

**MUNI**



# **Preventivní zubní lékařství – cvičení**

---

MASARYKOVA UNIVERZITA

## ZLPZ041C PREVENTIVNÍ ZUBNÍ LÉKAŘSTVÍ - CVIČENÍ

### Mateřské obory

Zubní lékařství (program LF, M-ZL)

### Cíle předmětu

*Náplň oboru:* Studenti se učí etiologii a prevenci zubního kazu a parodontopatií a základům orální hygieny a jejímu významu pro udržování zdraví jedince.

*Základní cíle výuky předmětu:* Studenti získávají znalosti o příčinách zubního kazu a parodontopatií, učí se diagnostice, prevenci a terapii těchto chorob se zaměřením na základní profylaktické postupy.

*Hlavní náplň předmětu:* Cílem výuky je seznámit studenty s významem orální hygieny, příčinami zubního kazu a parodontopatií, s diagnostikou rané fáze těchto onemocnění a zahájením účinných preventivních opatření. Je zdůrazněn význam epidemiologických studií a studenti jsou prakticky seznamováni se stanovením základních indexů používaných později v konzervačním zubním lékařství a parodontologii. Učí se odstraňovat zubní kámen, mikrobiální povlak a provádět kyretáže parodontálních chobotů. Seznamují se s metodami vedoucími ke zvýšení odolnosti skloviny; učí se principy lokální i celkové fluoridaci, zásadám správné výživy a zásadám terapie.

### Výstupy z učení

Student je schopen diagnostikovat rané fáze zubního kazu a parodontopatií a zahájit účinná preventivní opatření. Rozumí principu získávání epidemiologických dat a je schopen stanovit základní indexy v konzervačním zubním lékařství a parodontologii. Ovládá odstraňování zubního kamene, mikrobiálního povlaku a provádění kyretáže parodontálních chobotů. Je schopen aplikovat metody vedoucí ke zvýšení odolnosti skloviny, metody lokální i celkové fluoridace a zásady správné výživy.

## Návod ke cvičení: **Molekulárně biologické a jiné testy používané v preventivním zubním lékařství**

Autoři: RNDr. Petra Bořilová Linhartová, Ph.D., MDDr. Michaela Bartošová, Ph.D.

Cílem cvičení je seznámit studenty s moderními molekulárně biologickými testy, které mohou být využívány v preventivním zubním lékařství. Mezi tyto testy se řadí komerční kity k určení rizika vzniku zubního kazu a parodontopatií. Principem většiny metod je amplifikace genu pro bakteriální 16SrRNA (nejčastěji), a tedy detekce a kvantifikace orálních bakterií. Studenti si prakticky vyzkouší odběr vzorku zubního plaku a sulkulární tekutiny a vyplnění průvodní žádanky, následně bude externě provedena laboratorní analýza několika vzorků, v nichž budou stanoveny vybrané kariogenní bakterie. Výsledky analýzy budou studentům zaslány mailem, studenti si je zařadí do svého protokolu ze cvičení. Ve cvičení bude studentům ukázáno a vysvětleno několik vzorových závěrečných zpráv s laboratorním nálezem, aby je dokázali sami interpretovat. Klinický obraz a mikrobiologický nálezn bude doplněn o zjištěné vlastnosti sliny pacienta a ze všech těchto informací vyvodí studenti doporučení pro konkrétního pacienta.

Výstupem ze cvičení bude prohloubení teoretických znalostí v oblasti DNA diagnostiky a molekulárně biologických metod, získání praktické dovednosti odběru vzorku pro analýzu orálních bakterií, zkušenost se stanovením vlastností sliny, určením rizika vzniku zubního kazu u pacienta, a především schopnost interpretace laboratorního nálezu pacientovi s důrazem na prevenci zubního kazu a parodontopatií.

## TEORETICKÝ ÚVOD

Onemocnění dutiny ústní u dětí i dospělých jsou aktuálním problémem současné medicíny, proto existuje intenzivní snaha o co nejpřesnější a nejjednodušší diagnostiku, stanovení optimálního léčebného plánu dle individuálního nálezu a současně o posílení preventivních opatření pomocí behaviorální intervence.

Pacienti nejčastěji trpí zubním kazem a/nebo onemocněním závěsného aparátu zubů, kdy v etiopatogenezi obou těchto multifaktoriálních onemocnění hrají roli orální bakterie. Jelikož bakterie schopné vyvolat onemocnění (tzv. patogenní bakterie) soutěží s běžnými orálními symbiotickými druhy v dutině ústní, tak jejich pomnožení vede k narušení rovnováhy a ke změně složení orálního biofilmu, k tzv. dysbióze.

### **Slina**

Slina je považována za ochranný faktor mnoha chorob dutiny ústní. Svým tokem odplavuje zbytky potravy z dutiny ústní a ovlivňuje složení orální mikroflóry. Současně slina obsahuje proteiny s různou funkcí (imunoprotektivní, antimikrobiální, pufrovací atd.) a ionty. Pufrovací systémy, které neutralizují kyselé prostředí v dutině ústní, jsou tři: fosfátový, bílkovinný a bikarbonátový (hydrogenuhličitanový). pH v ústech je ovlivňováno nejenom složením stravy a nápojů (sladkosti, kyselé nápoje apod.), ale také např. užíváním některých léčiv či celkovým zdravotním stavem pacienta.

K testování vlastností sliny byly v minulosti nabízeny komerční testy CRT Buffer Refill 6 (Ivoclar Vivadent) a Saliva Check Buffer (GC Europe), které jsou v současnosti nedostupné.

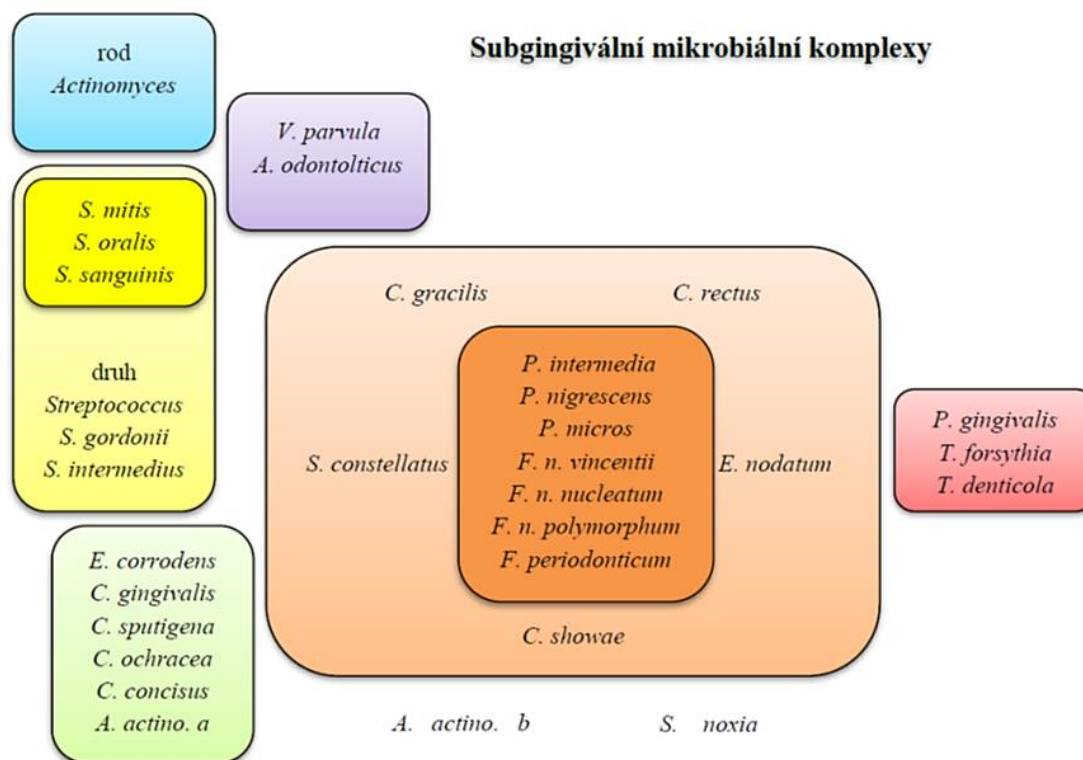
### **Zubní kaz a orální bakterie**

Při vzniku a rozvoji zubního kazu hraje úlohu častý a/nebo nadměrný příjem sacharidů (zejména sacharózy) a přítomnost grampozitivního fakultativního anaeroba *Streptococcus mutans* a dalších kariogenních bakterií (*Lactobacillus* sp., *Actinomyces* sp.). Tyto bakterie jsou schopné metabolizovat fermentovatelné sacharidy za vzniku organických kyselin zodpovědných za demineralizaci skloviny. Zubní kaz postihuje dočasnou i stálou dentici a orální bakteriální profil je závislý nejenom na typu dentice, ale i na rozsahu kariézního procesu.

### **Parodontopatie a orální bakterie**

Dysbiotický stav v dutině ústní může vést také k onemocnění závěsného aparátu zubů, jedná se převážně o polymikrobiální infekci, avšak bez jednoznačné spojitosti se specifickou bakterií/bakteriemi. Nejčastěji jsou u pacientů s parodontitidou detekovány gramnegativní anaeroby červeného komplexu (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) a oranžového komplexu (*Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra*, *Prevotella intermedia*,

*Campylobacter rectus*), (Obr. 1). Z přehledu současné literatury nevyplynuly žádné kvalitativní rozdíly ve složení orálního mikrobiomu mezi pacienty s agresivní a s chronickou parodontitidou. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* je sice spojován se zvýšeným rizikem lokalizované agresivní parodontitidy, především přítomnost vysoce virulentního klonu JP2 v subgingiválním prostoru může sloužit při predikci vzniku a progresu onemocnění, bývá však prokazován pouze u určité malé podskupiny pacientů.



Obr. 1 Subgingivální mikrobiální komplexy dle Socranského

Detekce parodontálních bakterií může být vhodným doplňkem ke klinickému a rentgenologickému vyšetření pacientů s parodontitidou. Při nálezů určitých parodontálních bakterií ve vyšším počtu je nejvhodnějším postupem odeslat pacienta na specializované pracoviště, kde parodontolog provede detailní klinické i mikrobiologické vyšetření, na jehož základě poté zvolí odpovídající terapii. Navíc parodontolog může při určitých stavech (diagnózy K052, K053, K055, K056) vykázt mikrobiologické vyšetření k úhradě některým zdravotním pojišťovněm (např. VZP), což není v kompetenci praktického zubního lékaře.

### Indikace k vyšetření parodontálních bakterií

Pro provedení testu se rozhodujeme zejména v těchto případech:

- máme podezření na agresivní formu parodontitidy,

- počáteční instrumentální fáze terapie parodontitidy nepřinesla předpokládaný výsledek a onemocnění parodontu nereaguje i na pečlivě provedené subgingivální ošetření u pacienta s výbornou ústní hygienou,
- před lalokovou operací s využitím řízené tkáňové regenerace u pacientů s pokročilou parodontitidou,
- před rozsáhlou a náročnou protetickou nebo ortodontickou léčbou u parodontologických pacientů se zbytkovými parodontálními choboty,
- v rámci přípravy implantologického ošetření u pacientů s parodontitidou a při řešení komplikací implantologické léčby (periimplantitis),
- u pacientů s pokročilou parodontitidou a zvýšeným zdravotním rizikem.

Obecně lze k vyšetření orálních bakterií s patogenním potenciálem přistoupit tehdy, když je předpoklad, že by vyšetření a jeho výsledky mohly u pacienta zvýšit zájem o péči o jeho dutinu ústní a posílit tak prevenci orálních onemocnění.

### **Farmakoterapie parodontopatií**

Bakterie *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* a *T. forsythia* je velmi obtížné eliminovat z parodontálního chobotu pouze mechanicky (kyrety, sonické nástroje), proto v případech pokročilých parodontitid s agresivním průběhem může být léčebný plán modifikován přidáním antibiotik.

V současné době neexistuje pro léčbu parodontopatií protokol s prokazatelnou nadřazeností, existují však studie navrhuující konkrétní účinné látky nebo postupy pro léčbu pacientů se specifickým mikrobiálním profilem. Vyšetření subgingivální mikroflóry s následným podáním antibiotik má však význam pouze u pacientů s dobrou ústní hygienou. Pokud budou u pacientů definovány klíčové rizikové bakteriální druhy, je možné individuálně přistoupit k jejich eradikaci/potlačení a současně umožnit rekolonizaci příznivé a zdravé flóry, ať už konvenčními metodami nebo novými biotechnologickými přístupy.

V meta-analytické studii zaměřené na význam antibiotik podaných během konzervativní parodontologické léčby se ukázalo, že jejich přídatný efekt se projevil zejména u osob se závažnou parodontitidou mladších než 55 let. Podání antibiotik by mělo být indikováno velmi individuálně, jejich paušální použití je nevhodné. K tomu by právě molekulárně biologické testování subgingivální mikroflóry mohlo v jednotlivých případech přispět.

### **Stanovení orálních bakterií**

V současné době existuje asi 770 bakteriálních druhů zařazených do databáze lidského orálního mikrobiomu (Human Oral Microbiome Database, HOMD). HOMD propojuje data získaná

sekvenčními technologiemi s fenotypovými, fylogenetickými, klinickými a bibliografickými informacemi.

Stanovení vybraných mikroorganismů, které osidlují dutinu ústní, může být založena na několika základních principech. V minulosti byly komerčně nabízeny testy pro analýzu orálních bakterií s patogenním potenciálem, které mohly být prováděny přímo v ordinaci zubního lékaře, jejich výroba však byla ukončena. Jednalo se o testy založené na kultivaci bakterií na selektivních médiích nebo na imunochromatografické detekci antigenu, např. CRT® bacteria Refill 6 (Ivoclar Vivadent), Saliva-Check Mutans (GC Europe), nebo Dentocult® SM Strip mutans, Dentocult® LB, Dentocult® CA (Orion Diagnostika).

V současnosti lze pro stanovení vícero kariogenních a/nebo parodontálních bakterií využít několika komerčních testů, které jsou metodicky založeny na PCR. Principiálně jde o identifikaci specifické sekvence genu pro 16S podjednotku ribozomální RNA (16S rRNA) pomocí metod využívajících polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Je však možné stanovovat i jiné geny vhodné k identifikaci konkrétního bakteriálního druhu.

Ke stanovení je třeba, aby byl odebrán vzorek zubního plaku a/nebo sulkulární tekutiny (Obr. 2) a přiložena žádanka s identifikací pacienta a lokalizace zubu, ze kterého byl vzorek odebrán. Při porovnání výsledků před a po terapii je nutné dodržovat standardizovaný postup odběru, který je uveden v návodu a používat stejný typ testu. Z externí laboratoře jsou výsledky mikrobiologického vyšetření doručeny nejpozději do 14 dnů, někdy i s doporučením vhodné antibiotické léčby.



Obr 2. Odběr zubního plaku a sulkulární tekutiny z dočasněho zubu postiženého zubním kazem a se zánětem gingivy pomocí papírového endodontického čepu

Ze vzorku je nejprve izolována genomová DNA, následně je amplifikován celý gen 16SrRNA nebo jeho část. 16S rRNA je 1542 nukleotidů dlouhá nukleová kyselina, která tvoří složku spolu s 21 proteiny menší 30S podjednotky ribozomu prokaryot. Kromě konzervativních sekvencí obsahuje i variabilní oblasti, které jsou charakteristické pro bakteriální druh. Analýza sekvence 16SrRNA se používá jak k identifikaci bakteriálního druhu, tak pro tvorbu fylogenetických stromů znázorňujících možnou příbuznost studovaných mikroorganismů.

Protože je při PCR nezbytné použít termocykler (Obr. 3), tak provedení analýzy není možné v běžné zubní ordinaci a je nutné kontaktovat externí laboratoř. V České republice lze oslovit firmy Protean, GenTrend, HAIN LIFESCIENCE GmbH (distributor v ČR Eurotex s.r.o.) nebo PřF MU, které analýzu vybraných bakterií nabízí formou služby. Kvalitativní analýza je možná při použití všech zmíněných testů, rozdíl je však v možnosti determinace počtu bakteriálních druhů v jedné reakci a v přesnosti (citlivosti) kvantitativního stanovení. Jako nejvýhodnější se jeví multiplexová PCR v reálném čase, jelikož umožňuje stanovení vícero bakteriálních druhů v jedné reakci a současně poskytuje i informaci o jejich počtu ve vzorku, a to i v procentuálním zastoupení vůči celkovému mikrobiomu.



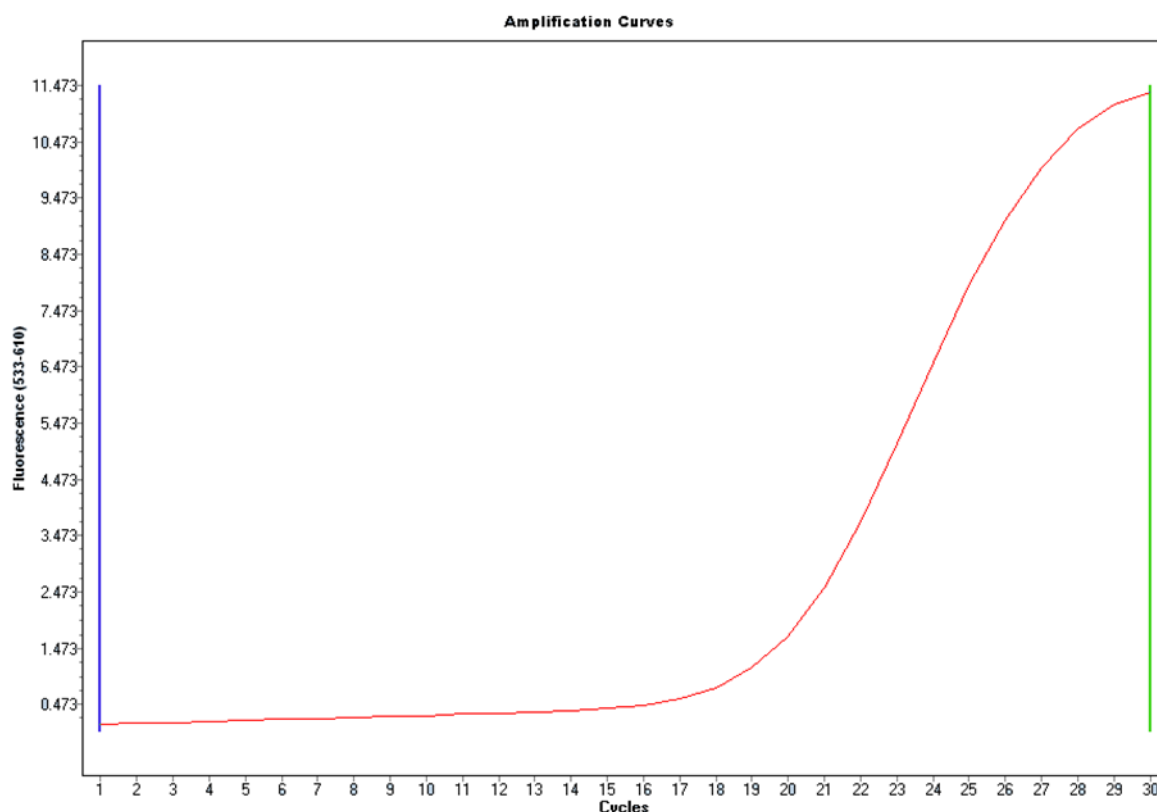
Obr 3. Termocykler LightCycler® 480 (Roche)



Pro stanovení mikroorganismů z parodontálního sulku je možné oslovit také firmy v Německu – Carpegen GmbH (test Carpegen® Perio Diagnostik, dříve Meridol® Diagnostik) nebo ve Švýcarsku – IAI AG (iaiPadoTest). Italská firma Saccace Biotechnologies pak nabízí k zakoupení sadu (PeriodontScreen Real-TM, v ČR distribuováno firmou Dynex), s jejíž pomocí si ve vlastní laboratoři s odpovídajícím laboratorním vybavením lze vybrané orální mikroorganismy vyšetřit (obdobně lze zakoupit i sady od HAIN LIFESCIENCE GmbH). Uvedené testy se stanovením založeným na principu PCR se prozatím používají zejména při výzkumu etiopatogeneze vybraných onemocnění dutiny ústní.

### Multiplexová PCR

Multiplexová PCR označuje použití kvantitativní PCR (qPCR) pro amplifikaci několika různých DNA sekvencí současně, jako kdyby se provádělo mnoho oddělených PCR reakcí společně v jedné reakci. V reakční směsi je použito vícero sad primerů s různými fluorescenčními barvami, které musí být navrženy tak, aby měly podobnou teplotu nasedání na cílovou sekvenci nukleové kyseliny. V reakci dochází k syntéze amplikonů různých velikostí, které jsou specifické pro různé sekvence DNA. K jejich detekci a odlišení slouží právě fluorescenční barviva (Obr. 4).



Obr. 4 Amplifikační křivka kvantifikace celkových bakterií u čisté kultury *Streptococcus mutans*

Hlavní výhodou multiplexového přístupu je detekce více než jedné bakterie ve vzorku, významné úspory nákladů na reagentie při qPCR a časová nenáročnost. Na druhou stranou je však nutno podotknout, že je omezen počet stanovovaných bakteriálních druhů v jedné reakci. Tyto technologie jsou v současné době stále drahé a nejsou k dispozici pro rutinní analýzu vzorků většiny klinických laboratoří.

Vyvození závěrů pouze na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti jednotlivých bakteriálních druhů s patogenním potenciálem ve vzorku může být zavádějící, protože tyto bakterie jsou velmi často nalezeny v nízkých počtech i u zdravých subjektů. Objektivizace nálezu lze dosáhnout tím, že je kvantita bakteriálního druhu spojovaná s rizikem daného onemocnění porovnána s celkovým množstvím orálních bakterií.

### **Rezistence k antibiotikům**

Přínosem testování mikrobiálního profilu pacienta v klinické praxi by bylo, pokud by testy odhalily také případnou rezistenci bakterií ke konkrétním antibiotikům. Ačkoliv některé firmy (Protean a GeneTrend) průkaz rezistence k beta-laktamovým antibiotikům nabízejí, je nutné poznamenat, že je toto založeno na analýze genů kódujících betalaktamázy v DNA (chromozomální, plazmidová, transpozonová). Pro přesné určení, zda je gen pro betalaktamázu exprimován a bakterie je tedy rezistentní k beta-laktamovým antibiotikům, by měla být provedena i analýza fenotypu.

### **Shrnutí**

Na základě komplexního mikrobiologického vyšetření jako doplňku ke klinickému vyšetření lze lépe určit míru rizika vzniku/rozvoje zubního kazu a/nebo resorpce závěsného aparátu zubu a kosti. Současně lze tyto testy využít i k analýze infekčních komplikací po implantologické léčbě.

K paušálnímu použití molekulárně biologických metod v parodontologii má řada odborníků výhrady. Jednou z nich je testování pouze omezeného množství lokalit, což může vést ke zkresleným výsledkům. Proto se např. doporučuje k vyšetření vybírat místa s nejhlubšími aktivními parodontálními choboty, kde očekáváme výskyt mikroorganismů asociovaných s agresivními formami parodontitid. Další výhradou je fakt, že řada testů nerozlišuje invazivní (patogenní) a nepatogenní sérotypy bakterií, což může vést k nadbytečné antibiotické léčbě („overtreatment“).

S vyšší životní úrovní západní civilizace roste poptávka pacientů po nadstandardní zdravotní péči, ať už se jedná o přímé výkony nebo i o laboratorní testování. Na českém trhu (eventuálně v EU) jsou nabízeny testy, kterými je možné zjišťovat predispozice pacienta k vzniku zubního kazu a onemocnění parodontu na základě analýzy bakterií v dutině ústní a interleukin-1 genového polymorfizmu.

Názorná prezentace výsledků analýz orální mikroflóry může být vhodným intervenčním nástrojem praktického zubního lékaře k motivaci pacienta k péči o jeho orální zdraví. Vzhledem ke komplexnímu charakteru vybraných orálních onemocnění je vždy nutné výsledky získané laboratorními testy posuzovat společně s detailním klinickým nálezem.

## PRAKTICKÁ ČÁST

V praktické části cvičení studenti provedou klinické vyšetření pacienta (tj. studenta), stanoví množství stimulované sliny, její pH a pufrovací kapacitu, budou odebírat zubní plak a sulkulární tekutinu z konkrétní lokality a budou seznámeni s vyhodnocením vzorových výsledků po laboratorní analýze. Důraz bude kladen na interpretaci mikrobiologického nálezu v kontextu klinického obrazu a zjištěných vlastností sliny a navržení preventivních opatření dle individuálního profilu pacienta.

Ošetřující zubní lékař/student dodržuje dress code LF MU a pracuje s ochrannými pomůckami dle nařízení pracoviště.

Pacient je poučen, aby 1 hodinu před odběrem nejedl, nekouřil, nežvýkal, neprováděl ústní hygienu a nepil (kromě neperlivé vody).

### 1. Klinické vyšetření pacienta

Pacient (student) musí být nejprve detailně klinicky vyšetřen. Stanovení indexu KPE (zub s kazem/s výplní/extrahovaný) je provedeno v předchozím cvičení tohoto předmětu. Pozn. Ideálně by vyšetření mělo zahrnovat i pořízení rentgenového snímku.

### 2. Odběr vzorku zubního plaku a sulkulární tekutiny na molekulárně genetické vyšetření vybraných kariogenních bakterií

Vzorek zubního plaku je primárně odebírán pro stanovení vybraných kariogenních bakterií, sulkulární tekutina je odebírána pro stanovení vybraných parodontálních bakterií. Omezení počtu stanovovaných bakterií v rámci cvičení je dáno dostupnými finančními prostředky (cena jedné analýzy je 500 Kč včetně DPH).

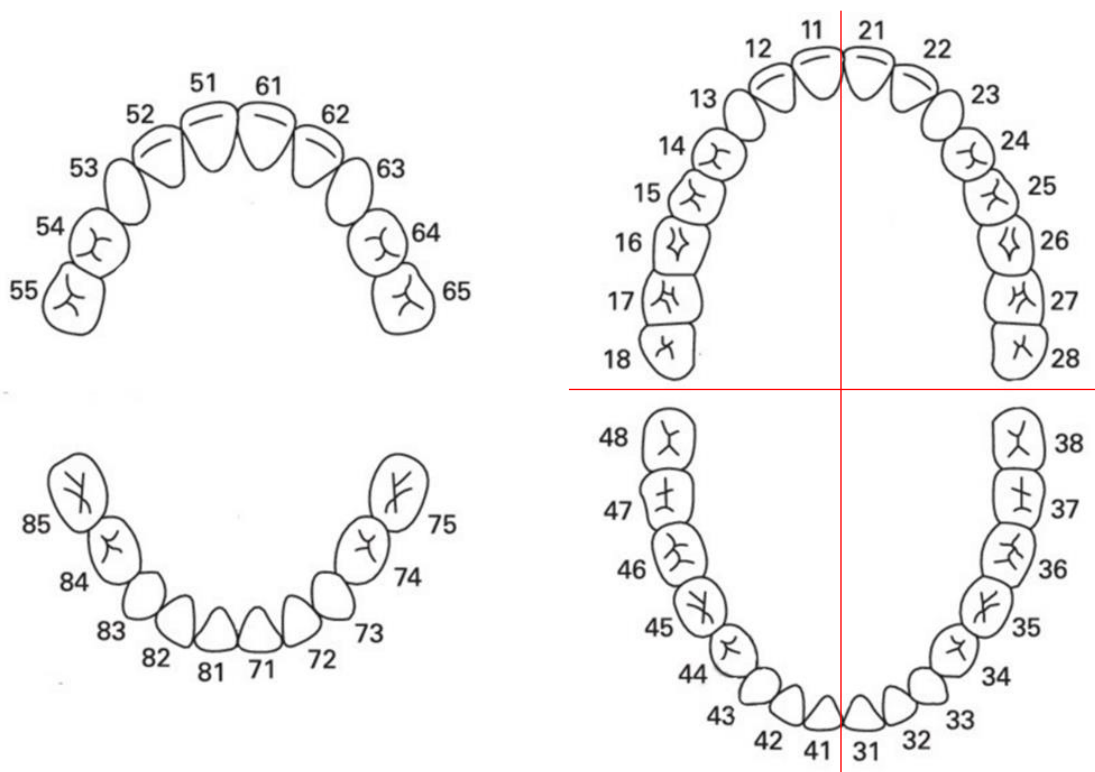
Materiál: Rukavice, sterilní pinzeta, papírový endodontický čep ISO40, 1,5 ml sterilní uzavíratelná zkumavka (Obr. 5), lepidlo, štítek, průvodní žádanka.



Obr. 5 Papírový endodontický čep ISO40 v 1,5 ml sterilní uzavíratelné zkumavce

## Postup:

1. Osušte zub, ze kterého budete provádět odběr. Pro stanovení kariogenních bakterií je vhodný u dospělého pacienta odběr ze zubu 36 nebo 46. *Pozn. V případě detekce parodontálních bakterií je vhodné zvolit 4 zuby s nejvyšším zánětem (z každého kvadrantu jeden). U dětí s dočasnou denticí je analýza nejčastěji prováděna z oblasti zubu se zubním kazem a se zánětem gingivy (často horní řezáky a moláry horní i dolní čelisti), u dětí s intaktním dočasným chrupem ze zubu 73 nebo 83. (Obr. 6).*
2. Papírový endodontický čep ISO40 vytáhněte sterilní pinzetou z obalu.
3. Čepem obkružte zub, abyste setřeli zubní plak a sulkulární tekutina se nasála do 2/3 čepu.
4. Čep nepokládejte a nedotýkejte se něj, čep vložte do 1,5 ml sterilní uzavíratelné zkumavky a uzavřete ji.
5. Zkumavku polepte štítkem, který popište kódem pacienta, datem odběru a číslem zubu (např. 36).
6. Zkumavku s čepem skladujte v mrazničce při -20°C.
7. Vypište průvodní žádanku.
8. Vzorek bude předán na Ústav biochemie, PřF MU k provedení multiplexové PCR (CarioBac) a stanovení kariogenních bakterií: *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* sp., *Lactobacillus* sp. a celkového počtu bakterií.



Obr. 6 Two-digit systém značení zubů dočasného a stálého chrupu

## PRŮVODNÍ ŽÁDANKA (PřF MU)

Jméno a příjmení ošetřujícího zubního lékaře:

Pracoviště zubního lékaře:

Mail zubního lékaře:

Kód pacienta: např. ZL\_201

Jméno a příjmení pacienta: NEVYPLŇOVAT, POKUD PACIENT NEPODEPÍŠE  
INFORMOVANÝ SOUHLAS.

Datum narození pacienta:

Datum odběru vzorku:

Vzorek odebrán ze zubu/z lokality:

Poznámka:

Požadavek na vyšetření těchto komplexů orálních bakterií (označte křížkem):

<input type="checkbox"/>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> a červený komplex: <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Treponema denticola</i>	}	}	}
<input type="checkbox"/>	Oranžový komplex: <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Prevotella intermedia</i>			
<input type="checkbox"/>	Kariogenní komplex: <i>Streptococcus mutans</i> <i>Actinomyces</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.	}	}	CarioBac test

### 3. Vyhodnocení vzorových zpráv s laboratorním nálezem a jejich interpretace pacientovi

Studentům budou předloženy 3 vzorové zprávy s laboratorním nálezem (Příloha). Studenti budou seznámeni s postupem při hodnocení výsledků mikrobiologického vyšetření a budou jim prezentována doporučení, která by měla být dána konkrétnímu pacientovi.

#### **Komentář ke zprávě – pacient č. 1**

Jedná se o dítě v předškolním věku s intaktním dočasným chrupem a se zdravou dásní. Odběr plaku a sulkulární tekutiny byl proveden ze zubu 73. Výsledek molekulárně genetické analýzy (OralBac) ukazuje, že genetická informace vybraných bakterií s patogenním potenciálem byla detekována jen v případě *F. nucleatum* a *Actinomyces* sp. Celkově tyto bakterie představují 2 % z celého orálního mikrobiomu. Dítě je dle tohoto nálezu bez rizika zubního kazu a zánětu gingivy. Rodičům a dítěti by měly být předloženy výsledky a prezentována standardní preventivní doporučení pro danou věkovou skupinu.

#### **Komentář ke zprávě – pacient č. 2**

Jedná se o dítě v předškolním věku se závažným kazem raného dětství a s gingivitidou. Odběr plaku a sulkulární tekutiny byl proveden ze zubu 51 – zub s kazem a se zánětem gingivy. Výsledek molekulárně genetické analýzy (OralBac) ukazuje, že genetická informace vybraných bakterií s patogenním potenciálem byla detekována u 9 z 10 stanovovaných bakterií, a to v mnoha případech ve vysokém počtu. Celkově tyto bakterie představují 4,44 % z celého orálního mikrobiomu. Dítě má dle tohoto nálezu vysoké riziko zubního kazu a zánětu gingivy. Rodičům a dítěti by měly být předloženy výsledky a důsledně prezentována preventivní doporučení pro danou věkovou skupinu.

#### **Komentář ke zprávě – pacient č. 3**

Jedná se o matku dítěte (pacient č. 2), která trpí mírnou formou chronické parodontitidy. Odběr plaku a sulkulární tekutiny byl proveden ze zubu s nejvyšším zánětem z každého kvadrantu. Výsledek molekulárně genetické analýzy (OralBac) ukazuje, že genetická informace vybraných bakterií s patogenním potenciálem byla detekována v případě 2 parodontálních bakterií z oranžového komplexu (1,06 % z celového orálního mikrobiomu) a 2 bakteriálních druhů asociovaných se zubním kazem (3,69 % z celého orálního mikrobiomu). Žena má dle tohoto nálezu zvýšené riziko zubního kazu a resorpce závěsného aparátu zubu. Pacientce by měly být předloženy výsledky a prezentována preventivní doporučení (doporučení návštěvy parodontologa, dentální hygienistky). Je vhodné upozornit na to, že může dojít při kontaktu s jinou osobou (dítětem) k přenosu bakterií s patogenním potenciálem.

#### 4. Stanovení vlastnosti sliny

Zvýšené riziko onemocnění dutiny ústní je v případě, že objem stimulované sliny <1 ml za 1 minutu, má vazkou konzistenci, je zjištěno nízké pH, a tudíž i nedostatečná pufrovací kapacita sliny. Když je slina čistá a vodnatá, tak její viskozita je normální. Zvýšenou viskozitu naznačují pěnové bublinaté sliny.

##### 4.1 Stanovení sekrece stimulované sliny

**Princip:** Ke stanovení snížené slinné sekrece (k diagnostice hyposialie, resp. xerostomie) slouží tzv. Škachův test, který spočívá v určení celkového objemu nestimulované (klidové) za 15 min a stimulované sliny (po žvýkání parafinové kuličky/žvýkačky) za dalších 15 min. Pokud je celkový objem nižší než 8 ml, tak pacient trpí hyposialií. Pro cvičení jsme zvolili minimalistickou verzi tohoto testu, kdy bude po dobu 5 minut sbírána stimulovaná slina a objem nižší než 5 ml bude považován za důkaz snížené slinné sekrece pacienta.

**Materiál:** 10 ml uzavíratelná zkumavka Salivette (Sarstedt) s bavlněným žvýkacím válečkem (Obr. 7), hodiny, lihový fix.



Obr. 7 10 ml uzavíratelná zkumavka Salivette (Sarstedt) s bavlněným žvýkacím válečkem určená k odběru stimulované sliny



**Postup:**

1. Udělejte lihovým fixem rysku na zkumavce tam, kde je dno horní části zkumavky. Tato hranice označuje objem 5 ml.
2. Otevřete zkumavku, vyjměte její horní část.
3. Vložte pacientovi bavlněný žvýkací váleček do úst.
4. Pacient bude po dobu 5 minut žvýkat bavlněný váleček a vyplivovat slinu do spodní části zkumavky.
5. Po uplynutí doby (nebo po naplnění zkumavky slinou) pacient vyplivne žvýkací váleček do odpadu.
6. Pokud slina přesáhla přes vyznačenou hranici, tak je salivace pacienta v normě.
7. Zkumavku uzavřete, stimulovanou slinu použijte k testování pH a pufrovací kapacity sliny.

**4.2 Stanovení pH a pufrovací kapacity sliny**

**Princip:** Kolorimetrické stanovení pH pomocí barevných acidobazických indikátorů. Testovací papírky Hydrion pH 5.5-8.0 (MicroEssential Laboratory) jsou vhodné pro určení pH roztoků v rozmezí 5,5 až 8, zatímco Universální indikátorové papírky (Lach-ner) jsou vhodné pro stanovení pH 0 až 12. pH sliny definuje i pufrovací kapacitu sliny: vysoká ( $\text{pH} \geq 6,0$ ), střední ( $\text{pH}=4,5$  až  $5,5$ ), nebo nízká pufrovací kapacita ( $\text{pH} \leq 4,0$ ).

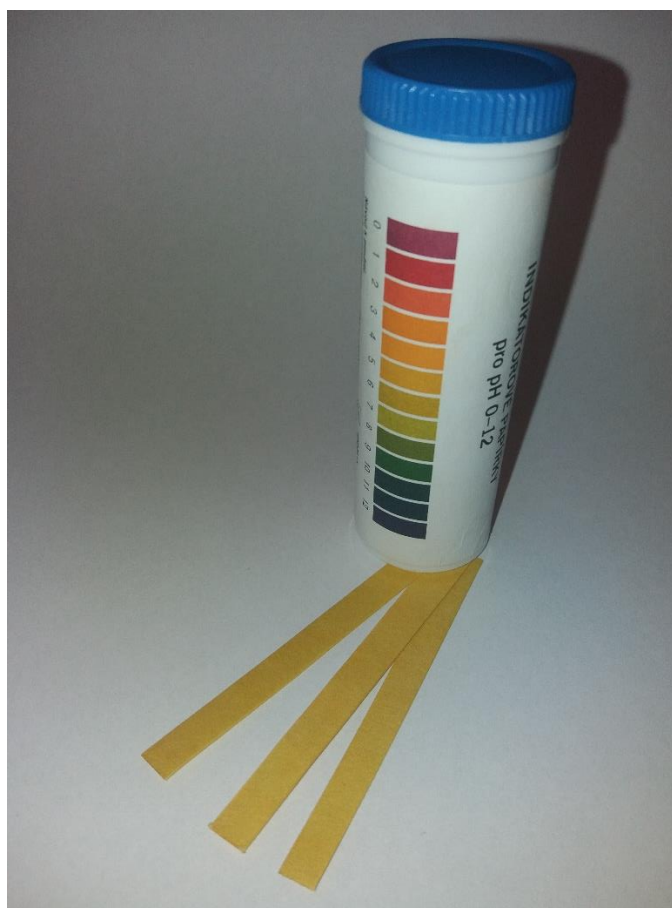
Měření pH může probíhat v nestimulované (tzv. „klidová slina“) i ve stimulované slině. Ve stimulované slině stoupá obsah bikarbonátového nárazníkového systému, to znamená, že slina stimulovaná např. žvýkačkou, je v neutralizaci kyselin účinnější než klidová slina. Pokud je pH stimulované sliny vyšší než 5,5, tak je pufrovací kapacita sliny v normě.

**Materiál:** Testovací papírky Hydrion® Urine & Saliva pH Paper 5.5-8.0 (MicroEssential Laboratory) (Obr. 8), Universální indikátorové papírky (Lach-ner) (Obr. 9), sterilní pinzeta, zkumavka se stimulovanou slinou (Obr. 10).



Obr. 8 Testovací papírky Hydrion® Urine & Saliva pH Paper 5.5-8.0 (MicroEssential Laboratory)

<https://www.microessentiallab.com/uploads/media/2014%20Lit/ph055080lit.pdf>



Obr. 9 Universální indikátorové papírky (Lach-ner)



Obr. 10 10 ml uzavíratelná zkumavka Salivette (Sarstedt) se stimulovanou slinou

**Postup:**

1. Pinzetou uchopte testovací proužek Hydrion pH 5.5-8.0.
2. Volný konec proužku ponořte asi 0,5 cm až 1 cm do zkumavky se stimulovanou slinou.
3. Vyjměte proužek z testovaného roztoku a ihned porovnejte barvu na testovacím proužku s barevnou škálou Hydrion pH 5.5-8.0.
4. Určete pH sliny dle zbarvení na testovacím proužku Hydrion pH 5.5-8.0.
5. Pokud je stanovené pH na dolní hranici (v oblasti 5,5), tak proveďte test pomocí Universálního indikátorového papírku stejným postupem popsaným výše a určete, zda je/není  $\text{pH} \leq 4,0$ .
6. Určete pH a pufrovací kapacitu sliny pacienta.

## **ZÁVĚR**

Studenti byli seznámeni s molekulárně biologickým testy používanými pro stanovení orálních bakterií a byl jim prezentován způsob, jakým výsledky takového vyšetření spolu s klinickým nálezem mohou být použity při intervenci/poučení pacienta, a tím posílit prevenci onemocnění dutiny ústní.

Pro úspěšné ukončení cvičení a předmětu je nutné, aby každý student zpracoval protokol ze cvičení.

## **PROTOKOL**

Ke zprávě s laboratorním nálezem, která Vám bude zaslána mailem z externí laboratoře, přiložte výsledky určení vlastností sliny. Souhrnné výsledky okomentujte tak, jako byste je prezentovali pacientovi. Nezapomeňte zdůraznit preventivní opatření, které by měl pacient provádět. V případě významného (patologického) nálezu navrhněte další postup. Protokol ve formátu .pdf odešlete vyučujícímu ve stanoveném termínu.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Výukový materiál vznikl s podporou Ministerstva zdravotnictví České republiky, grant č. NV7-30439A. Autoři děkují za odborné konzultace prof. MUDr. Martině Kukletové, CSc., prof. MUDr. Lydii Izakovičové Hollé, Ph.D. a MUDr. Haně Poskerové, Ph.D.

## **DOPORUČENÁ LITERATURA**

- Bořilová Linhartová P, Bartošová M. Nové metody v primární prevenci zubního kazu u dětí. Masaryk University, Brno, Czech Republic. 2019. ISBN 978-80-210-9203-7.
- Bořilová Linhartová P, Kavříková D, Slezáková S, Kukletová M, Izakovičová Hollá L. Komerční testy pro stanovení rizika rozvoje zubního kazu a onemocnění parodontu. LKS. 2019;29(2):30-37.

## **RECENZENTI**

- doc. MUDr. Květoslava Nováková, CSc.

Klinika zubního lékařství, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc

- doc. MUDr. Ivan Erdelský, CSc.

Katedra stomatologie, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

# **Příloha: Vzorová zpráva s laboratorním nálezem**

Zubní lékař: [REDACTED]  
Pracoviště: FN u sv. Anny  
Mail: [REDACTED]

MUNI

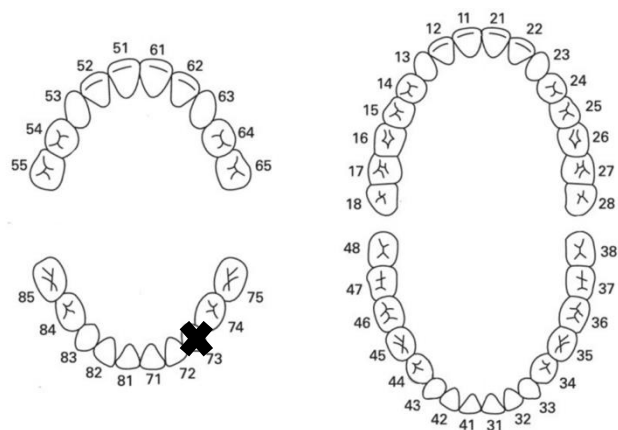
Kód pacienta: ZK\_582  
Jméno a příjmení: [REDACTED]  
Datum narození: 2. 8. 2014  
Mail: [REDACTED]

Laboratoř: Molekulární patologie  
Pracoviště: Ústav biochemie, PŘF MU, Kamenice 5,  
62500 Brno  
Mail: 13418@mail.muni.cz

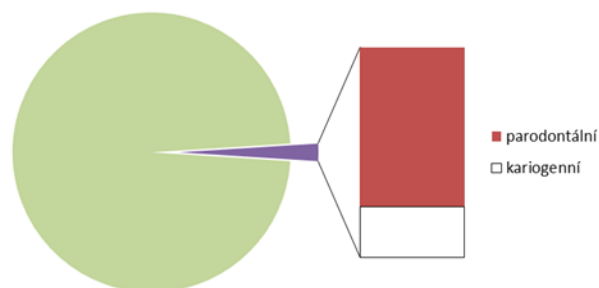
kpe/KPE index: 0  
Parodontální indexy: zdravá dásně

Datum analýzy vzorku: 22. 6. 2018  
Analýzu provedl: [REDACTED]  
Poznámka:

Datum odběru vzorku: 20. 6. 2018  
Vzorek odebrán ze zubu/z lokality: 73  
Poznámka:



Relativní podíl bakteriálního druhu ku celkovému orálnímu mikrobiomu



Bakterie	Počet kopií ve vzorku	Relativní podíl [%]
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	0,00%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	0,00%
<i>Tannerella forsythia</i>	-	0,00%
<i>Treponema denticola</i>	-	0,00%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	1,52%
<i>Parvimonas micra</i>	-	0,00%
<i>Prevotella intermedia</i>	-	0,00%
<i>Streptococcus mutans</i>	-	0,00%
<i>Actinomyces</i> sp.	+	0,48%
<i>Lactobacillus</i> sp.	-	0,00%

Legenda: (-) negativní, odpovídá počtu bakterií  $< 10^3$ ; (+) pozitivní, odpovídá počtu bakterií  $10^3 - 10^5$ ; (++) silně pozitivní, odpovídá počtu bakterií  $> 10^5$

Doporučení:  
Pokračovat v pravidelné a pečlivé orální hygieně,  
Pravidelně navštěvovat zubního lékaře v rámci preventivních prohlídek.

Výstup analýzy: Bez rizika resorpce závěsného aparátu zubu a zubního kazu.

Zubní lékař: ██████████  
Pracoviště: FN u sv. Anny  
Mail: ██████████

MUNI

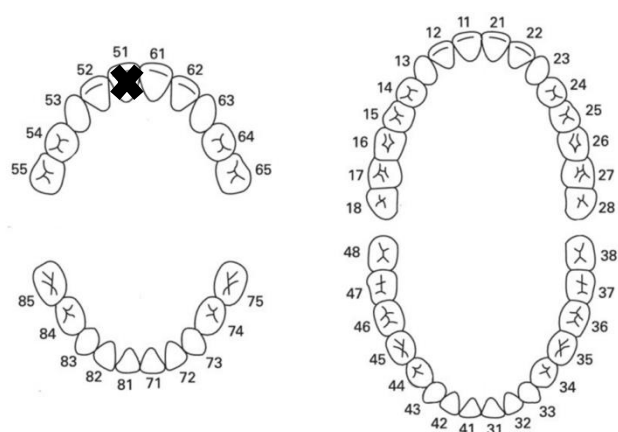
Kód pacienta: ZK\_583  
Jméno a příjmení: ██████████  
Datum narození: 20. 2. 2013  
Mail: ██████████

Laboratoř: Molekulární patologie  
Pracoviště: Ústav biochemie, PŘF MU, Kamenice 5,  
62500 Brno  
Mail: 13418@mail.muni.cz

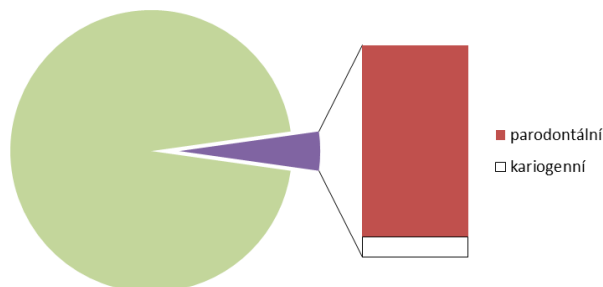
kpe/KPE index: 18  
Parodontální indexy: gingivitida

Datum analýzy vzorku: 22. 6. 2018  
Analýzu provedl: ██████████  
Poznámka:

Datum odběru vzorku: 20. 6. 2018  
Vzorek odebrán ze zubu/z lokality: 51  
Poznámka: zub s kazem a se zánětem



Relativní podíl bakteriálního druhu ku celkovému orálnímu mikrobiomu



Bakterie	Počet kopií ve vzorku	Relativní podíl [%]
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	+	0,001%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	++	0,70%
<i>Tannerella forsythia</i>	++	0,24%
<i>Treponema denticola</i>	++	0,54%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	++	0,87%
<i>Parvimonas micra</i>	++	0,01%
<i>Prevotella intermedia</i>	++	1,66%
<i>Streptococcus mutans</i>	-	0,00%
<i>Actinomyces</i> sp.	++	0,42%
<i>Lactobacillus</i> sp.	+	0,001%

Legenda: (-) negativní, odpovídá počtu bakterií  $< 10^3$ ; (+) pozitivní, odpovídá počtu bakterií  $10^3 - 10^5$ ; (++) silně pozitivní, odpovídá počtu bakterií  $> 10^5$

Doporučení: Zlepšit orální hygienu, vyhýbat se sladkostem, slazeným a kyselým nápojům. Pravidelně navštěvovat zubního lékaře v rámci preventivních prohlídek.

Výstup analýzy: Vysoké riziko resorpce závěsného aparátu zubu a vysoké riziko zubního kazu.

Zubní lékař: [REDACTED]  
Pracoviště: FN u sv. Anny  
Mail: [REDACTED]

MUNI

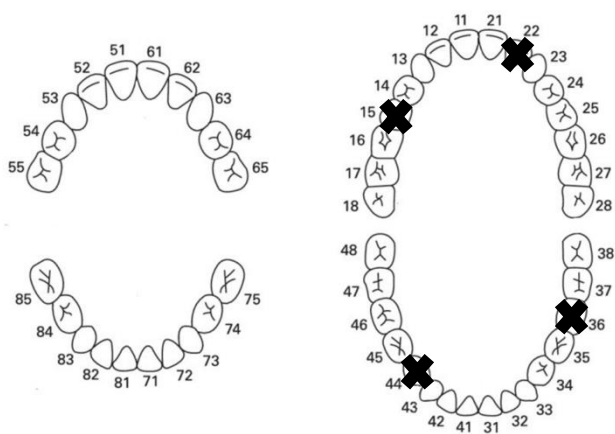
Kód pacienta: ZKM\_583  
Jméno a příjmení: [REDACTED]  
Datum narození: 17. 1. 1985  
Mail: [REDACTED]

Laboratoř: Molekulární patologie  
Pracoviště: Ústav biochemie, PŘF MU, Kamenice 5,  
62500 Brno  
Mail: 13418@mail.muni.cz

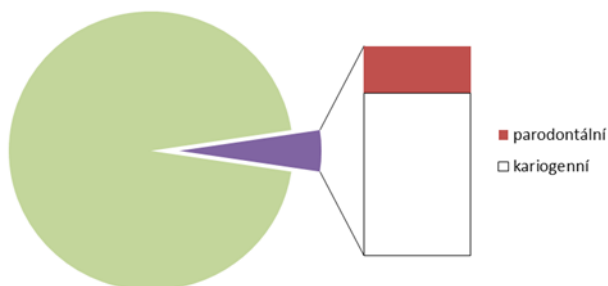
kpe/KPE index: 16  
Parodontální indexy: PI=1,77, GI=1,8,  
CPITN=1-1-1,2-2-2

Datum analýzy vzorku: 22. 6. 2018  
Analýzu provedl: [REDACTED]  
Poznámka:

Datum odběru vzorku: 20. 6. 2018  
Vzorek odebrán ze zubu/z lokality: 15, 22, 36, 44  
Poznámka: odběr se zubů s nejvyšším zánětem v  
kvadrantu



Relativní podíl bakteriálního druhu ku  
celkovému orálnímu mikrobiomu



Bakterie	Počet kopií ve vzorku	Relativní podíl [%]
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-	0,00%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	-	0,00%
<i>Tannerella forsythia</i>	-	0,00%
<i>Treponema denticola</i>	-	0,00%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	++	1,05%
<i>Parvimonas micra</i>	-	0,00%
<i>Prevotella intermedia</i>	+	0,01%
<i>Streptococcus mutans</i>	++	2,11%
<i>Actinomyces</i> sp.	-	0,00%
<i>Lactobacillus</i> sp.	++	1,58%

Legenda: (-) negativní, odpovídá počtu bakterií  $< 10^3$ ; (+) pozitivní, odpovídá počtu bakterií  $10^3 - 10^5$ ; (++) silně pozitivní, odpovídá počtu bakterií  $> 10^5$

Doporučení: Zlepšit orální hygienu, vyhýbat se sladkostem, slazeným a kyselým nápojům. Pravidelně navštěvovat zubního lékaře v rámci preventivních prohlídek a navštěvovat dentální hygienistku.

Výstup analýzy: Zvýšené riziko resorpce závěsného aparátu zubu a vysoké riziko zubního kazu.



**M U N I  
M E D**