På denne måten kan man påvise bakterier i en prøve.<sup>(50)</sup>

### 6.2.6 Checkerboard-teknikk

På grunn av det komplekse orale mikrobielle samfunnet, er man nødt til å identifisere mange bakteriearter fra en enkelt prøve for å kunne studere den bakterielle etiologien til orale infeksjoner. Checkerboard analyse er en DNA hybridisering metode som er utviklet for å identifisere mange bakteriearter fra en prøve på samme tidspunkt.<sup>(53)</sup>

### 1) Checkerboard analyse av et helt genom

Artsspesifikke hybridiseringsprober av et helt genom brukes for denne analysen. DNA fra bakterieprøver festes til nylon membraner i lange strimler. Artsspesifikke prober konstruert fra hel-genom DNA merkes og hybridiseres i lange strimler ved rette vinkler til prøven. Det dannes da et sjakkbrett mønster. Med denne metoden kan 30 til 40 prøver analyseres for tilstedeværelse av 30 til 40 arter på en gang. Bare dyrkede prøver kan analyseres med denne typen checkerboard analyse, siden hel-genomiske DNA prober må konstrueres. Denne teknikken kan være utsatt for kryss-reaksjoner med arter som er nært relatert til mål-artene. Dette er fordi proben kan inneholde sekvenser som ikke er artsspesifikke. Med checkerboard teknikken er det mulig å skaffe store mengder data på relativt kort tid.<sup>(53)</sup>

### 2) Oligonukleotide checkerboard analyse

Dette er en modifisert utgave av den originale checkerboard teknikken. Oligonukleotider som er homologe med 16S ribosomale gener brukes som hybridisering prober istedenfor prober fra hele genomet. Fordi proben istedenfor prøven først festes til membranen, kalles metoden reversert checkerboard. PCR brukes for å amplifisere og merke prøvene før hybridisering. Denne metoden er potensielt mer spesifikk enn den originale checkerboard metoden. Det kan imidlertid være vanskelig å finne hybridiserings forhold som fungerer bra for mange forskjellige prober. En fordel med denne reverserte metoden er at prober kan lages for arter som aldri har blitt dyrket, så lenge sekvensen av 16S genet har blitt bestemt.<sup>(53)</sup>

### 6.2.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR er en metode for å kopiere og påvise en valgt DNA sekvens.<sup>(42)</sup> Med denne metoden kan man identifisere en enkelt bakterie i en prøve fordi man mangfoldiggjør en spesiell sekvens av bakteriens DNA.<sup>(50)</sup> PCR bruker DNA polymerase for å kopiere delen av DNA molekylet av interesse. Enhver syklus dobler mengden DNA, og fører til en eksponentiell økning i mengde DNA, og gir syntese av millioner av kopier av en spesifikk nukleotide sekvens i løpet av noen få timer. De kopierte DNA sekvensene kan deretter analyseres ved hjelp av gel elektroforese, Southern hybridisering og fargemetoder.<sup>(42)</sup> Nesten alle DNA baserte metoder som ikke krever dyrkning av bakteriene bruker PCR på et eller annet tidspunkt i løpet av prosedyren. Mangfoldiggjøring av DNA med PCR har muliggjort oppdagelse av bakterier som er tilstede i veldig små mengder, teoretisk sett så lite som en enkelt bakterie celle. PCR har også gjort det mulig å gjøre omfattende og detaljert analyse med veldig små prøver.

#### Stegene i PCR

##### 1. Konstruksjon av primer

Det er ikke nødvendig å kunne hele nukleotid sekvensen i DNA molekylet man leter etter, men man må vite nukleotid sekvensen av korte segmenter på hver side av molekylet. Nukleotide sekvensen i sideregionene brukes til å konstruere to enkelttråder med oligonukleotider som vanligvis er 20-35 nukleotider lang. Disse er komplementære med sidesekvensene. Disse syntetiske oligonukleotidene fungerer som primere i PCR reaksjonen.<sup>(42)</sup> Med tilgjengeligheten av DNA sekvens data for 16S gener fra tusenvis av

bakterier, er det mulig å designe arts-spesifikke primere uten laboratorie arbeid. Først må sekvenser fra nært relaterte arter lastes ned fra en database(som for eksempel Gen Bank ), og regionene som er unike for artene av interesse identifiseres. Kandidat sekvensen for primer konstruksjon kan dermed sammenlignes med hele databasens for å bekrefte dens unikhhet. Sannsynligheten for at en uoppdaget bakterie inneholder den antatte unike sekvensen blir mindre for hver dag med tilgjengeligheten av 16S sekvenser fra flere arter. Det er imidlertid fortsatt mulig at ukjente arter kan kryss-hybridisere med den valgte primeren.<sup>(53)</sup>

## 2. Denaturering av DNA

DNA sekvensen som skal kopieres varmes opp for å skille de dobbeltrådige mål DNAet til enkeltråder.<sup>(42)</sup>

## 3. Binding av primerne til enkeltrådig DNA

De separerte trådene avkjøles og bindes til de to primerne, en på hver tråd.<sup>(42)</sup> Hydrogenbindinger dannes mellom komplementære sekvenser og danner en dobbelt tråd.<sup>(47)</sup>

## 4. Kjedeforlengelse

DNA polymerase og deoxyribonucleoside trifosfat tilføres blandingen for å starte syntesen av to nye kjeder som er komplementære med den originale DNA kjeden. DNA polymerase tilfører nukleotider på 3'-hydroksyl enden av primeren, og kjeden vokser over DNA molekylet og lager komplementære kopier av sekvensen av interesse. PCR produkter kan være flere tusen basepar lange Etter hver syklus må reaksjonsblandingen varmes opp igjen for å denaturere DNA trådene. Ved å bruke en varmestabil DNA polymerase, for eksempel Taq polymerase fra bakterier(*Thermus aquaticus*), som normalt lever i høye temperaturer, vil polymerasen ikke denatureres. Den trenger derfor ikke tilføres i hver syklus.<sup>(42)</sup>

## PCR analyse

En av de enkleste metodene for å identifisere bakterier er å bruke arts-spesifikke primere i en PCR analyse.<sup>(53)</sup> Tilstedeværelse eller fravær av arts-spesifikke PCR produkter fra en prøve blir oppdaget med agarose gel elektroforese og fargemetoder.

Det er også vanlig å utvikle PCR analyser basert på andre gener enn 16S, som også er unike for bakterien. Et eksempel er leukotoksin genet til *A. actinomycetemcomitans*. En PCR analyse basert på leukotoksin genet muliggjør oppdagelsen av *A. actinomycetemcomitans* i en prøve.

### Fordeler med PCR

PCR er en ekstremt sensitiv og effektiv metode for å identifisere orale bakterier. Med en gang unike primere har blitt identifisert og testet, kan et stort antall prøver bli analysert. PCR er også teknisk lettere å utføre enn andre metoder.

### Ulemper/utfordringer

Feil valg av prøve (saliva, plakk) kan begrense tilgjengeligheten og føre til falske positive eller falske negative resultater på grunn av kolonisering eller smitte og PCR inhibering.<sup>(52)</sup> En relativt liten mengde av hele bakterieprøven brukes i amplifiseringsprosessen. Derfor er det en sjanse for at mikroorganismen man leter etter ikke blir tatt med i analysen hvis det finnes i små mengder i prøven. Kliniske prøver kan også inneholde enzymhemmere som kan redusere eller ødelegge amplifiseringsprosessen.<sup>(55)</sup>

Kvaliteten på PCR prøven er avhengig av kvaliteten på DNA molekylet som er ekstrahert, og bruk av en robust og reproducerbar ekstraksjons prosedyre.<sup>(52)</sup>

Ukjente arter kan kryss-hybridisere med den valgte primeren,<sup>(53)</sup> og ikke-spesifikke oligonukleotider kan føre til falske positive resultater.<sup>(52)</sup>

Dyrkning er den eneste metoden som kun identifiserer levende bakterier. I tiden rett etter behandling kan det være viktig å registrere antall levende bakterier, og ikke antigener eller bakterielt DNA fra døde bakterier som ikke vil forårsake en patogen infeksjon. Molekylære metoder skiller ikke mellom levende og døde bakterier.<sup>(55)</sup>

De fleste PCR analyser kan påvise tilstedeværelsen av mikroorganismer, men sier ingenting om mengden av mikroorganismer. Dette er fordi sluttmengden av produktet i en PCR ikke er direkte avhengig av mengde DNA i den originale prøven. Det kan derfor oppdages patogener som er i et så lite antall at det ikke har noen klinisk betydning.<sup>(55)</sup>

### Real-time PCR (Kvantitativ PCR)

Kvantitativ PCR, er en tilpasset PCR som gjør det mulig å måle bakteriemengdene.<sup>(53)</sup> Man får dermed en veldig rask oppdagelse for kliniske analyser fordi man oppdager tilstedeværelsen av amplifiseringsprodukter mens reaksjonen pågår.

Hvis man tilfører en fluorescent indikator farge, kan reaksjonens progresjon måles i real-time, og kvantifiserbar informasjon kan skaffes. En vanlig brukt real-time PCR metode er Taq Man systemet. I tillegg til å bruke de to primerne som kreves for PCR, tilføres også en oligonukleotide probe. Denne proben bindes til templatet innimellom de to primerne. Proben har to fluorescente farger festet til seg, en reporter farge på 5' enden og en quencher(utvisker) på 3' enden. Når proben er intakt, på grunn av nærheten av de to fargene, blir fluorescensen av reporteren utvisket. TaqMan systemet avhenger av 5'-3' eksonuklease aktiviteten til Taq DNA polymerase, enzymet som brukes i PCR. I løper av forlengelses fasen i PCR, vil proben som hybridiseres nedenfor primeren bli kuttet til nukleotider. Dermed frigjøres reporter fargen fra utviskeren. Det resulterende fluorescente

signalet, som er proporsjonal med mengde DNA syntese, måles med et fluorometer. Prøver med en ubestemt mengde bakterier kan sammenlignes med en standard kurve for å avgjøre mengden av mål-sekvens som var tilstede i den originale prøven.<sup>(53)</sup>

### 6.2.8 Random primer PCR

Random primer PCR er en teknikk som ligner på restriksjonsanalyse. Ved bruk av tilfeldige primere på 8-12 nukleotider, initierer man syntese på tilfeldige lokasjoner på DNA-molekylet av interesse ved hjelp av PCR. Dermed mangfoldiggjør man multiple DNA biter av ulike lengder. Disse fragmentene kjøres ut på elektroforese og separeres. Deretter sammenligner man ukjent prøve med random primer PCR av kjent bakterie.<sup>(10,3)</sup> På denne måten kan man se om man har det man leter etter i prøven eller ikke.

## 6.3 EVALUERING AV METODENE<sup>(55)</sup>

Når vi nå i detalj har beskrevet de forskjellige identifikasjonsmetodene er dette for å vise hvor uendelig mange feilkilder som finnes. Skal man undersøke om en bakterie hentet fra flere individer er av samme klon, og dermed kunne klassifiseres som transmittert, ser man at disse feilkildene må tas i betraktning når man skal svare på spørsmålet om en infeksjonssykdom er smittsomt eller ikke.

### Feilkilder

Den nøyaktige identifiseringen og kvantifiseringen av komplekse blandinger av bakterier slik som i munnhulen er en vanskelig prosess. Alle teknikkene som brukes for å karakterisere de blandede bakteriekulturene kan gi eksperimentelle feilkilder. Mange av teknikkene involverer analysing av DNA isolert direkte fra orale prøver uten dyrking. Selv om disse metodene vil unngå feilkilder som kan inntreffe ved dyrking, som kan overse mer enn 50 % av artene i prøven, kan det fremdeles være feilkilder knyttet til gjenvinning av DNA fra hundrevis av ulike organismer i prøven.<sup>(53)</sup>

En brukbar mikrobiologisk diagnostisk test må være i besittelse av følgende egenskaper: Test resultatene bør være reproducerbare, testens nøyaktighet og presisjon må være kjent, og sensitivitet og spesifisitet bør fra pålitelig hold være etablert ved sammenligning med en referanse test.<sup>(55)</sup>

En mikrobiologisk metode kan ved feiltagelse identifisere mikroorganismer som ikke skulle vært identifisert, eller kan ikke identifisere alle typene av bakterie som det var meningen at den skulle identifisere. En tests sensitivitet betegner prosenten av positive test resultater til en metode som skal identifisere forskjellige typer av mikrobiologiske arter. En tests spesifisitet betegner prosenten av negative resultater når metoden anvendes på bakterier det ikke er meningen at den skal identifisere. Den ideelle påvisnings metoden viser en sensitivitet og spesifisitet på 100%.



Sensitivitet og spesifisitet kan være en indikator på en diagnostisk tests evne til å identifisere en sykdomstilstand. Påvisning av *A. actinomycetemcomitans* og *P. gingivalis* i periodontale lommer kan tyde på en risiko for progressiv sykdom. Vanligvis beskriver sensitivitet og spesifisitet prestasjonen til en ny metode sammenlignet med en referansemetode. Ved å bruke dyrkning som referansemetode, beskriver sensitivitet prosentandelen dyrknings-positive prøver som også er positive når man bruker den nye metoden. Spesifisitet er prosentandelen av dyrknings-negative prøver som også er negative med den nye metoden. Falsk-positive testresultater betegner dyrknings-negative prøver som er positive med den nye metoden, mens falsk-negative resultater betegner dyrknings-positive prøver som er negative med den nye metoden.

### Reproduserbarhet

Sammenligning av test resultatene må ta i betraktning reproduserbarheten til referanse metoden og den nye metoden. Dyrkning betraktes som gull-standarden i periodontal mikrobiologi på grunn av lang historikk med anvendelse i periodontal mikrobiologi. Dyrkning kan imidlertid vise varierende reproduserbarhet. I nedenforstående tabell er ALLE identifikasjonsteknikker tatt med for å belyse nytten av de forskjellige ved klonal sammenligning.

Metode	Fordel	Ulempe	Feilkilde
<b>Dyrkning</b>	<p>"Gull-standarden"</p> <p>Lang erfaring med metoden</p> <p>Identifiserer levende bakterier</p>	<p>Mindre enn halvparten av bakteriene i en prøve er dyrkbare</p> <p>Kan kun bruke levende bakterier</p> <p>Begrenset bruksområde</p> <p>Kan ikke skille mellom bakteriekloner, kun identifisere arter etter morfologi</p>	<p>Sensitiv for menneskelige feil</p> <p>Feil valg av prøve</p> <p>Transport</p>
<b>DNA-DNA hybridisering</b>	Relativt høy grad av sammenliknbarhet		<p>Feil valg av prøve</p> <p>Ekstraksjonsprosedyre</p> <p>Valg av prober/primere</p> <p>Kontaminasjon</p>
<b>Restriksjons-analyse</b>	Relativt høy grad av sammenliknbarhet		Feil valg av prøve

			Ekstraksjonsprosedyre Valg av prober/primere Kontaminasjon Transport
<b>Checkerboard</b>	Kan analysere mange bakteriearter på en gang		Feil valg av prøve Kryssreaksjoner Ekstraksjonsprosedyre Valg av probe/primere Kontaminasjon
<b>PCR analyse</b>	Høy sensitivitet Hastighet	For høy sensitivitet Falske positive	Krysshybridisering Feil valg av prøve Ekstraksjonsprosedyre Valg av probe/primere Kontaminasjon Transport
<b>Real time PCR</b>	Enkel Rask Høy reproducerbarhet	For høy sensitivitet Falske positive	
<b>Random Primer PCR</b>	Den mest sensitive metoden	Svært teknikk sensitiv og avhengig av høy grad av stramme rutiner	Veldig sensitiv for tekniske feil, (for eksempel labens strømmuttak) Feil valg av prøve Ekstraksjonsprosedyre Valg av probe/primer Kontaminasjon Transport

## **7.0 FORUTSETNINGER**

Skal man i det hele tatt diskutere smitte mellom individer i periodontal sammenheng må man akseptere den spesifikke eller økologiske infeksjonshypotese. En uspesifikk infeksjon kan ikke overføres.

Den andre forutsetningen for smitte er definisjonen som styrer forståelsen av begrepet smitte. Den bredeste definisjonen er «overføring av mikroorganismer og virus». Denne definisjonen beskriver «smitte» uansett om recipient blir bærer eller får en infeksjøs sykdom. I og med at vår oppgave stiller spørsmålet «er periodontitt en smittsom sykdom?», forutsettes at recipienten har periodontitt. Den tar ikke stilling til om donor har periodontitt eller er bærer av den overførte mikroorganisme. Vi skal altså diskutere om periodontitt er en **infeksjøs** sykdom (WHO definitions).

Den tredje forutsetningen for diskusjonen er om bakteriene som man antar gir periodontitt er mulig å 1)isolere og 2)genetisk spesifisere godt nok til å kunne sammenlikne kloner i donor og recipient.

Den siste forutsetning for diskusjonen er det viktigste. Ethvert menneske får overført sin fulle orale mikroflora fra sine omgivelser. Denne bygges opp fra det øyeblikk man fødes og er moden når verten når 20 – års alderen. Etter dette foregår kun få utskiftninger og tilskudd til floraen. Et individ bygger således opp sin endogene (kommensale) orale flora med bidrag fra sine omgivelser og blir således til en vertsorganisme som lever i symbiose med sin ervervede orale flora<sup>(37)</sup>. Får individet en oral flora uten innslag av patogener er risikoen for å utvikle sykdom mindre enn hvis det får innslag av (antatt) patogene mikroorganismer som *P. gingivalis* og *A. actinomycetemcomitans*.

Når man ser på *A. actinomycetemcomitans*, har vitenskapelige studier dokumentert god nok isolering, identifikasjon og genotyping til å påvise at et individ har samme klonale type som sine foreldre<sup>(39,40)</sup>. I tilfellet *P. gingivalis* er det dokumentert at man finner samme klonale type innen en familie<sup>(38)</sup>, og kan dermed anta at bakterien overføres mellom voksne – dvs kan diskuteres som et smittetilfelle. I disse to tilfellene er altså en *A. actinomycetemcomitans* infeksjon definitivt ikke en infeksjøs, smittsom sykdom, mens en *P. gingivalis* infeksjon kan være det.

Den klassiske definisjonen på en smittsom, infeksjøs sykdom kan således ikke brukes på periodontal sykdom. Det lengste man kan strekke seg er at periodontitt, som spesifikk infeksjon, uansett er en opportunistisk infeksjon der bakterieagens er overført (smittet) fra andre mennesker på et eller annet tidspunkt.

Periodontitt kan således ikke ansees å være en smittsom sykdom.

**REFERANSER:**

- 1) Lindhe J. Chapter 11 Pathology of periodontitis. Clinical Periodontology and Implant Dentistry s. 285-294
- 2) Plancak D, Jorgic-Srdjak K, Curilovic Z. New Classification of Periodontal Diseases. Department of Periodontology, School of Dental Medicine, University of Zagreb
- 3) Hansen BF. Kliniske rutiner, s. 10. Avdeling for Periodonti, Universitetet i Oslo
- 4) Consensus report for periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. (1996). Annals of Periodontology 1, 926-932
- 5) Eisenmann AC, Eisenmann R, Sousa O, Slots J. Microbiological study of localized juvenile periodontitis in Panama. J Periodontol 1983;54(12):712-713
- 6) Carina Maciel da Silva-Boghossian, Renata Martins do Souto, Ronir R. Luiz and Ana Paula Vieira Colombo. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. Arch Oral Biol 2011 Sep; 56(9):899-906
- 7) Preus HR, Khanifam P, Kolltveit K, Mørk C, Gjermo P. Periodontitis in psoriasis patients: a blinded, case-controlled study. Acta Odontol Scand 2010; 68(3):165-170
- 8) Lindhe J. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Chapter 9 Periodontal infections – Mechanisms of pathogenicity s.245-249
- 9) Murray PA, Levine MJ, Reddy MS, Tabak LA, Bergey EJ. (1986). Preparation of a sialic acid-binding protein from *Streptococcus mitis* KS32AR. Infection and Immunity 53, 359-365
- 10) Breivik TJ. Sorg og røyking påvirker utvikling av periodontitt
- 11) Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG Jr., Higginbottom FL, Duff GW. (1997). The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. Journal of Clinical Periodontology 24, 72-77
- 12) Lindhe J. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Chapter 18 Chronic Periodontitis s. 420-426
- 13) Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. Periodontology 2000, Vol. 20, 1999, 7-13
- 14) Kinder SA, Holt SC. (1989). Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. Infection and Immunity 57, 3425-3433
- 15) <http://no.wikipedia.org/wiki/Smitte>
- 16) Gibbons RJ. (1984). Adherent interaction which may affect microbial ecology in the mouth. Journal of Dental Research 63, 378-385
- 17) [http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainArea\\_5661&MainArea\\_5661=6039:0:15,5078:1:0:0:::0:0](http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainArea_5661&MainArea_5661=6039:0:15,5078:1:0:0:::0:0)
- 18) Lindhe J. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Chapter 7 Epidemiology – Risk factors for periodontitis s. 141-156
- 19) Lindhe J. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Chapter 35 Importance of supragingival plaque removal s.705-706
- 20) Molund L., Pettersen S., Mosdøl A., Holst D. Prediktorer for oral hygieneatferd i den voksne norske befolkningen. Nor Tannlegeforen Tidende 2009; 119; 298-302
- 21) Dybvik AH, Holst D, Hansen BF. Forekomst av tanntap og periodontalt bentap. En tverrsnittsundersøkelse blant 2 aldersgrupper i Nord-Trøndelag

- 22) Asikainen S, Chen C, Slots J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. Oral Microbiol Immunol 1996 Dec; 11(6):387-394
- 23) Sanz M., Quirynen M., on behalf of the European Workshop in Periodontology Group A. Advances in the aetiology of periodontitis. Group A Consensus report of the 5th European Workshop in Periodontology
- 24) Papaioannou W, Panis V, Nakou M, Mantzavinos Z. Contamination of interdental brushes by periodontopathogens. Clin Oral invest (2002) 6: 75-78
- 25) Asikainen S, Chen C, Alaluusua S, Slots J. Can one acquire periodontal bacteria and periodontitis from a family member? J Am Dent Assoc 1997; 128; 1263-1271
- 26) Øzmeric N., Preus H., Olsen I. Intrafamilial transmission of black-pigmented putative periodontal pathogens. Anaerobe (1999) 5, 571-577
- 27) Tinoco E, Sivakumar M, Preus H. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with localized juvenile periodontitis. J Clin Periodontol 1998 Feb;25(2):99-105
- 28) Van Winkelhoff A., Boutaga K. Transmission of periodontal bacteria and models of infection. J Clin Periodontol 2005; 32 (Suppl. 6): 16-27
- 29) [http://drlentini.com/documents/information/1\\_drugs\\_and\\_periodontium.pdf](http://drlentini.com/documents/information/1_drugs_and_periodontium.pdf)
- 30) Lee Y, Straffon LH, Welch KB, Loesche WJ. The transmission of anaerobic periodontopathic organisms. J Dent Res 2006 85:182
- 31) Lindhe J. Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Chapter 12 Modifying factors s. 307-322
- 32) Marsh PD, Martin MV. Oral microbiology. Chapter 6 Plaque-mediated diseases – dental caries and periodontal diseases s.117-126
- 33) Baer, P.N The case for periodontosis as a clinical entity. Journal of Periodontology, 42,516- 519. 1971
- 34) Feres M, Cortelli SC, Figueiredo LC, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological basis for periodontal therapy. J Appl Oral Sci 2004; 12(4):256-66
- 35) Walker CB, Gordon JM, Magnusson I, Clark WB. A role for antibiotics in the treatment of refractory periodontitis. J Periodontol 1993 Aug;64(8 Suppl):772-781
- 36) Hill RW, Ramfjord SP, Morrison EC, Appleberry EA, Caffesse RG, Kerry GJ, Nissle RR. Four types of periodontal treatment compared over two years. J Periodontol 1981; 52: 655-662
- 37) Preus, HR. Future research ecosystems: consequences of disturbances and use of antimicrobial agents. Journal Of Clinical Periodontology 1990; 17:530-1
- 38) van Steenberghe TJ, Petit MD, Scholte LH, van der Velden U, de Graaff J. Transmission of *Porphyromonas gingivalis* between spouses. J Clin Periodontol. 1993 May;20(5):340-5
- 39) Preus HR, Zambon JJ, Dunford RG, Genco RJ. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. J Periodontol 1994 Jan;65(1):2-7
- 40) Preus HR, Haraszty V, Zambon JJ, Genco RJ. Differentiation of strains of *A. actinomycetemcomitans* by the arbitrarily primed polymerase chain reaction J Clin Microbiol 1993; 31: 2773 - 2776
- 41) Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Martin R, Roberts K, Walter P. Essential cell biology Second edition. Chapter 10 Manipulating genes and cells s. 328-330, 336-338

- 42) Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's Biochemistry 4th edition. Chapter 33 Biotechnology and human disease s. 465-466, 473, 475, 479-482
- 43) <http://hal.weihenstephan.de/genglos/asp/genreg.asp?nr=182>
- 44) Van Steenberghe TJM, Menard C, Tjihof CJ, Mouton C og de Graaf J. Comparison of three molecular typing methods in studies of transmission of *Porphyromonas gingivalis*. J. Med. Microbiol. – Vol. 39 (1993), 416-421
- 45) Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, Lakhssassi N, Sixou M. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. Oral Microbiology Immunology 2006: 21: 341-346
- 46) Von Troil-Linden B, Saarela M, Mättö J, Alaluusua S, Jousimies-Somer H, Asikainen S. Source of suspected periodontal pathogens re-emerging after periodontal treatment. J Clin Periodontol 1996: 23: 601-607
- 47) <http://en.wikipedia.org/wiki/Biofilm>
- 48) <http://www.raisingthebarcc.com/CSlhouston.htm> (bilde av elektroforese)
- 49) [http://snl.no/.sml\\_artikkel/biofilm](http://snl.no/.sml_artikkel/biofilm)
- 50) Preus HR. Seminar: Strategier ved behandling av periodontal sykdom
- 51) Marsh PD, Martin MV. Oral microbiology. Chapter 4 Acquisition, adherence, distribution and metabolism of the oral microflora s. 50-53
- 52) <http://www.aspergillus.org.uk/education/lewiswhite.pdf>
- 53) Lamont RJ, Burne RA, Lantz MS, Leblanc DJ. Oral microbiology and immunology. Chapter 4 Isolation, Classification, and Identification of Oral Microorganisms s. 73-87
- 54) Hauge JG, Aakvaag RK, Christensen TB. Biokjemi – En grunnbok 4. Utgave. Kapittel 16 Genteknologi s. 166-170
- 55) Chen C, Slots J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. Periodontology 2000, Vol. 20, 1999, 53-64
- 56) Anne Scheie, Cand. odont, Dr. odont, Spesialist i endodonti, Institutt for oral biologi
- 57) Pozhitkov AE, Beikler T, Flemmig T, Noble PA. High-throughout methods for analysis of the human oral microbiome. Periodontology 2000, Vol. 55, 2011, 70-86
- 58) Aas J. Forelesning: Munnhulen som bolig for mikroorganismer.
- 59) [http://www.favorgen.com/products\\_for%20res\\_nae\\_faPDE\\_MidiMaxi\\_1.jpg](http://www.favorgen.com/products_for%20res_nae_faPDE_MidiMaxi_1.jpg) (bilde av DNA-ekstraksjon)
- 60) <http://mikroforum.no/index.php?page=morkefelt-analyse>
- 61) [http://www.marvistavet.com/html/urinary\\_tract\\_infection.html](http://www.marvistavet.com/html/urinary_tract_infection.html) (bilde av bakteriedyrking)
- 62) Blix IJ, Hars R, Preus HR, Helgeland K. Entrance of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* into Hep-2 cells in vitro. Journal of periodontology 63, 723-728
- 63) Macdonald JB, Gibbons RJ, Socransky SS. (1960). Bacterial mechanisms in periodontal disease. Annals of the New York Academy of Sciences 85, 467-478
- 64) Madianos PN, Papapanou PN, Sandros J. (1997). *Porphyromonas gingivalis* infection of oral epithelium inhibits neutrophil transepithelial migration. Infection and immunity 65, 3983-3990
- 65) Haffajee AD, Socransky SS. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. Periodontology 2000 5, 78-111
- 66) Lai CH, Listgarten MA, Shirakawa M, Slots J. (1987). *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. Oral microbiology and immunology 2, 152-157

- 67) Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr., Socransky SS. (1997). The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology* 24, 324-334
- 68) Bodet C, Chandad F, Grenier D. (2006). Inflammatory responses of a macrophage/epithelial co-culture to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*. *Microbes and Infection* 8, 27-35
- 69) Listgarten MA. (1965). Electron microscopic observations of the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Journal of Periodontology* 36, 328-339
- 70) Listgarten MA, Socransky SS. (1964). Ultrastructural characteristics of a spirochete in the lesion of acute necrotizing ulcerative gingivostomatitis (Vincent's infection). *Archives of Oral Biology* 9, 95-96.
- 71) Ishihara K, Miura T, Kuramitsu HK, Okuda K. (1996). Characterization of the *Treponema denticola* prtP gene encoding a prolyl-phenylalanine-specific protease (dentilisin). *Infection and immunity* 64, 5178-5186
- 72) Ellen RP, Galimanas VB. (2005). Spirochetes at the forefront of periodontal infections. *Periodontology* 2000 38, 13-32
- 73) Simonson LG, Goodman CH, Bial JJ, Morton HE. (1988). Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. *Infection and immunity* 56, 726-728
- 74) Simonson LG, Robinson PJ, Pranger RJ, Cohen ME, Morton HE. (1992). *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *Journal of periodontology* 63, 270-273
- 75) Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J. (1982). The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Journal of periodontology* 53, 223-230
- 76) Tanner ACR, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA Socransky SS. (1979). A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *Journal of Clinical Periodontology* 6, 278-307
- 77) Yoshida-Minami I, Suzuki A, Kawabata K, Okamoto A, Nishihara Y, Nagashima S, Morisaki I, Ooshima T. (1997). Alveolar bone loss in rats infected with a strain of *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* isolated from a child with prepubertal periodontitis. *Journal of periodontology* 68, 12-17
- 78) Rooney J, Wade WG, Sprague SV, Newcombe RG, Addy M. (2002). Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study. *Journal of Clinical Periodontology* 29, 342-350
- 79) Soder B, Airila Mansson S, Soder PO, Kari K, Meurman J. (2006). Levels of matrix metalloproteinases-8 and -9 with simultaneous presence of periodontal pathogens in gingival crevicular fluid as well as matrix metalloproteinase-9 and cholesterol in blood. *Journal of Periodontal Research* 41, 411-417
- 80) Plaut HC. (1894). Studien zur bakteriellen Diagnostik der Diphtherie und der Anginen. *Deutsche Medicinische Wochenschrift*. 20, 920-923
- 81) Papapanou PN, Neiderud AM, Papadimitriou A, Sandros J, Dahlen G. (2000). "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and their antibody responses: a case-control study. *Journal of Periodontology* 71, 885-897
- 82) Herrera D, Roldan S, Gonzalez I, Sanz M. (2000). The periodontal abscess (I) Clinical and microbiological findings. *Journal of Clinical Periodontology* 27, 387-394

- 83) van der Velden U, Varoufaki A, Hutter JW, Xo L, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, Loos BJ. (2003). Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *Journal of Clinical Periodontology* 30, 603-610
- 84) Onoue S, Imai T, Kumada H, Umemoto T, Kaca W, Isshiki Y, Kaneko A, Kawahara K. (2003). Serum antibodies of periodontitis patients compared to the lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Microbiology and Immunology* 47, 51-55
- 85) Jewett A, Hume WR, Le H, Huynh TN, Han YW, Cheng G, Shi W. (2001). Induction of apoptotic cell death in peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells by an oral bacterium, *Fusobacterium nucleatum*. *Infection and Immunity* 68, 1893-1898
- 86) Cisar JO, Sandberg AL, Mergenhagen SE. (1984). The function and distribution of different fimbriae on strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. *Journal of Dental Research* 63, 393-396