

Molekulárně biologická analýza orálních patogenů a slin, zubní kaz

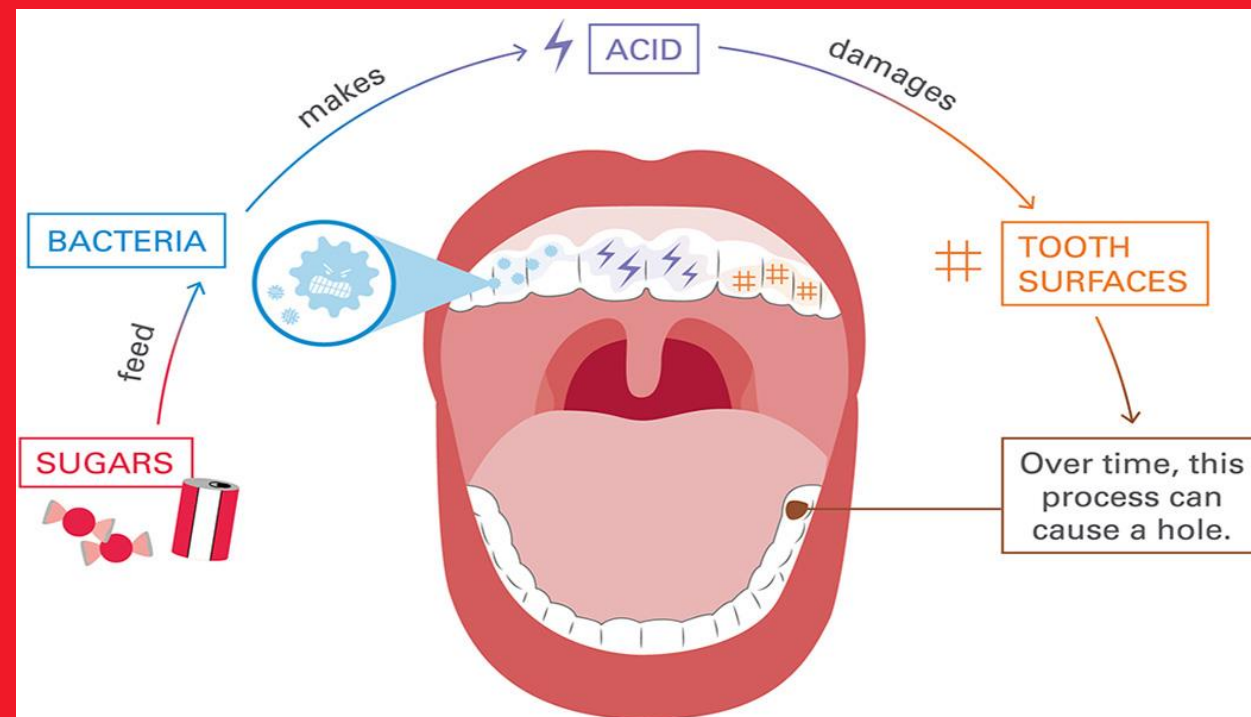
Mgr. Jana Mrázková, Ph.D.

Ústav patologické fyziologie LF MU

Témata

- Faktory podílející se na vzniku zubního kazu
- Molekulární analýza sliny
- Molekulární analýza orálního mikrobiomu
- Genetika zubního kazu
 - Genetické asociační studie ve vztahu k zubnímu kazu

Zubní kaz a faktory přispívající k jeho vzniku



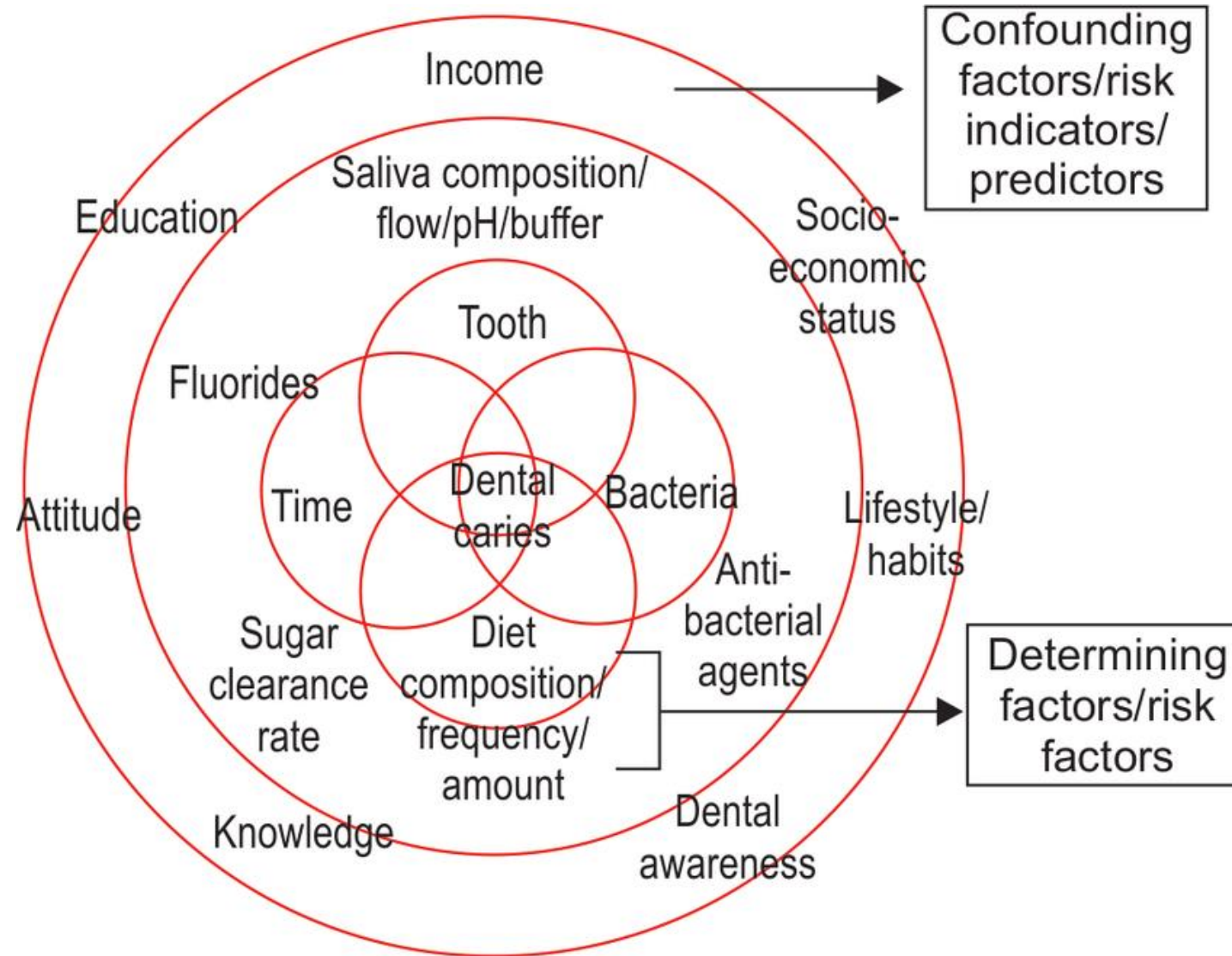
Zubní kaz



Puwadol Jaturawutthichai
(www.shutterstock.com)

- nejrozšířenější chronické onemocnění
 - 3,5 miliardy lidí (530 milionu dětí, dle WHO)
- infekční
 - přenos bakterií (např. z matky na dítě slinou při olíznutím dudlíku)
- komplexní
 - multigenní, multifaktoriální (faktory endogenní a exogenní)
- na výsledném vzniku se podílí souhra více faktorů
 - složení orální mikroflory (hlavní faktor)
 - vlastnosti skloviny a dentinu (kvalita povrchu zubu)
 - složení a fyzikální působení sliny
 - genetické predispozice celkový zdravotní stav (poruchy imun. systému, systémová onem. ovlivňující IS)
 - behaviorální a environmentální faktory
 - čas – doba po kterou faktory působí/spolupůsobí

Zubní kaz



Diagrammatic representation of the determining (risk factors) and confounding factors (risk indicators/predictors) in dental caries disease.

Zubní kaz

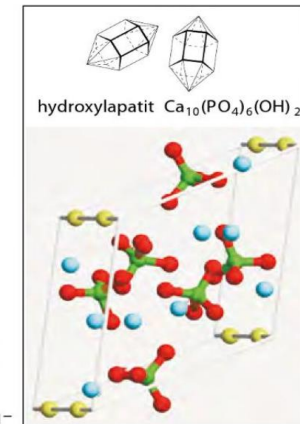
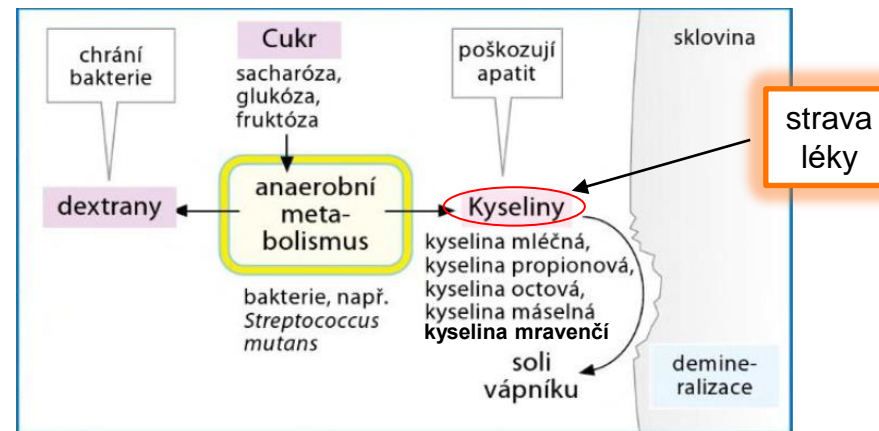
– caries dentium

porušen dynamický proces cyklického střídání demineralizace a re-mineralizace zubní skloviny → ↑ demineralizace →→ tvorba zubního kazu



Puwadol Jaturawutthichai
(www.shutterstock.com)

- sklovina → kolem 97 % anorganické hmoty (apatit – kationtová komplexní sloučenina = **ligandy** Ca^{2+} a $(\text{PO}_4)^{2-}$ + **proti-anionty** → $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$ (karbonátapatit), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (hydroxyapatit), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ (fluorapatit)
- organické kyseliny (bakterie, strava) → neutralizace aniontů apatitů → rozpad krystalové jednotky → rozpouštění minerální složky skloviny → vznik kazu



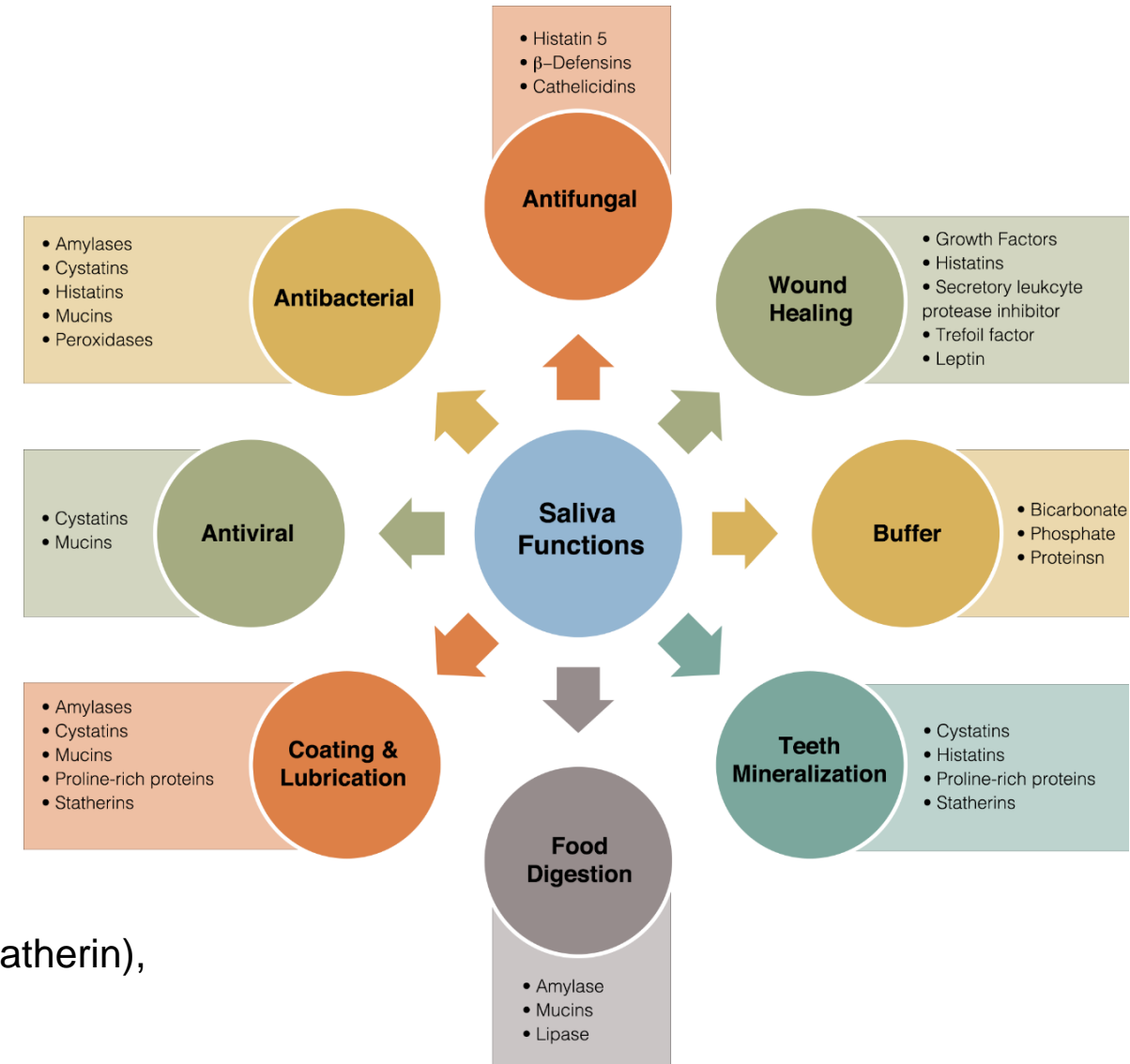
Color Atlas of Biochemistry
(3rd edition, 2013)

- proteolytické enzymy bakterií → odbourávání organické složky (kolageny, proteoglykany)
- kaz → dentin → dentinové kanálky → zubní dřeň → zánět dřeně (pulpitida), ozubice (periodontitida)

Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Slina:

- komplexní karioprotektivní faktor
- udržování homeostázy
- fyzikální faktor
 - průtok slin (omývání a lubrikace tkání dutiny ústní), orální clearance (odmývání škodlivých látek, nepřisedlých mikroorganismů)
- „chemický“ faktor
 - gustin (karbonická anhydráza VI → pufovací kapacita), vápenaté, fosfátové, fluoridové ionty, lysozym, laktoferin, proteiny specifické (IgA, IgG) a nespecifické imunity (defensiny, katelicidiny, histatiny, statherin), proteiny bohaté na prolin (PRPs), muciny



Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Slina:

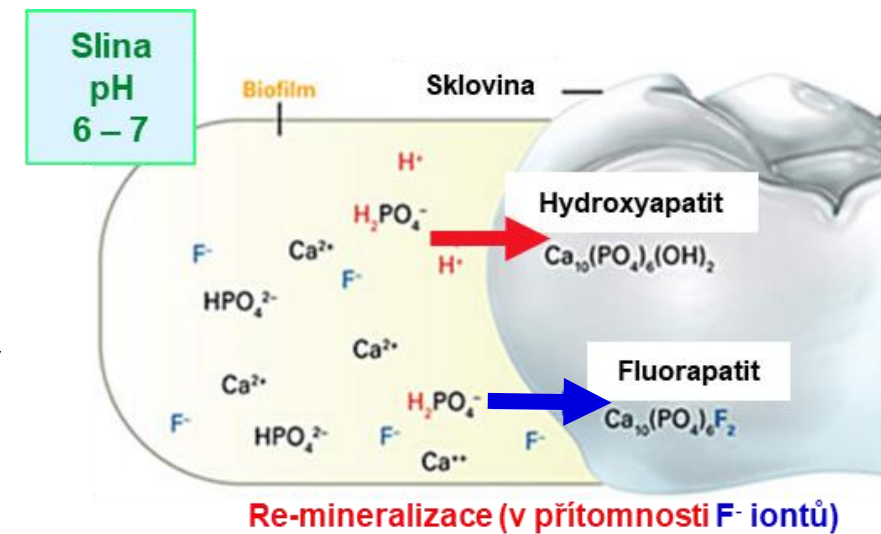
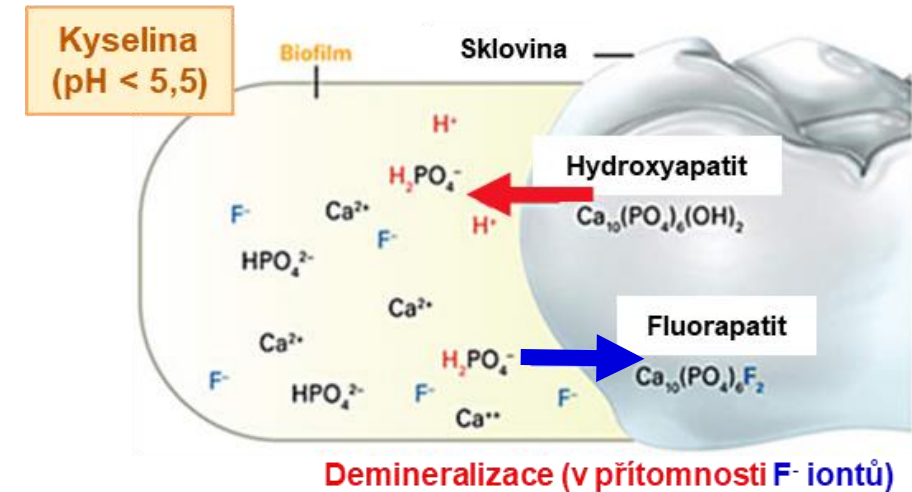
– působení sliny:

- ↑ rovnováha mezi re- a demineralizací
- ↓ zbytky potravy, ↓ mikroorganismy,
↓ kyselost prostředí (ředění, pufrovací systémy
– bikarbonát, hydrogenfosfát, proteiny)
- ↑ látky s antibakteriálními, antimykotickými
a antivirovými vlastnostmi

– problém → snížená tvorba slin

- ← dehydratace, úzkostné stavy, obstrukce/hypofunkce
slinných žláz (DM, Sjögrenův syndrom, AIDS, tumory
a jejich léčba, akutní infekce)
- ← léky (beta blokátory, antidepresiva, antihistaminika)
- ← drogy (metamfetamin, THC)

→ podpora vzniku zubního kazu



Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Orální mikrobiom:

– dutina ústní → unikátní mikrobiologický habitat → separátní ekologické niky (ne/deskvamující povrchy, slina) → kolonizace specifickými druhy mikroorganismů

– druhý nejrozmanitější (až 1000 druhů mikroorganismů)

→ udržování homeostázy (kompetice a vytěsňování exogenních patogenů pro zachování stability ekosystému)

→ modulace imunitního systému

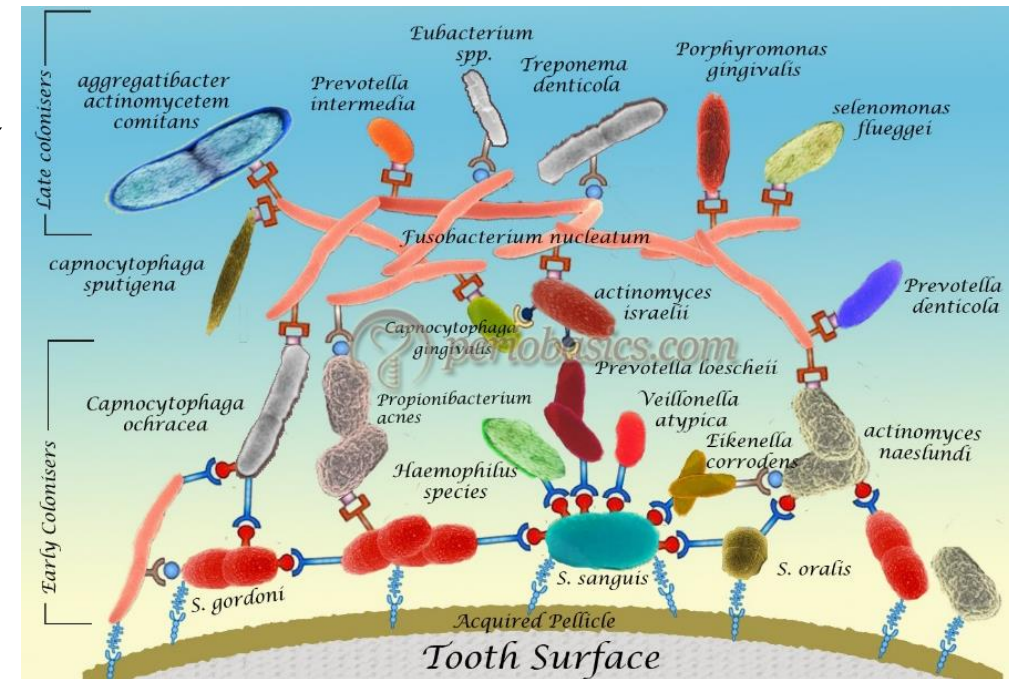
– dentální plak = mikrobiální biofilm

→ matrix z extracelulárních polymerních látek (EPS)

→ aerobní bakterie (*Streptococcus sanguinis*), fakultativně anaerobní bakterie (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus* sp.), anaerobní bakterie (*Actinomyces* sp., *Veillonella* sp.), plísně (*Candida* sp.)

→ slina → proteiny s povrchovým nábojem (kyselé PRPs, statherin, histatiny) → el.stat. interakce s fosfátovými a vápenatými ionty apatitu → vznik acelulární pelikuly (muciny, cystatiny, albumin, IgA, IgG, lysozym, alfa-amyláza, cukry, neutrální lipidy, fosfo- a glykolipidy, glukosyltransferáza) → ochrana před demineralizací a částečně před adhezí mikroorganismů (proteiny na površích jsou zároveň i ve slině → kompetice bakteriálních vazebných receptorů)

→ substrát pro bakterie → formace biofilmu



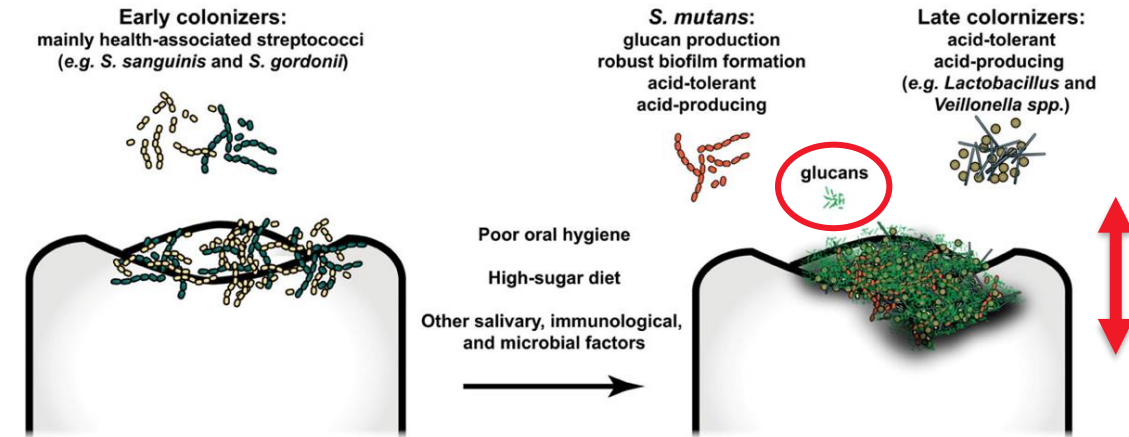
<https://periobasics.com/dental-plaque/>

Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Dentální plak

– problém: dysbióza orálního mikrobiomu

→ porušení homeostázy → posun z eubiotické rovnováhy od mutualismu/komensalismu k nevyváženému parazitickému/patogennímu stavu → podpora vzniku a rozvoje onemocnění



<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03323>

– dentální plak → převaha kariogenních druhů (fermentují sacharidy na org. kyseliny + tolerují prostředí s nízkým pH) → nejčastější *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* sp., *Candida* sp.

– faktory podporující převahu kariogenních druhů

→ ↑ přijímané cukry/kyseliny → okyselování, ↓ imunita, zánět, ...

→ ↓ slina, ↓ orální hygiena → nárůst tloušťky plaku

→ ↑ plak → nedostatek kyslíku → ↑ anaerobní metabolismus → metabolizace fermentabilních sacharidů → organické kyseliny → ↓ pH → demineralizace

→ ↑ plak → chrání kariogenní bakterie před obrannými mechanismy hostitele

S. mutans → dextran (α -1,6-D-glukan) → extracelulární nerozpustný polysacharid → ↑ ochrana bakterií proti vlivům prostředí (nízké pH, antimikrobiální faktory), ↑ koadheze dalších druhů, ↑ přilnavost plaku

Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Externí faktory:

→ nedostatečná orální hygiena

→ nevhodné stravovací návyky (nadměrný příjem fermentovatelných sacharidů)

→ kouření (e-cigarety – náplň má vysoký obsah cukru)

→ požívání alkoholu

→ léky (poškozen funkce slinných žláz, okyselující dutinu ústní, antibiotika)

→ nemožnost přístupu ke kvalitní stravě, pitné vodě, hygienickým potřebám, lékařské péči

– Čas

Faktory přispívající ke vzniku zubního kazu

– Genetické predispozice:

– komplexní onemocnění (genetické, epigenetické a exogenní faktory)

- polygenní
- genetická heterogenita – heterogenita genů ležících na různých lokusech (lokusová), heterogenita uvnitř jednoho genu (alelická)
- neúplná penetrance – ne u všech jedinců dochází k manifestaci patologického fenotypu (další příznivě působící alely, příznivý vliv exogenních faktorů)
- fenokopie (patologický fenotyp i u jedinců, kteří nemají sadu patologických alel)
- vysoká frekvence patologických alel v populaci
- etnická variabilita (odpovědné geny se mohou lišit, varianty genů mají v různých populacích různý vliv na fenotyp)

→ lze určit pouze geny (alely), které zvyšují míru rizika onemocnění (risk factors) → predispozice (predisponující genotyp může zvyšovat pravděpodobnost onemocnění, nicméně nedeterminuje jednoznačně jeho přítomnost)

Molekulární analýza sliny

(Salivaomika)

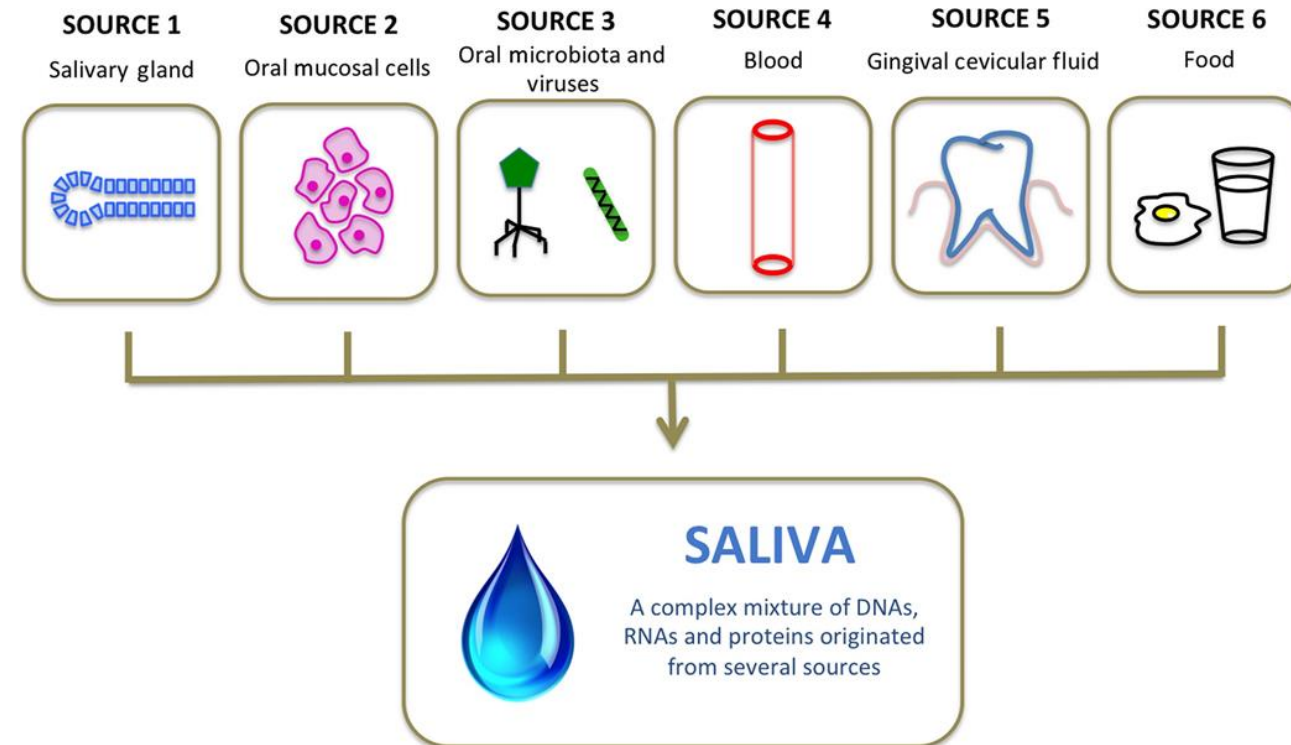


Molekulární analýza sliny

Saliva is composed of biomolecules and fluids from different sources. Saliva is mainly secreted by salivary glands, and its informative biomolecules (DNA, RNA, proteins, metabolites and microbiota) are obtained from salivary glands, oral mucosa cells, oral microbiota and gingival crevicular fluid.

– Slina jako diagnostické medium

- bohatý rezervoár peptidů a proteinů
- složky slin se prokazatelně mění v reakci na určitá onemocnění a stavy
- více než 100 molekul detekovaných ve vzorcích slin je hodnoceno jako potenciální diagnostické nebo prognostické biomarkery pro různá onemocnění (např. zubní kaz, parodontitida, rakovina, cukrovka)



<https://doi.org/10.1111/prd.12099>

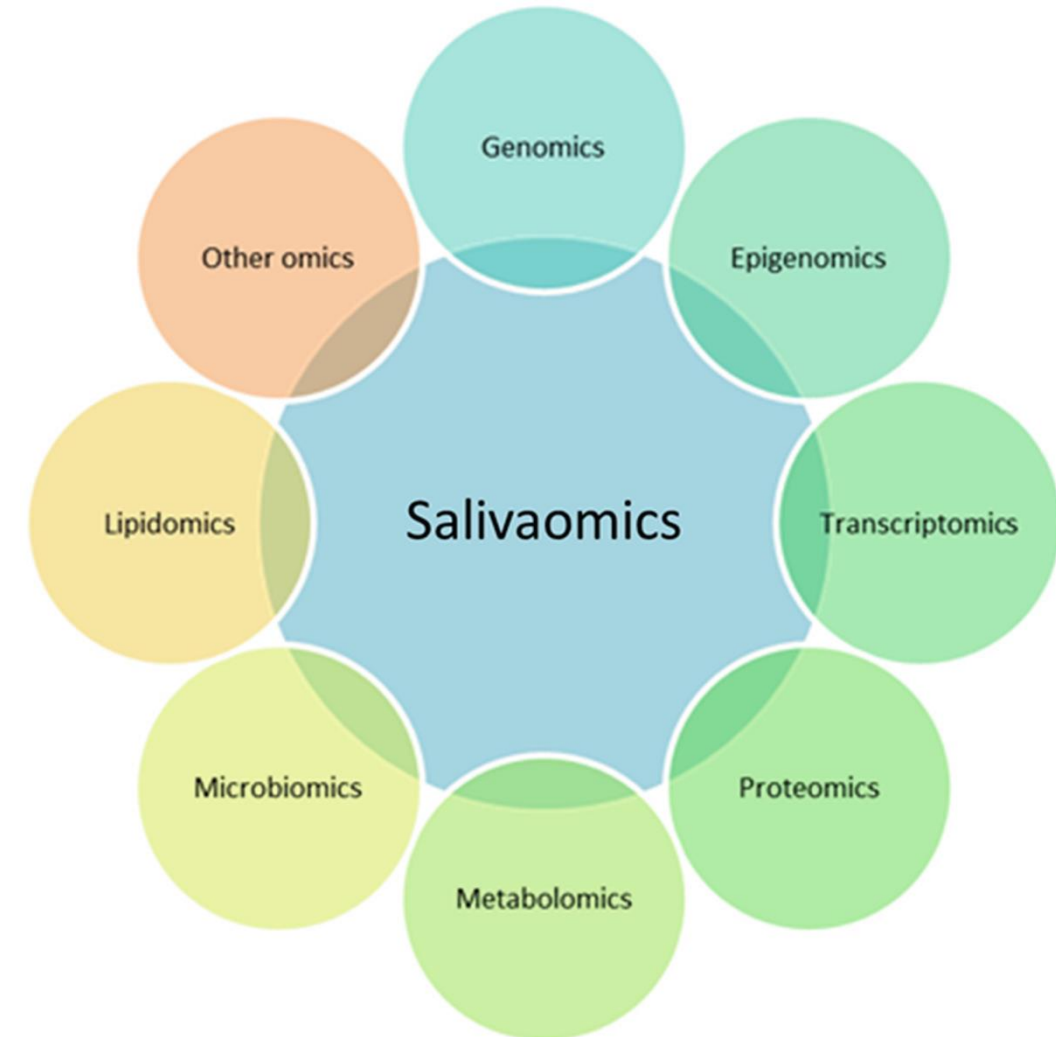
Molekulární analýza sliny

The different and complementary components of salivaomics

– Slina jako diagnostické medium

– Salivaomika

- pojem zaveden 2008
- spojuje znalosti o různých „omických“ složkách sliny (proteom, transkriptom, metabolom, mikrobiom, ...)
- využívá high-throughput technologie (genomika, transkriptomika, proteomika, metabolomika, lipidomika a mikrobiomika, ...)
- analýza sliny → identifikace biomarkerů



Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

Výhody:

- odběr neinvazivní, snadný, bezbolestný, opakovatelný (trvalá dostupnost materiálu), i nevyškolený personál, lze u všech věkových kategorií
- vzorek o velkém objemu, stabilní v čase, zpracování rychlé, levné
- potenciál nahradit krev při screeningu, diagnostice a prognóze onemocnění

Table 1. Description of Human Saliva Collection Methods.

Type of Whole Mouth Fluid	Method of Collection and Type of Collection Device
Whole Saliva (WS)	Patients should refrain from eating, drinking, and oral hygiene procedures for at least 1 h before saliva collection. (Optimum collection time is 8–10 a.m.). Before collection perform a 1 min oral rinse with distilled water and then after 5 min collect ~5 mL of saliva. Collected sample must be processed in the laboratory within 1 h.
Unstimulated Whole Saliva (USWS)	Passive drooling: In this method restrict oral movement and drain saliva from the lower lip into a plastic vial. Spitting method: Instruct subject to spit into a collection vial. In this method 14 times more bacterial contamination is introduced into the sample.
Stimulated Whole Saliva (SWS)	For the stimulation of glands, chewing different things like natural gum, a piece of paraffin wax, citric acids, and powdered drink crystals have been used.
Parotid Gland	Method introduced by Carlson and Crittenden (1910). In this method a double chambered metallic cup with two outlet tubes is used. One end holds the cup in place using vacuum suction. The second half acts as a collection vehicle for saliva. Specimen collection can be enhanced by smearing citric acid (10%; 1 mL) on the dorsum of tongue every 30 s. Discard the first 1.5 mL of saliva prior to sample collection.
Submandibular/Sublingual Gland	Truelove, Bixler, and Merrit (1967) used a "V"-shaped collector. This method is similar to that for parotid gland collection, but in this case the initial 2 mL is discarded.
Minor Glands	Kutscher <i>et al.</i> (1967) used capillary tubes for collecting saliva from minor glands located at the everted surface of the lower lips.

<https://doi.org/10.3390/ijms17060846>

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

Limitace:

– korelace hladin biomarkerů sérum/slina

↓↓↓ koncentrace analytů v porovnání se sérem → ↑ objem vzorku slin, detekční limit metody, deplece abundantních proteinů (PRPs, α-amyláza, albumin, muciny and sekreční IgA mohou tvořit až 80 %), osmolalita

– vysoká variabilita → horší reprodukovatelnost výsledků

- technická (odběr, zpracování, použitá metoda)
- inter- (věk, pohlaví, fyziologický stav) a intraindividuální (cirkadiální, cirkanuální)
- biologická (vliv stavu dutiny ústní, cirkadiální rytmus, systémová onemocnění (Sjögrenův syndrom), léčiva, chemo/radioterapie) → objem a složení slin
- rychlost a stimulace toku slin → koncentrace slinných biomarkerů
- proteolytické enzymy (mikrobiom/hostitel) → stabilita určitých biomarkerů

– otázka standardizace

→ vztažení proteinových markerů k celkovému proteinu sliny (stejná osoba jako vzorek i kontrola)

→ standardizace používaných metod, validace protokolů

→ zohlednění všech proměnných (variabilita složení, místo odběru, rychlost toku, objem vzorku, stimulace, kontaminace krví, odběrové soupravy, integrita analytu)

→ otázka validace biomarkerů pro klinické aplikace

- verifikace → stanovení biomarkeru různými technikami, dosažení podobných výsledků
- validace → preklinická → definitivní akademická (prospektivní odběr vzorků, retrospektivní evaluace) → multicentrické studie

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

Spektrofotometrické metody

- UV/Vis spektrofotometrie
(enzymy, metabolity, proteiny, anti/oxidanty)
- Atomová absorpční/emisní spektrometrie
(elementární atomy a ionty – Ca, Mg, Cr, Mn, Ni, Pb / Na, K)
- NIR (near infrared) spektroskopie
(ionty přechodných kovů a kovů vzácných zemin, molekuly obsahující vazby C-H, N-H, S-H, O-H – thyokyanát, IgA, kortisol, slinná α -amyláza, močovina, fosfáty, celkový protein)

Table describing examples of commonly analyzed biomarkers in whole mouth saliva; CRP – C-reactive protein; HPLC – high performance liquid chromatography; IC – ion chromatography; LC-MS – liquid chromatography mass spectrometry; MALDI-TOF MS - matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; RT-LAMP – reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification; AOPP – Advanced Oxidation Protein Products; TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances; TAC – Total Antioxidant Capacity; FRAS – Free Radical Analytical System.

Group of molecules	Biomarkers	Method
Cytokines	Interleukins Tumor-necrotising factor Interferons, Chemokines	Multiplex array Luminex fluoresce technique
Acute phase proteins	CRP	ELISA
Inflammatory proteins	Myeloperoxidase Neutrophil elastase	ELISA
Antibodies	Anti-HIV, Anti-RO Anti-La	RT-LAMP ELISA
Hormones	Testosterone Estradiol Cortisol	ELISA HPLC
Enzymes	Amylase Lysozyme	ELISA MALDI-TOF MS
Proteins-polypeptides	Immunoglobulin A Lactoferrin	MALDI-TOF MS ELISA
Nucleic acids	DNA methylation DNA mutations microbiome	Microarray Sequencing
Vitamins	25(OH)D(3) vitamins A, C, E	LP-MC ELISA
Ions	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , NH ₃ ⁻	IC
Oxidative stress	AOPP TBARS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA
Antioxidant status	TAC FRAS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA

Janšáková et al.,
Klin. Biochem. Metab., 26 (47), 2018, No. 1, p. 21–26

MUNI
MED

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

Imunoeseje

- Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
(přímá, nepřímá nebo sendvičová – adiponektin, kortison, kortizol, C-reaktivní protein, D-dimer, laktoferrin, IgA, IgM, IgG, IgE, myoglobin)
- Chemiluminiscenční imunoesej (kortizol, testosteron, laktát)
- Fluoroimunoesej (slinná α -amyláza, Haptoglobin, C-reaktivní protein)
- Radioimunoesej (kortizol, estradiol, oxytocin)
- Neznačené imunoeseje (nefelometrie, turbidimetrie, imunochromatografie, biosenzory/čipy)

Table describing examples of commonly analyzed biomarkers in whole mouth saliva; CRP – C-reactive protein; HPLC – high performance liquid chromatography; IC – ion chromatography; LC-MS – liquid chromatography mass spectrometry; MALDI-TOF MS - matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; RT-LAMP – reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification; AOPP – Advanced Oxidation Protein Products; TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances; TAC – Total Antioxidant Capacity; FRAS – Free Radical Analytical System.

Group of molecules	Biomarkers	Method
Cytokines	Interleukins Tumor-necrotising factor Interferons, Chemokines	Multiplex array Luminex fluoresce technique
Acute phase proteins	CRP	ELISA
Inflammatory proteins	Myeloperoxidase Neutrophil elastase	ELISA
Antibodies	Anti-HIV, Anti-RO Anti-La	RT-LAMP ELISA
Hormones	Testosterone Estradiol Cortisol	ELISA HPLC
Enzymes	Amylase Lysozyme	ELISA MALDI-TOF MS
Proteins-polypeptides	Immunoglobulin A Lactoferrin	MALDI-TOF MS ELISA
Nucleic acids	DNA methylation DNA mutations microbiome	Microarray Sequencing
Vitamins	25(OH)D(3) vitamins A, C, E	LP-MC ELISA
Ions	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , NH ₃ ⁻	IC
Oxidative stress	AOPP TBARS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA
Antioxidant status	TAC FRAS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA

Janšáková et al.,
Klin. Biochem. Metab., 26 (47), 2018, No. 1, p. 21–26

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

Tekutá biopsie (liquid biopsy)

- u nádorových onemocnění
- nahrazují tradiční tkáňovou biopsii
- testy, které detekují cirkulující nádorové buňky, exomy, nádorovou DNA, nádorovou RNA a proteiny, které se šíří do krevního řečiště nebo slin z primární léze

Table describing examples of commonly analyzed biomarkers in whole mouth saliva; CRP – C-reactive protein; HPLC – high performance liquid chromatography; IC – ion chromatography; LC-MS – liquid chromatography mass spectrometry; MALDI-TOF MS - matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry; RT-LAMP – reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification; AOPP – Advanced Oxidation Protein Products; TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances; TAC – Total Antioxidant Capacity; FRAS – Free Radical Analytical System.

Group of molecules	Biomarkers	Method
Cytokines	Interleukins Tumor-necrotising factor Interferons, Chemokines	Multiplex array Luminex fluoresce technique
Acute phase proteins	CRP	ELISA
Inflammatory proteins	Myeloperoxidase Neutrophil elastase	ELISA
Antibodies	Anti-HIV, Anti-RO Anti-La	RT-LAMP ELISA
Hormones	Testosterone Estradiol Cortisol	ELISA HPLC
Enzymes	Amylase Lysozyme	ELISA MALDI-TOF MS
Proteins-polypeptides	Immunoglobulin A Lactoferrin	MALDI-TOF MS ELISA
Nucleic acids	DNA methylation DNA mutations microbiome	Microarray Sequencing
Vitamins	25(OH)D(3) vitamins A, C, E	LP-MC ELISA
Ions	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Cl ⁻ , Ca ²⁺ , NH ₃ ⁻	IC
Oxidative stress	AOPP TBARS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA
Antioxidant status	TAC FRAS	Spectrophoto- Spectrofluorometric methods ELISA

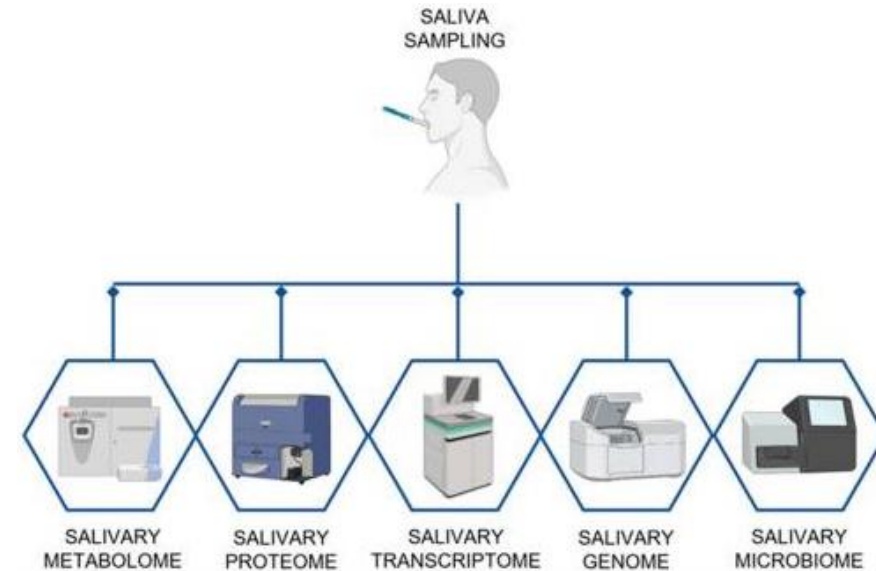
Janšáková et al.,
Klin. Biochem. Metab., 26 (47), 2018, No. 1, p. 21–26

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

„Omiky“

- DNA (genomika a epigenomika - rakovina),
 - RNA (transkriptomika - biomarkery pro chronickou parodontitidu, Sjögrenův syndrom, rakovinu plic, vaječníků, prsu a slinivky),
 - proteiny (proteomy pro Sjögrenův syndrom, Downův syndrom, schizofrenii)
 - metabolity (metabolomika – rakovina ústní dutiny, hepatocelulární a kolorektální karcinomy, parodontitida, chronické onemocnění ledvin),
 - lipidy a mikrobiom (lipidomika, mikrobiomika) a další
-
- souběžná analýza stovek analytů → přesná detekce malých změn
 - vysoká citlivost, kvantitativní výsledky
 - analýza souboru biomarkerů pro dané onemocnění
 - zatím žádná v klinické aplikaci → snahy o „point-of-care“ testování



<https://doi.org/10.3390/bios11100396>

Molekulární analýza sliny

- Slina jako diagnostické medium – zubní kaz
 - žádný diagnostický test
 - testy náchylnosti k zubnímu kazu → mikrobiologická laboratoř
 - stanovení přítomnosti kariogenní mikroflóry
 - kvantitativní určení přítomnosti fermentujících mikroorganismů (okyselujících prostředí) ve slině
 - stanovení pufrovací kapacity slin a rychlosti sekrece slin
 - kvantifikace kolonií plísně *Candida albicans*
 - snahy o vztažení prevalence zubního kazu k fenotypu určeném ze sliny → rozporuplné výsledky

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium – náchylnost k zubnímu kazu

– proteinové biomarkery sliny asociované s náchylností ke vzniku zubního kazu:

↑ celkový protein, celková aktivita antioxidantů

↑ alfa-amyláza, muciny (MUC1 a MUC5B)

↓ arginin deiminázový systém, albumin, proteináza 3, PRP1/3, statherin, histatin 1

↓ koncentrace vápenatých a hydrogenuhličitanových iontů

↓ aktivita ureázy

– proteinové biomarkery sliny asociované s náchylností ke vzniku ECC:

↑ PRPs, histatiny, IgA, IgG

↓ statherin

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium – parodontitida, rakovina DÚ

– parodontitida

- ↑ slinné biomarkery – IL-1 β , MMP-8, MMP-9, TNF- α , AST, ligand pro receptor aktivátoru nukleárního faktoru κ B (RANKL), osteoprotegerin, prostaglandin E₂
 - lze je použít pro detekci počínající parodontitidy, pro rozlišení parodontitidy, gingivitidy a pro predikci progresu parodontitidy a sledování prognózy)
- ↑ bakterie červeného komplexu (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*)
- ↑ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* (G⁻ anaerobi)
- genetické predispozice pro náchylnost → polymorfismus v genu pro IL-1

– rakovina (dlaždicobuněčný karcinom dutiny ústní – OSCC)

- ↑ slinné biomarkery – IL-6, IL-8, IL-1 α , IL-1 β , CD59, MRP14 (myeloid related protein), profilin 1, kataláza, protein vázající Mac-2 (M2BP)
- další potenciální markery ve slině → telomeráza, Cyfra21-1, tkáňový polypeptidový antigen, nádorový marker CA 125, CD44, glutathion, transferrin, mRNA (IL8, IL-1 β , fosfatáza DUSP1, hemaglutinin HA3, enzym OAZ1, S100 calcium-binding protein P, acetyltransferáza SAT) některé aminokyseliny, laktát, mimobuněčná DNA, mikroRNA, buňky karcinomu

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

– testovací sady pro ordinace (point-of-care testování, chair-side kits):

– zlepšení individualizované péče

- stanovení rizika vzniku zubního kazu
- riziko nástupu a posouzení progresu parodontitidy
- screeningu rakoviny DÚ

– zubní kaz

- fyzikální parametry: množství, rychlost toku, viskozita, konzistence pH sliny a pufrovací kapacita
- laktát
- stanovení kariogenních bakterií *S. mutans* a *Lactobacillus* sp.



komerční kity (stanovení vizuálně, kolorimetricky)

komerční kity (stanovení kolorimetricky)

komerční kity (kultivační, imunochromatografická detekce antigenu)

MUNI
MED

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

– testovací sady pro ordinace (point-of-care testování, chair-side kits):

– parodontitida

- detekce ve slině – aktivní MMP-8 → PerioSafe® PRO DRS (imunochromatografie) a ORALyzer® (analyzátor)
- detekce v tekutině dásňového sulku – aMMP-8 (ImplantSafe DR®), AST (PerioGard, PocketWatch)



– rakovina (OSCC) screening

Table S2: Commercially available POC adjuncts for oral cancer examination

POC Device	Company	Principle	Sample	Sensitivity	Approximate cost of analysis	References
Salivary adjuncts						
Oramark/ OncAlert RAPID Test	Vigilant Biosciences, Fort Lauderdale, Florida	Salivary Biomarkers - CD44 and total protein	Saliva	Qualitative	NA	("OncAlert Oral Cancer LAB Test RAPID Test Vigilant Biosciences Vigilant Biosciences," n.d.)
OncoE6™ Oral Test	Arbor Vita Corporation, Fremont, California	HPV viral E6 oncoprotein	Saliva	Qualitative	NA	("Products-CoVisa Arbor Vita Corporation," n.d.)
SaliMark OSCC salivary DNA test	PeriRx LLC, Broomall, Pennsylvania	DNA biomarkers	Saliva	Quantitative	200\$	(SaliMark™ OSCC The Most Clinically-Advanced and Scientifically-Validated Molecular DNA Test for Oral Squamous Cell Carcinoma, n.d.)
The OraRisk® HPV Complete Genotype	(OralDNA Labs, Inc., Eden Prairie, Minnesota	Oral HPV biomarkers	Saliva	Quantitative	200\$	("OralDNA Test Menu OraRisk HPV Complete Genotyping," n.d.)

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium

– parodontitida

Table 2. Examples of biomarker assay kits in the market.

Biomarker Classification	Sampling From	Product Name	Detecting Target	Detecting Principle	Analyzing in
Biochemical assay	GCF	Periocheck	Neutral proteases	Enzymatic digestion reaction (Colorimetric assays)	Chairside
	GCF	PocketWatch	AST	Enzymatic catalysis reaction (Colorimetric assays)	
	GCF	PerioGard	AST	Enzymatic catalysis reaction (Colorimetric assays)	
	Oral rinse	PerioSafe	aMMP-8	Lateral flow test with digital reader (OraLyzer®)	
	GCF	ImplantSafe			
Oral rinse	SillHa ST-4910	Blood, leukocytes, and protein	Lateral flow test with dual-wavelength reflectometry		

Molekulární analýza sliny

- Slina jako diagnostické medium
 - onemocnění a příklady biomarkerů

- autoimunitní onemocnění

Sjögrenův syndrom – α -amyláza, karbonická anhydráza VI, laktoferin, β 2-mikroglobulin

- neurodegenerativní onemocnění

Alzheimerova choroba – celkový tau protein, fosforylovaný tau protein, amyloid- β a alfa-synuklein

- genetické onemocnění

cystická fibróza – Ca, PO_4^{2-} , Na, K, Cl, \downarrow objem slin, močovina, kyselina močová, prostaglandin E_2

- rakovina

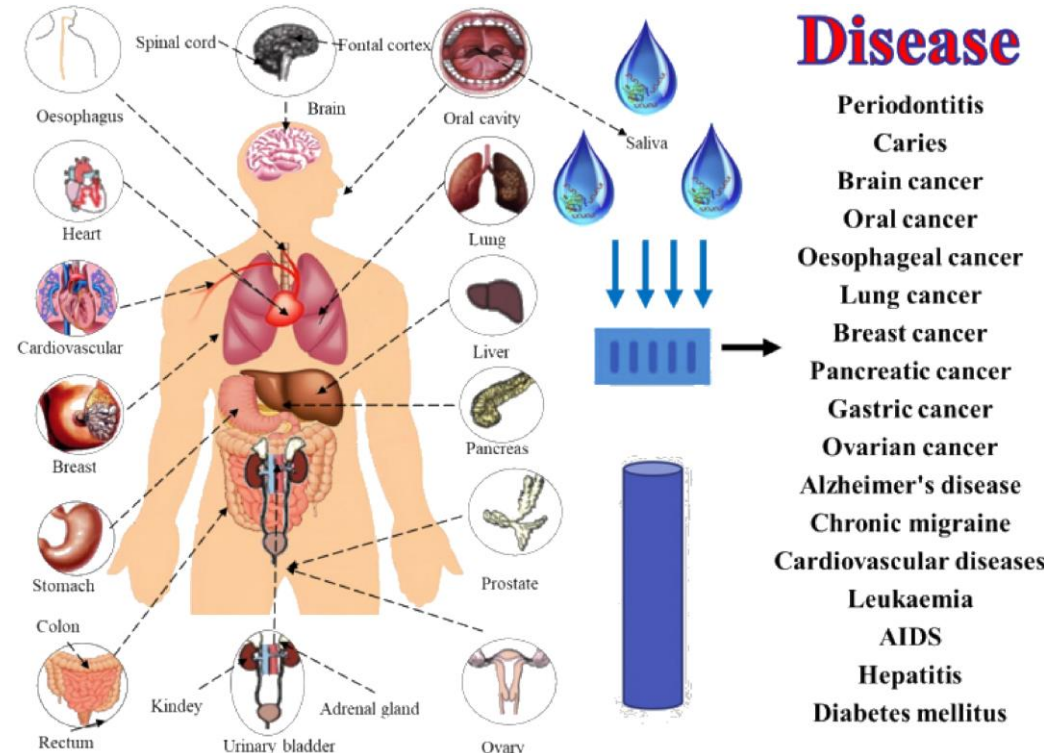
spinocelulární karcinom – IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-4, IL-1, VEGF, HER2, tissue polypeptide antigen (TPA) and EGFR, LDH, N- α -acetyltransferase 10 protein (Naa10p), carcinoembryonic antigen (CEA) protein, serum basic fibroblast growth factor (bFGF), transferin, cyklin D, Maspin, specifické mRNA

r. prsu - HER2/neu (C-erbB-2), VEGF, EGF, specifické mRNA, autoprotilátky proti HER2 a MUC-1

r. slinivky – transkriptomické markery mRNA (*KRAS*, *MBD3L2*, *ACRV1* a *DPM1*), specifické miRNA, laktoperoxidáza, Cyklofilin B, Cytokeratiny (14, 16 a 17)

- alergie

potravinová alergie - IgE a IgG₁



<https://doi.org/10.1016/j.medntd.2022.100115>

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické mediu – biomarkery onemocnění

– kardiovaskulární onemocnění

CK-MB, myoglobin, troponin I, myeloperoxidáza, markery zánětu (CRP, TNF- α , MMP-9), markery adheze (rozpustný CD40 a ICAM-1)

– metabolismus

diabetes melitus 2. typu – 1,5-anhydroglucitol, CRP, leptin, IL-6, TNF- α

– infekční onemocnění

HIV – protilátky proti HIV

viry – přítomnost protilátek IgM/IgA, virová RNA

Kandidóza, amébiáza – přítomnost *Candida* sp., *Entamoeba histolytica* (protilátky)

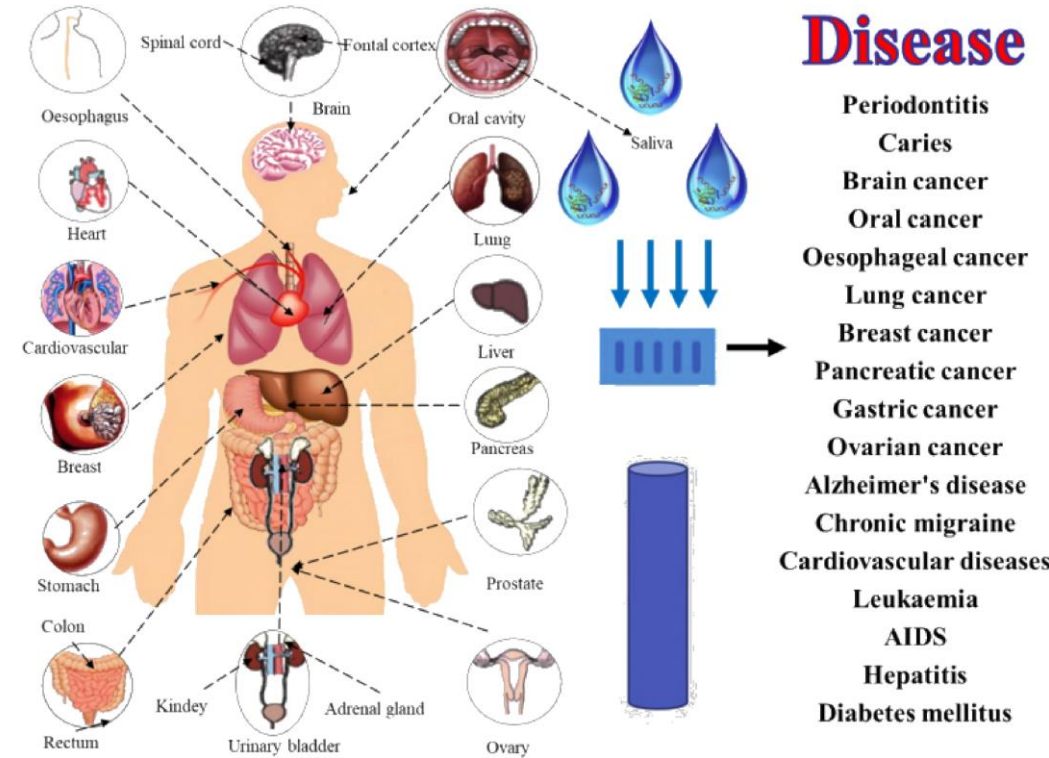
Hepatitida – přítomnost DNA viru HBV

Peptidické vředy, gastritida, – přítomnost *Helicobacter pylori* (IgG protilátky, DNA *H. pylori*)

– hormonální nemoci

Cushingův syndrom a Addisonova choroba – kortizol

pohlavní hormony – syndrom polycystických ovarií, menopauza/andropauza, anovulace, hypogonadismus, hyperestrogenismus



<https://doi.org/10.1016/j.medntd.2022.100115>

Molekulární analýza sliny

– Slina jako diagnostické medium – laboratorní biomarkery

CHOOSING SALIVARY ANALYTES & DNA

HOW TO CHOOSE THE RIGHT SALIVARY BIOMARKER, ANALYTE OR GENETIC MARKER?

As the number of novel biomarkers being studied in saliva continues to increase, choosing a reliable and impact generating salivary biomarker, analyte, or genetic marker can seem daunting. However, Salimetrics is here to help with some basic advice to keep you going. If you need something more in-depth, don't hesitate to request advice. We're always happy to assist.

[REQUEST ADVICE](#)

- SBB - Salivary DNA Genotyping**
Description: The latest research continues to reinforce the correlation between SNP-related associations and genetic biology, behaviors, and diseases. But did you know that you can easily and affordably incorporate accurate, high-quality DNA analysis from saliva and get results that are identical to blood samples?
- SBB - Salivary Biomarkers of Inflammation**
Description: Bio-medical researchers routinely measure biomarkers such as cytokines (IL-6, IL-18, TNF- α) and C-reactive protein (CRP) in blood in order to assess the presence of inflammation.
- SBB - Measuring Multiple Analytes**
Description: Leading salivary bioscience researchers continue to map the biological landscape by including cutting-edge, multisystem measurements in their research. A single saliva sample can provide robust data for multiple analytes, when handled correctly.
- SBB - Better Together - Salivary Testosterone & Cortisol**
Description: Renewed interest by the research community has focused on the salivary testosterone/cortisol (T/C) ratio and its supporting biological mechanisms. In this issue of the Salivary Bioscience Bulletin, we explore the scientific literature and provide a summary of our findings.
- Measuring SIgA in Saliva**
Description: The biological pathway of entry for SIgA into saliva is different from many other salivary analytes and it is important that researchers understand how this mechanism may affect SIgA levels in saliva.

Biomarker Lab services and facilities

In our Biomarker Lab in Cambridge, we use Salimetrics reagents, antibodies and kits.

Salimetrics is widely regarded as a global leader in salivary bioscience, they lead the field in developing saliva collection methods and assay technology and are trusted around the world to get reliable results.

We routinely analyse the following biomarkers, although others may be available. Please [contact us to discuss](#).

Certified Salivary Bioscience Lab
Salimetrics

- Why work with us
- Lab services and facilities
- Client area
- Privacy notice
- Get a quote

+ Saliva markers

- Aldosterone
- Alpha-Amylase
- Androstenedione
- C-Reactive Protein
- Cortisol
- Cotinine
- DHEA
- DHEA-S
- Secretory Immunoglobulin A (SIgA)
- Testosterone
- Transferrin/ Blood Contamination
- Uric Acid
- Estradiol
- Estriol
- Estrone
- IL-6
- IL-1 β
- Melatonin
- Progesterone
- 17 α -OH-progesterone

Molekulární analýza sliny

- Slina jako diagnostické medium
- laboratorní biomarkery

<https://www.oraldna.com/trends-in-salivary-testing/index.php/category/periodontal-disease/>

Follow OralDNA Labs on Social Media


TRENDS IN SALIVARY TESTING
A Clinician's View of Salivary Testing

HOME ABOUT CONTACT US ADDITIONAL LINKS ORALDNA.COM

Periodontal Disease

MyPerioProgress: Features and How-To Video

Posted on February 5, 2021 by Diane Larson RDH, BSDH



According to Merriam Webster, the definition of a posttest is “a test given to students after completion of an instructional program or segment and often used in conjunction with a pretest to measure their achievement and the effectiveness of the program.” When an OralDNA® provider performs a pretest MyPerioPath®, applies periodontal therapy, and then performs a posttest MyPerioPath®, a comparison report called MyPerioProgress® is generated. This can be used to measure the effectiveness of t...

MORE

Tagged bacterial testing, Patient Education, salivary diagnostics

<https://www.oraldna.com/trends-in-salivary-testing/>

Table 2. Examples of Commercially Marketed Oral Fluid Tests^{18, 22-25}

Test (Manufacturer)	Intended Use
23andMe® Health + Ancestry	Detect genetic health risks (e.g., BRCA1/BCRA2 status), carrier status, physical traits, and wellness features
Alert 2™ (OralDNA Labs)	Combine MyPerioPath® and MyPerio ID® IL-6
Celsus One™ (OralDNA Labs)	Evaluate genetic markers related to inflammatory response
DNA DrugMap™ (OralDNA Labs)	Detect drug metabolizer status
Intercept® i2™, Intercept® i2he™, and Intercept® Oral Fluid Drug Test (OraSure Technologies, Inc.)	Detect drugs of abuse (e.g., marijuana, cocaine and opiates)
MyPerio ID® IL-6 or IL-1 (OralDNA Labs)	Detect genetic polymorphisms associated with increased genetic risk for severe periodontal disease
MyPerioPath® (OralDNA Labs)	Evaluate the number and concentration of bacteria implicated in periodontitis
OraMark™ Test (Vigilant Biosciences)	Detect CD44 and total protein associated with oral cancer
OraQuick® In-Home HIV Test, OraQuick® HIV Self Test, and OraQuick ADVANCE® Rapid HIV-1/2 Antibody Test (OraSure Technologies, Inc.)	Detect HIV-1 and/or HIV-2 antibodies in oral fluid
OraRisk HPV® (OralDNA Labs)	Screening tool to identify the type(s) of oral HPV present
OraRisk HSV® (OralDNA Labs)	Detect HSV-1 or HSV-2 present in the oral cavity
OraRisk® Candida (OralDNA Labs)	Detect and identifies all common species of <i>Candida</i> present in the oral cavity
OraRisk® CT/NG (OralDNA Labs)	Detect the presence of <i>Chlamydia trachomatis</i> and/or <i>Neisseria gonorrhoea</i> in the oropharynx
OraSure® HIV-1 (OraSure Technologies, Inc.)	Detect HIV-1 antibodies in oral fluid
Q.E.D. Saliva Alcohol Test (OraSure Technologies, Inc.)	Detect alcohol in oral fluid
SaliMark OSCC® (PeriRx, LLC)	Detect increased levels of certain mRNAs associated with increased risk of oral cancer



Molekulární analýza orálního mikrobiomu

(„Oralom“)



https://www.jorthodsci.org/viewimage.asp?img=JOrthodontSci_2014_3_4_125_143233_f6.jpg

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom

- společenství až 1000 různých druhů mikroorganismů → bakterie, houby, viry, archea, prvoci
→ bakteriální převaha
- „oralom“ → souhrnné označení pro dynamické interakce mezi orální mikrobiotou a hostitelem
(Např. orální mikroflóra je důležitá pro dozrávání a vývoj vhodné orální imunitní odpovědi → imunitní systém hostitele se musí bránit před patogenními mikroby, ale zároveň harmonizovat a chránit komenzální orální mikroby.)

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom

– dysbióza → onemocnění DÚ

- ← strava hostitele
- ← zánětlivé reakce
- ← systémová onemocnění (DM 2, hyperglykémie)
- ← návyky hostitele (kouření, alkohol, chronický stres)

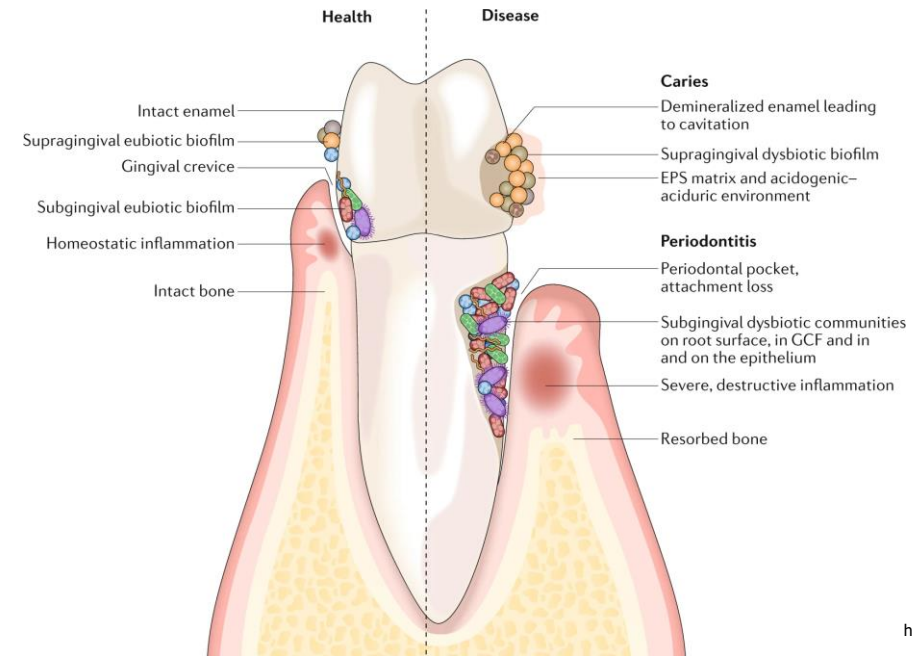
– zubní kaz → ↑ příjem sacharidů ve stravě → ↑ produkce kyselin → ↓ pH a pufrční schopnosti slin → ↑ produkce ECM biofilmu → zakoncentrování kyselin na povrchu skloviny → podpora růstu acidurických a acidogenních druhů → dysbióza

– parodontitida → dysbióza subgingiválních mikrobiálních společenstev (biofilmu) → vytvoření a udržování zánětu gingivy a parodontu → nepříznivý vliv na IS hostitele → zabránění subverzi IS a obnově tkáně

→ určité druhy OM biofilmu → etiologické agens (bakterie červeného komplexu)

→ *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* → vykazují schopnost řídit procesy zapojené do patogeneze onemocnění parodontu tím, že řídí restrukturalizaci mikrobioty a podporují zánět

→ orální virom může být v patogenezi onemocnění stejně významný jako orální bakteriom



Microbial colonization occurs on all available surfaces, and microorganisms can also penetrate epithelial tissues and cells. The microbiota assembles into biofilm communities on the abiotic and biotic surfaces. In health (left), eubiotic biofilms maintain a homeostatic balance with the host. In disease (right), caries and periodontitis ensue when biofilms become dysbiotic, resulting in increased levels and duration of low pH challenge and the induction of destructive inflammatory responses, respectively. EPS, extracellular polymeric substance; GCF, gingival crevicular fluid.

<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>

Molekulární analýza OM

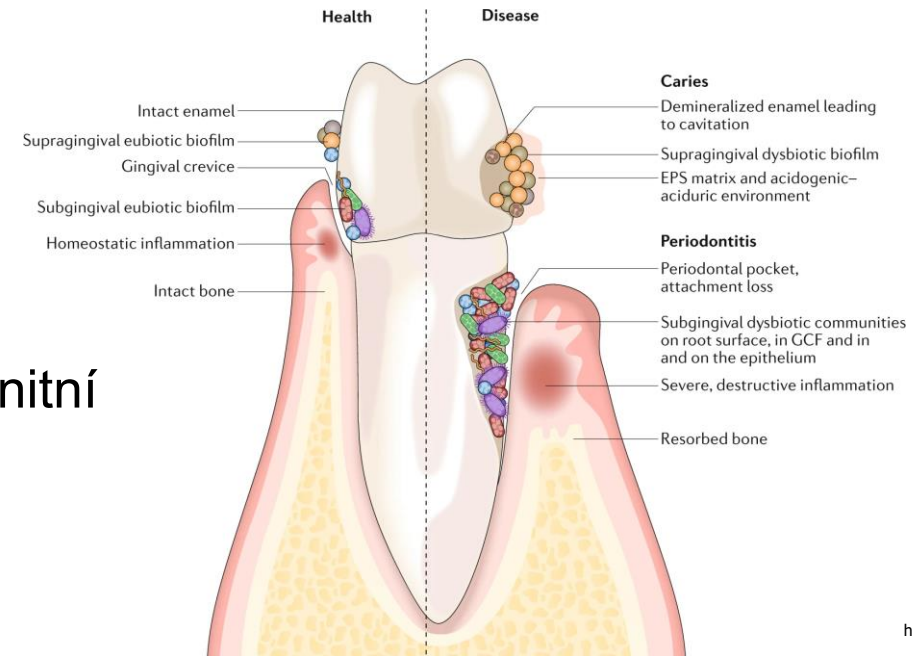
– Orální mikrobiom

- dysbióza → mikroby DÚ mohou ovlivňovat imunitní odpověď a patogenezi nemoci i mimo DÚ (rezervoár pathobiontů)
 - dutina ústní → vysoká míra vaskularizace, vstupní místo dýchací a trávicí soustavy

- systémová onemocnění → primární mechanismy spojující or. infekci se systémovými patologiemi
 - šíření infekce z dutiny ústní v důsledku přechodné bakteriémie
 - cirkulace mikrobiálních toxinů
 - systémový zánět způsobený nepříznivými imunologickými reakcemi na orální mikroby

- mikroby spojené s DÚ detekovány v mnoha vzdálených orgánech (tenké střevo, plíce, srdce, mozek, placenta) → kolonizace závisí na zdrav.stavu dané tkáně

- prokázána asociace mezi mikroby podílejícími se na parodontitidě a chronickými stavy (kardiovaskulární onemocnění, hypertenze, zánětlivá onemocnění)
 - subgingivální biofilm → zdroj bakterií a prozánětlivých mediátorů → cirkulace

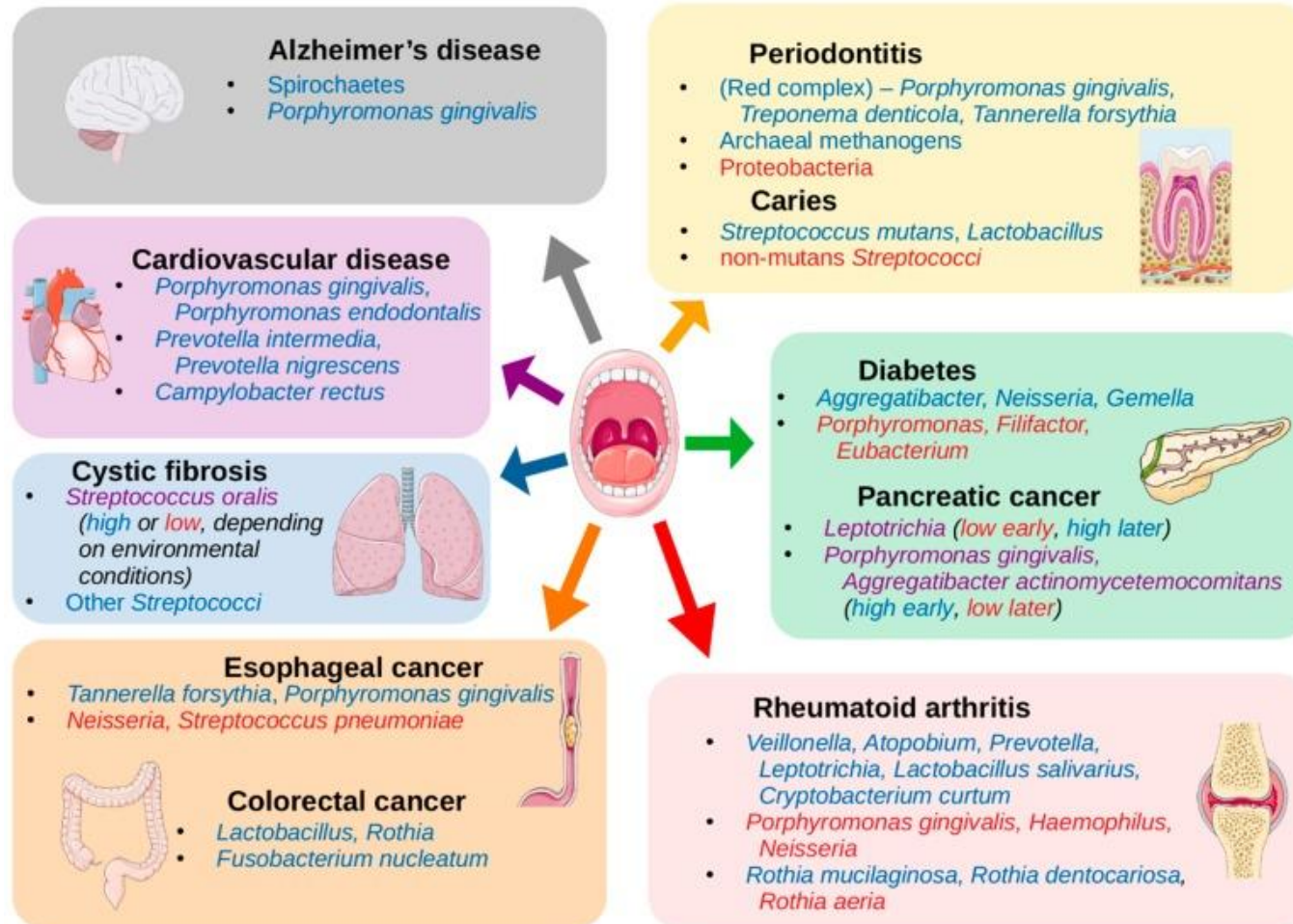


Microbial colonization occurs on all available surfaces, and microorganisms can also penetrate epithelial tissues and cells. The microbiota assembles into biofilm communities on the abiotic and biotic surfaces. In health (left), eubiotic biofilms maintain a homeostatic balance with the host. In disease (right), caries and periodontitis ensue when biofilms become dysbiotic, resulting in increased levels and duration of low pH challenge and the induction of destructive inflammatory responses, respectively. EPS, extracellular polymeric substance; GCF, gingival crevicular fluid.

<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom – potenciální biomarker systémových onemocnění



orálního
mikrobiom
jako
neinvazivní
biomarker

Oral and systemic diseases associated with the oral microbiome. A representation of the associations found between diseases with increases or decreases of the abundances of organisms in the oral cavity. Organisms listed in blue have been shown to be increased in abundance in the oral cavity in individuals presenting with the noted disease, and organisms listed in red have been shown to be decreased. Those in purple may be either increased or decreased depending on the conditions or progression of the disease.

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom

Table 1. Host Factors to Modulate the Oral Microbiome.

Factor	Reference
Genetics	<ul style="list-style-type: none">- Genetic polymorphism in miRNA202 is involved in hBD1 salivary level as well as caries experience [64]- Genes expressed in dental enamel development are associated with molar–incisor hypomineralization [65]- GLUT2 and TAS1R2 genotypes individually and in combination are associated with caries risk [66]- Host genetic control of the oral microbiome in health and disease [67]- Microbial abundance and some aspects of the microbial population structure are influenced by heritable traits in saliva [68]
Immunity	<ul style="list-style-type: none">- Immune cell network mediating immune surveillance at oral mucosa and gingiva [69,70]- The innate host response in caries and periodontitis [71]- Secretory immunity with special reference to the oral cavity [72]
Attachment surface	<ul style="list-style-type: none">- Surface properties influence oral biofilm formation [73]- Differences in relation to the microbial diversity of modified resins during the initial phase of biofilm maturation [74]- Biomaterial-associated infection of implants and devices [46]
Diet	<ul style="list-style-type: none">- Vegan diet influences on the human salivary microbiota [75]- Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms [76]
Cigarette smoking	<ul style="list-style-type: none">- Smoking decreases structural and functional resilience in the subgingival ecosystem [77]- Firmicutes were statistically elevated in smokers at the expense of Proteobacteria and Fusobacteria in non-smokers [78]- Tobacco smoking affects the salivary gram-positive bacterial population [79]
Alcohol	<ul style="list-style-type: none">- Alcohol affects to the oral microbiome composition [80–82]
Oral hygiene	<ul style="list-style-type: none">- Toothbrushing frequency is related to the incidence and increment of dental caries [83]
Socioeconomic status	<ul style="list-style-type: none">- Socioeconomic factors, such as education and income, are associated with disparities in the prevalence and severity of periodontal disease [84]- A strong association between cariogenic bacteria and socioeconomic status was found [85]- Differences in socioeconomic status were reflected in the bacterial profile of saliva [86]

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom – metody analýzy

– místo odběru vzorku

- OM na různých místech dutiny ústní (slina, jazyk, patro, bukální sliznice, povrchy zubů, dásně, supra-/subgingivální plak, mandle, hrdlo) sice vykazuje celkovou podobnost, ale s rozdíly → ekologické niky
- obecný mikrobiální screening pro diagnostiku se provádí ze sliny nebo místně specificky z tekutiny dásňového sulku nebo z dentálního biofilmu

Molekulární analýza OM

qPCR

→ nejen gen pro 16S rRNA, ale také jiné geny, umožňuje také kvantifikaci

– Orální mikrobiom – metody analýzy

– mikrobiologické kultivace

- 250 druhů izolováno a charakterizováno
- OM komplexní → některé druhy se dosud nepodařilo kultivovat

– sekvenování z jedné buňky (single-cell sequencing NGS)

- původně vyvinuto pro účely imunitního profilování
- upraveno, aby umožňovalo hodnocení jednotlivých mikrobiálních buněk
- ↑ míru detekce nekultivovatelných organismů

– sekvenace 16S rRNA

- sekvenace konzervovaného genu pro 16S rRNA (bakterie) nebo ITS (internal transcribed spacer) oblasti DNA (plísň)
- nejčastější sekvenační metoda, levná
- pouze taxonomické údaje (omezená rozlišovací schopnost fylogeneticky příbuzných druhů/kmenů)

– celogenomové sekvenování (WGS – whole genome shotgun sequencing)

- DNA je náhodně fragmentována a pak podrobena Sangerovu sekvenování nebo NGS
- nástroj pro metagenomickou analýzu, paralelní hodnocení všech říší (bakterie, plísň, viry) v jednom vzorku
- nejen taxonomické údaje, ale i biologické funkční profily mikrobiální komunity
- evoluční analýza specifických organismů spojených s konkrétní chorobou nebo prostředím

genomika

MUNI
MED

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom – metody analýzy

– **transkriptomika** → vymezení exprese mikrobiálních a hostitelských genů v kontextu orálního zdraví a patologie

– sekvenování mRNA (metatranskriptomika)

→ pomocí náhodných hexamerových primerů

→ přehled o životaschopných a transkripčně aktivních mikrobech

→ paralelní hodnocení mikrobiálních a hostitelských transkriptomů → zkoumány za účelem posouzení interaktomu

– **metabolomika** → metabolické a funkční aktivity hostitele a jeho mikrobiomu → pohled na složité mezidruhové interakce

→ nízkomolekulární metabolity, proteiny

→ kapalinová/plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem, NMR

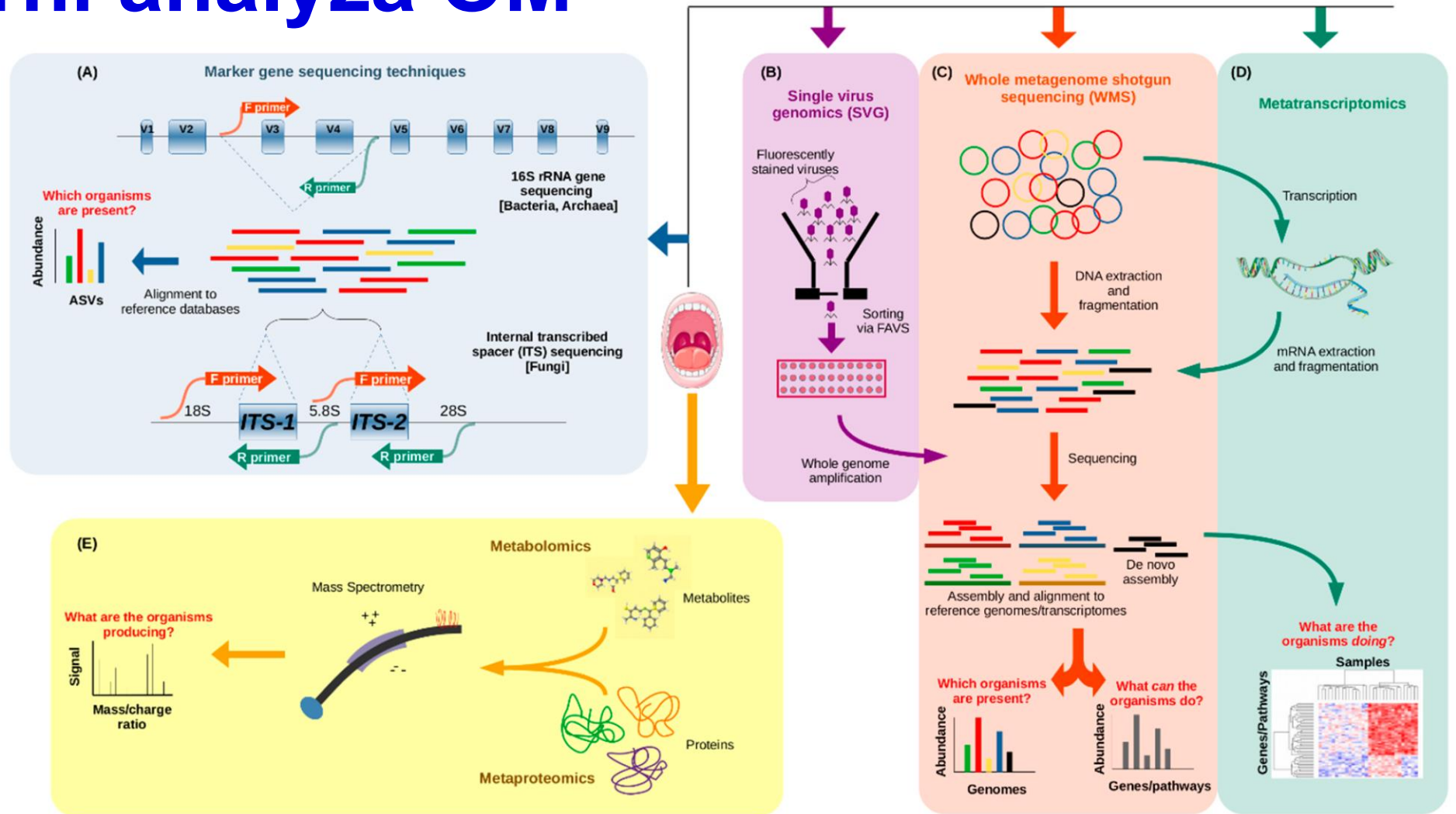
→ parodontitida → charakteristický posun ve složení orálních bakterií, který je zčásti zprostředkován bakteriálními metabolity → metabolomika → jak a proč k tomuto posunu dochází

→ může nabídnout vodítko pro kritické časové body, ve kterých by mohly být přínosné terapeutické zásahy

Molekulární analýza OM

- Orální mikrobiom– metody zkoumání
 - **proteomika** → profil všech proteinů v organismu, tkáni, buňce nebo biologické tekutině nebo podsložce kterékoli z nich → pohled při zdraví/nemoci
 - proteiny e vzorku → ne/jsou, množství, posttranslační modifikace, izoformy, molekulární interakce
 - 1-D/2-D gelová elektroforéza s hmot. spektrometrií, kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem
 - k charakterizaci změn při gingivitidě, mírné, středně těžké a chronické parodontitidě
 - vysoce rozlišovací techniky + klinické údaje + longitudinální studie → pochopení interakcí mikrobiálních hostitelů od druhové úrovně po molekulární úroveň a jejich důsledků na orální zdraví

Molekulární analýza OM



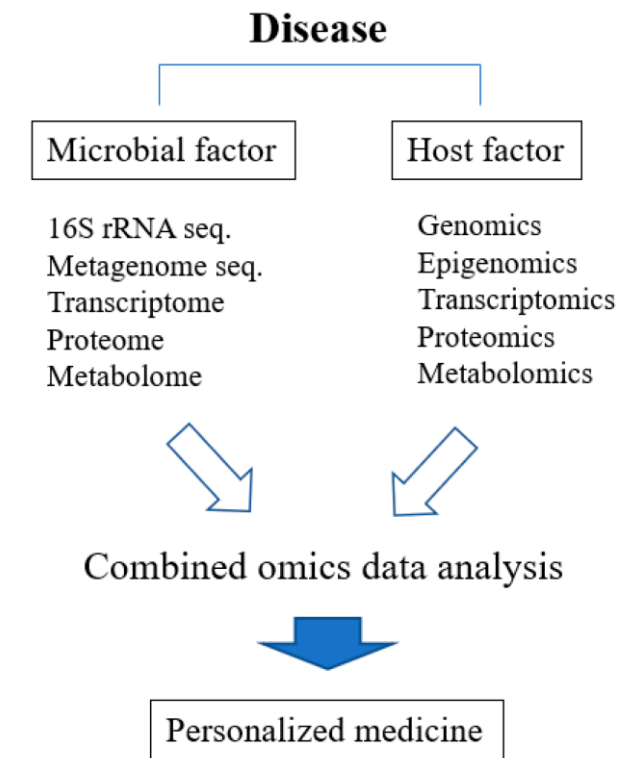
Schematics of standard techniques used in microbiome studies. **(A)** Marker gene sequencing techniques can use primers to target certain conserved regions of a genome to capture intermittent variable regions, which can then be used to identify organisms in a sample rapidly and inexpensively. The 16S rRNA gene is the most commonly used marker gene in bacteria and archaea, and in the figure, primers are used to capture the V3 and V4 variable regions together, a common approach for 16S sequencing. The internal transcribed spacer (ITS) region of the nuclear rRNA cistron in fungi is made of two segments, which can be captured with primers targeting the 18S, 5.8S, and 28S rRNA sections that surround them. **(B–D)** Instead of targeting one small segment of the genome, these techniques capture the entirety of the genetic material from an organism. **(B)** Single virus genomics (SVG) uses a fluorescent stain to isolate individual virus particles in a sample by fluorescence-activated virus sorting (FAVS), wherein they are embedded in an agarose bead before undergoing whole genome amplification and sequencing. **(C)** Whole metagenome shotgun sequencing (WMS) involves the fragmentation of all DNA in a sample, sequencing of the fragments, and assembly of the sequences, which can then be mapped to reference genomes, or de novo assembly can be performed. **(D)** Metatranscriptomics also involves a shotgun sequencing approach, but it is performed after mRNA extraction. The outputs then allow for differential gene expression analysis. **(E)** Metabolomics and metaproteomics allow for quantification of the metabolites and proteins produced by the microbiome in a sample, respectively. Mass spectrometry is a common approach to quantification.

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom

→ klinická uplatnění

- predikce náchylnosti k onemocněním DÚ
- mikrobiální screening na systémová onemocnění
- včasná diagnóza onemocnění (ještě před výskytem symptomů)
- sledování průběhu onemocnění a účinnosti léčby (posun mikrobioty z dysbiózy), cílená léčba
- účinný nástroj pro prevenci (viditelný důkaz přístupu pacienta k péči o chrup)
- vývoj nových terapeutických přístupů, personalizovaná dentální léčba
- výzkum – snaha o úplnou charakterizaci „zdravého“ mikrobiomu (Které komponenty mikrobiomu je nejvhodnější sledovat, aby bylo možné vyhodnotit návrat mikrobiomu ze stavu dysbiózy do stavu kompatibilního se zdravím? Stačí sledovat pouze vybrané klíčové druhy nebo je nutné používat vícedruhové eseje?)



Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom– metody analýzy

– testovací v ordinaci (chair-side/point-of-care testování):

náchylnost k zubnímu kazu – přístroj **CariScreen Susceptibility Testing Meter** (Oral BioTech LLC)

→ bakteriální aktivita *S. mutans*

→ po setření plaku ze zubní plošky dojde ve speciální štětičce k bioluminiscenční reakci ATP, která je změřena přístrojem

parodontitida – BANA-Enzymatic test™ kit, Evalusite kit (imunoesej)

– laboratorní analýza

komerční testy - příklad

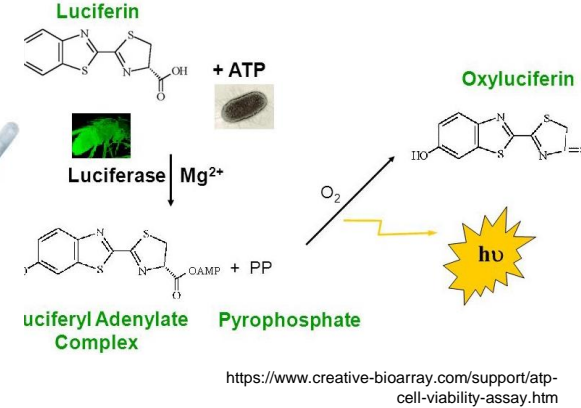
parodontitida – kit MyPerioPath® (OralDNA Lab)

→ testuje ze sliny přítomnost a množství 11 bakterií, které přispívají ke vzniku parodontitidy (analýza metodou kvantitativní PCR v reálném čase)

ELISA test → antigeny *P. gingivalis*



<https://carifree.com/product/pro-cariscreen-testing-meter/>



MYPERIOPATH®	
High Risk Pathogens	
Aa	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Pg	Porphyromonas gingivalis
Tf	Tannerella forsythia
Td	Treponema denticola
Moderate Risk Pathogens	
En	Eubacterium nodatum
Fa	Fusobacterium nucleatum/periodontium
Pi	Prevotella intermedia
Cr	Campylobacter rectus
Pm	Peptostreptococcus (Micromonas) micros
Low Risk Pathogens	
Ec	Eikenella corrodens
Cs	Capnocytophaga species (gingivalis, ochracea, sputigena)

Molekulární analýza OM

Table 2. Examples of biomarker assay kits in the market.

Microbiological assay	Subgingival plaque	Evalusite	<i>Aa, Pg, Pi</i>	Sandwich enzyme immunoassay (Colorimetric assays)	Chairside	
	Subgingival plaque	BANA-Enzymatic test kit	<i>Pg, Td, Tf</i>	BANA hydrolysis reaction (Colorimetric assays)		
	Gums and plaque	OMNIgene ORAL/OMR-110	Characterization of virus species of all genome type including <i>Aa, Pg, Pt, Fn, Td, Ec</i>	DNA hybridization	Company or research laboratory	
	Saliva	OMNIgene ORAL/OM-501, 505				
	Subgingival plaque	Carpegen® Perio Diagnostik	<i>Aa, Pg, Tf, Td, Fn, Pi</i>	Real-time qPCR		
	Oral rinse	MyPerioPath®	<i>Aa, Pg, Td, Tf, En, Fn, Pi, Cr, Pm, Ec, Cs</i>	DNA hybridization		
	Microbiological samples/subgingival plaque	iai Pado Test	<i>Aa, Pg, Pi, Td, Tf, Fa</i>	DNA hybridization		
	Subgingival plaque	micro-IDent® plus11	<i>Aa, Pg, Pi, Tf, Td, Pm, Fn, Cr, En, Ec, Cs</i>	DNA hybridization		
Genetic assay	Cheek swab	PerioPredict™	genes for IL-1	DNA hybridization		Company laboratory
	Oral rinse	MyPerioID® IL-6 or IL-1	genes for IL-6 or IL-1	Genetic polymorphisms detection		

GCF: Gingival crevicular fluid, AST: Aspartate aminotransferase, aMMP: active Matrix metalloproteinase, Aa: Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Pg: Porphyromonas gingivalis, Pi: Prevotella intermedia, Td: Treponema denticola, Tf: Tannerella forsythia, Fn: Fusobacterium nucleatum, Ec: Eikenella corrodens, En: Eubacterium nodatum, Fn: Fusobacterium nucleatum/periodonticum, Cr: Campylobacter rectus, Pm: Peptostreptococcus (Micromonas) micros, Cs: Capnocytophaga species (gingivalis, ochracea, sputigena), Fa: Filifactor alocis, IL: Interleukin, qPCR: quantitative polymerase chain reaction.

Molekulární analýza OM

– Orální mikrobiom

– databáze

The screenshot shows the homepage of the expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD). The header includes the website name, navigation menu, and logos for Forsyth and the National Institute of Dental and Craniofacial Research. The main content area is divided into several sections: a left sidebar with navigation links, a central 'Welcome to eHOMD' section with a detailed description of the database's goals and data, and a right sidebar with search and update information.

Navigation Menu: Home | Taxon Description | 16S rRNA RefSeq | Genomes | Proteomes | HOMD Tools | Download | HOMD Information | Page: HP1 | 16S rRNA RefSeq V15.22 | Genomic RefSeq V9.14

Left Sidebar:

- Taxon Description
 - Taxon Table
 - Taxonomic Hierarchy
 - Taxonomic Level
 - Download Taxonomy Data
- 16S rRNA RefSeq
 - Identify 16S rRNA using BLASTN
 - View 16S rRNA RefSeq Phylogenetic Tree
 - Download RefSeq & Taxonomy
 - HOMD 16S rRNA RefSeq Version History
- Genomes
 - Taxa with Annotated Genomes
 - All Oral Genomes
 - All Genomes
 - HOMD JBrowse Genome Viewer »
 - Genomic Trees »
 - Download Genomic Data
 - HOMD Reference Genome Version History
- Proteomes
 - View genomic tree based on conserved proteins
 - Download All Protein Sequences Annotated from Genomes
- HOMD Tools
 - HOMD JBrowse Genome Viewer »
 - View Genome Annotation
 - BLAST Against HOMD Genomes »
- Download
 - Download HOMD Data
 - HOMD FTP Site
 - HOMD Posters
 - Oralgen »
- HOMD Information
 - How to cite HOMD
 - Project Description
 - Strains and DNA Availability
 - Team

Welcome to eHOMD

The goal of creating the expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD) is to provide the scientific community with comprehensive curated information on the bacterial species present in the human aerodigestive tract (ADT), which encompasses the upper digestive and upper respiratory tracts, including the oral cavity, pharynx, nasal passages, sinuses and esophagus. eHOMD should also serve well for the lower respiratory tract. Currently, eHOMD includes a total of 775 microbial species, 687 from version 14.51 of HOMD and 88 added in this expansion based on publicly available data on the microbiota of the aerodigestive tract outside of the mouth. Of all the species, 57% are officially named, 13% unnamed but cultivated and 30% are known only as uncultivated phylotypes. One important aspect of the eHOMD, is that it presents a provisional naming scheme for the currently unnamed taxa, based on the 16S rRNA sequence phylogeny, so that strain, clone and probe data from any laboratory can be directly linked to a stably named reference scheme. The eHOMD links sequence data with phenotypic, phylogenetic, clinical and bibliographic information. Genome sequences for aerodigestive tract bacteria determined as part of the HOMD project, the Human Microbiome Project and other sequencing projects are being added to the eHOMD as they become available. A total of 2074 oral/nasal genomes, representing 529 taxa (67% of all taxa, 95% of cultivated taxa) are currently available on eHOMD with annotations and can be viewed in a genome browser software. In addition, eHOMD includes 14 non-oral/non-nasal taxa to recruit reference genomes in phyla with no or few oral representatives (Chlorobi, Chloroflexi, GN02, TM7, SR1, WPPS-2. Hence, the total number of genomes are 2087 including non-oral/non-nasal taxa. The eHOMD site offers easy to use tools for viewing all publicly available ADT bacterial genomes. Welcome!

Primary Investigators: Tsute Chen, Floyd E. Dewhirst, Isabel Fernandez Escapa, Yanmei Huang, Katherin P. Lemon, Bruce J. Paster, and William G. Wade

Current Research Contributors: Erica Prosdociami, Hayley Thompson, Nezar Al-hebshi, and Prasad Gajare.

Past Research Contributors: Oxana Baranova, Jessica Blanton, Anuj Camanocha, Derrick Fouts, Akila Ganesan, Jacques Izard, Taylor Joyce, Alice Kirega, Erin Klein, Abby Lakshmanan, Cori Leonetti, Maoxuan Lin, Emmanuel Mongodin, Alexandra Rybalka, Derek Spencer, Anne Tanner, Sonia Vartoukian, Griffin Weigle, Larry Yang, and Wen-Han Yu

This project is supported by: 1) Grant R37-DE016937 "A Foundation for the Oral Microbiome and Metagenome" from The National Institute of Dental and Craniofacial Research; 2) A pilot grant "Expanding the HOMD to Include Nasal- and Skin-associated Bacteria" funded by Harvard Catalyst

Meta-Database Search: Search box with 'Advance' and 'Search' buttons.

Announcement:

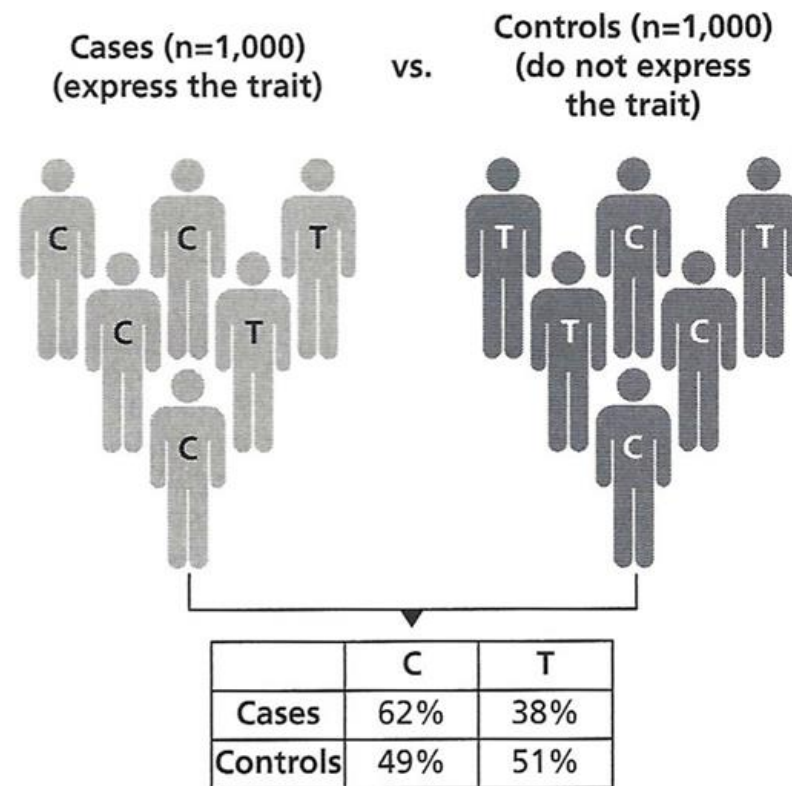
- 2020-11-13 13:51:21 eHOMD has been updated to V9.14 [more]
- 2018-12-05 09:51:58 New eHOMD publication! [more]
- 2018-03-31 07:07:12 Change of taxon ID prefix from HOT to HMT [more]
- 2018-02-02 09:36:22 [more]

Database Update:

- 2017-11-22 01:11 Genome Annotation Update - Stenotrophomonas nitritireducens DSM 12575 [more]
- 2017-02-27 16:02 Genome Annotation Update - [more]
- 2016-02-26 23:02 Genome Annotation Update - Staphylococcus warneri L37603 [more]
- 2016-02-26 17:02 Genome Annotation Update - Streptococcus vestibularis [more]

Genetické asociační studie kandidátních genů (case-control studies)

Case-control study for genetic association



<http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture25.html>

Genetické asociační studie

– Kandidátní geny

– Výběr vhodných kandidátních genů

→ na základě známé biologické, fyziologické anebo funkční významnosti ve vztahu k danému onemocnění

→ hledání nových potenciálních genů (alel) v celém genomu (GWAS, QTL – lokusy kvantitativních znaků)

– Výběr vhodných kandidátních genů pro studie zubního kazu

→ geny, které se účastní vývoje zubu a ovlivňují tak jeho morfologii

→ geny, které souvisí s imunitní odpovědí

→ geny, které souvisí s produkcí a složením sliny

→ geny, které souvisí s chuťovými preferencemi

Genetické asociační studie

– Kandidátní geny

– Výběr alel (polymorfismů)

→ SNP (Single Nucleotide Polymorphism), CNV (Copy Number Variation), VNTR (Variable Number of Tandem Repeat)

→ na základě studií, které již byly provedeny v rámci jiných populací

→ alela má v dané populaci dostatečnou frekvenci
(větší soubor případů/kontrol → můžeme si dovolit studovat alely i s nižší frekvencí v populaci)

→ vazebná nerovnováha mezi SNPs → tagSNP

Genetické asociační studie

– Metody genotypizace

– výběr vhodného metodického přístupu

→ počet polymorfismů, které budou stanovovány

→ celkový počet vzorků, které budou genotypizovány

→ kvalita analyzované DNA (genomová DNA – krev, slina, bukální stěr)

→ náklady na přístroje, chemii a spotřební materiál

→ dostupnost komerčních služeb pro genotypizaci

Genetické asociační studie

– Metody genotypizace

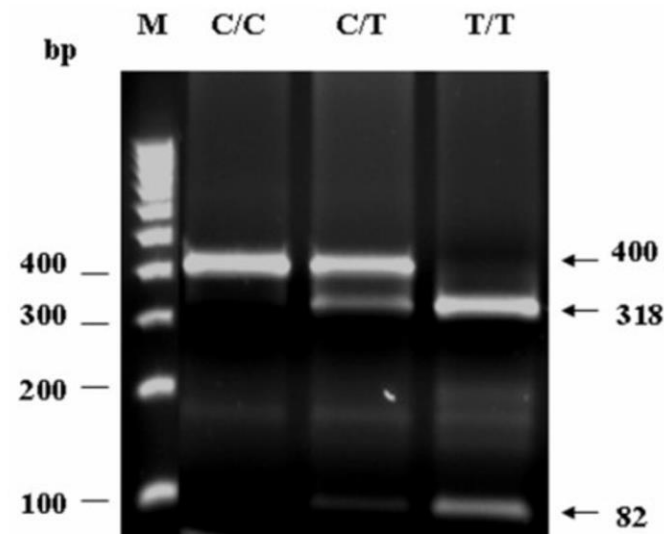
- **PCR+RFLP** (restriction fragment length polymorphism)
= *polymorfizmus délky restričních fragmentů*
→ PCR s následným specifickým restričním štěpením

SNP součástí
palindromní sekvence



I. alela → 5'... GAG**T**C ... 3'

II. alela → 5'... GAG**C**C ... 3'



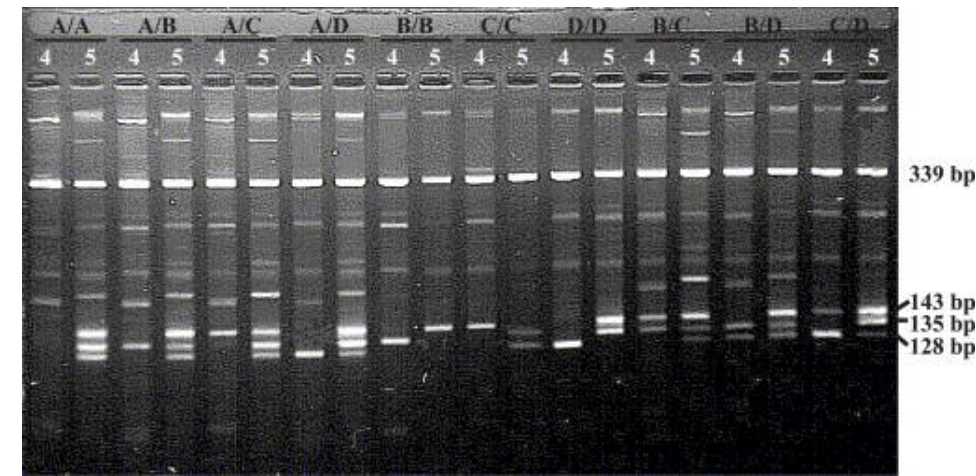
Huang, BCM Cancer (2008)

Genetické asociační studie

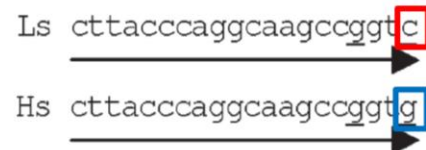
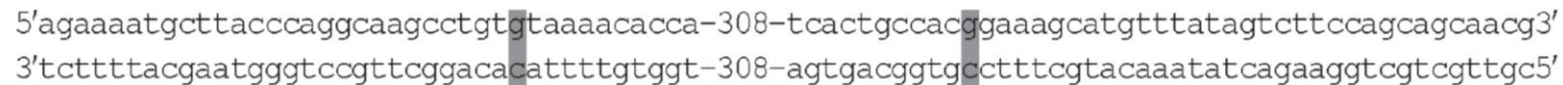
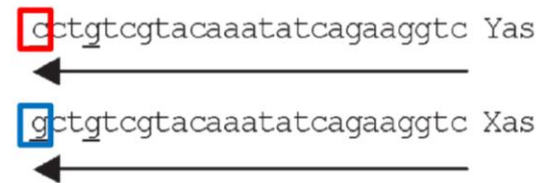
– Metody genotypizace

- **alelově specifická PCR**

→ primer specifický pro SNP → jestliže je přítomný daný SNP dojde k amplifikaci → vznik detekovatelného produktu



<https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.10.007>

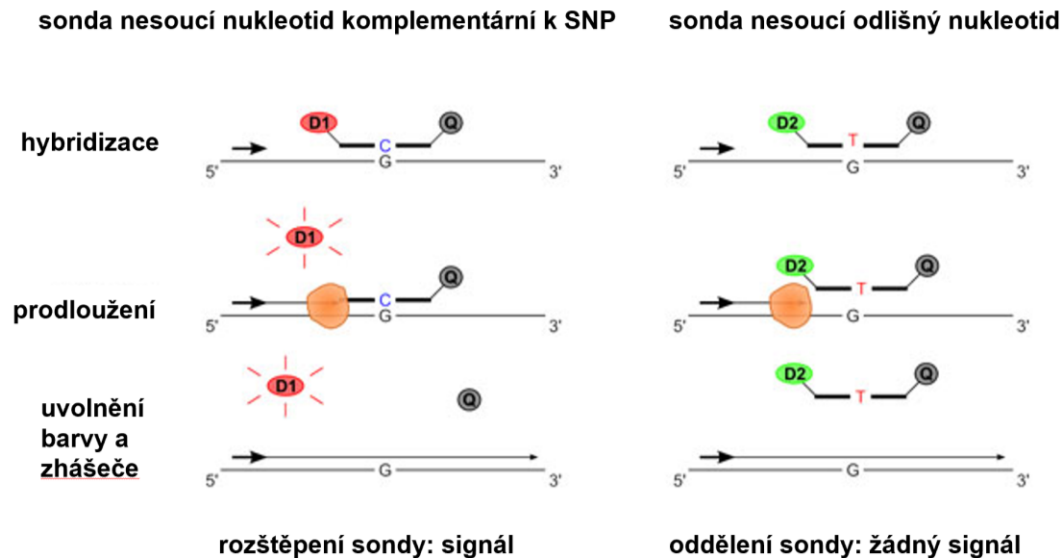
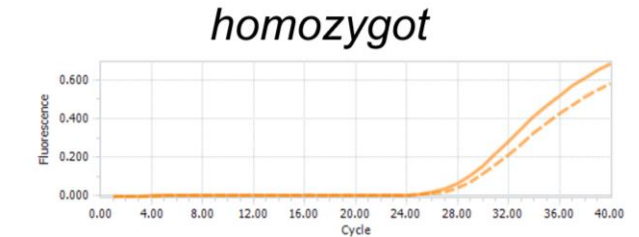
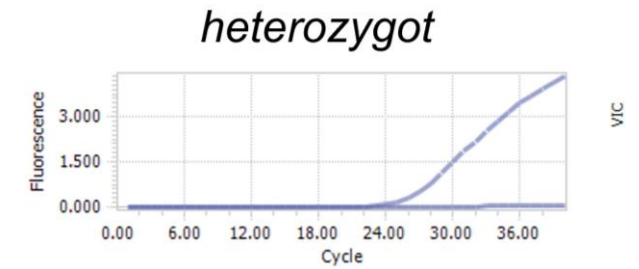


Genetické asociační studie

– Metody genotypizace

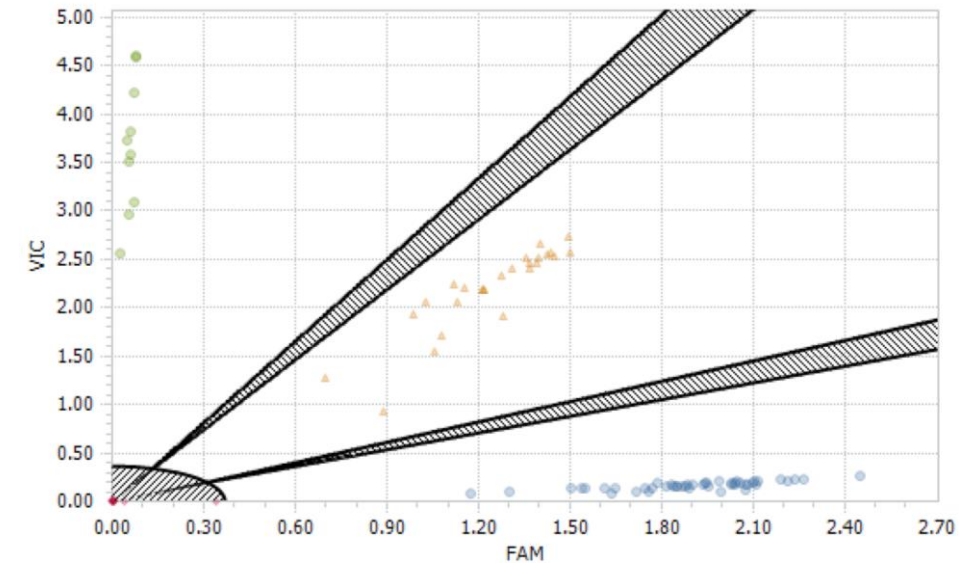
- **real-time PCR**

→ komerční sondy TaqMan (Thermo Fisher Scientific) → fluorescenčně značené hybridizační sondy



D1 barva 1
 D2 barva 2
 Q zhášeč
 ● DNA polymerasa
 → Forward primer

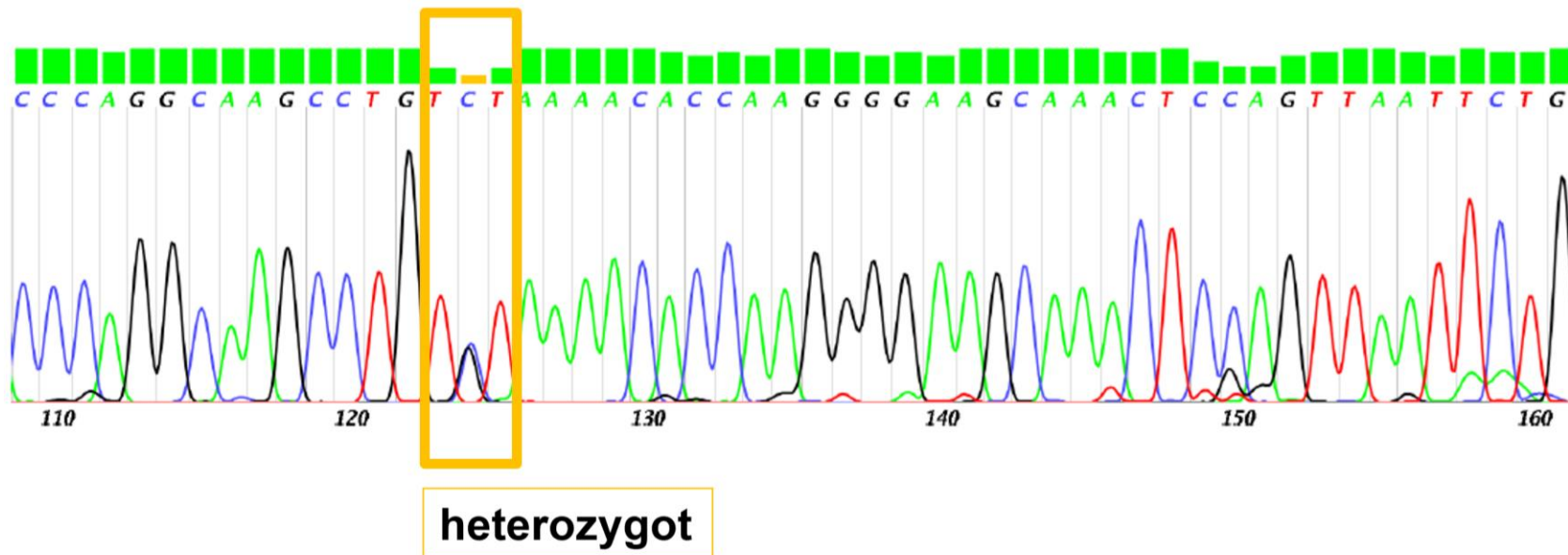
<http://www.applied-maths.com/applications/taqman-based-snp-genotyping>



Genetické asociační studie

– Metody genotypizace

- **sekvenační analýza**
 - kompletní sekvence vybraného úseku



Genetické asociační studie

- Metody genotypizace
 - Single Nucleotide Polymorphism Detection with the iPLEX® Assay and the MassARRAY® System



Genetické asociační studie

Comparison of methods used for mannose-binding lectin gene (*MBL2*) genotyping.

	Allele-Specific PCR (AS-PCR)	ARMS ³ /Double ARMS ³ (+ Multiplex Allele-Specific PCR)	PCR and Restriction-Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)	Commercial TaqMan Assay ⁵	High-Resolution Melt Analysis (HRMA)	Commercial INNO-LiPA MBL2 kit (Reverse PCR-SSOP)	Pyro-Sequencing	Sanger Sequencing	<i>MBL2</i> SNaPshot Assay
principle of allele discrimination/detection	PCR with a primer specific for one allele	PCR with primers specific for both alleles	allele-specific enzymatic cleavage of PCR amplicon	allele-specific hybridization of fluorescently labelled probe	temperature-dependent allele-specific hybridization of fluorescently labelled probe	hybridization of biotinylated PCR product with membrane immobilized sequence-specific oligonucleotide probes	chemiluminescence-based detection of nucleotides during sequencing-by-synthesis reaction	detection of the sequence of an oligonucleotide amplified in PCR with fluorescently labelled dideoxynucleotides	allele-specific SBE by a single fluorescently labelled dideoxynucleotide (minisequencing)
post-PCR analysis	yes	yes	yes	no	no, when real-time PCR thermocycler is used	yes	no	yes	yes
analysis time	2 h ²	2–3 h ²	2 h + 1–3 h ⁴	1–2 h ⁶	1–1.5 h + 2–8 min. ⁸	3–4 h	2–3 h	6–7 h	5–6 h
number of work steps	2 (PCR, gel analysis)	2 (PCR, gel analysis)	4 (PCR, gel analysis, RFLP, gel analysis)	1 (real-time PCR)	1 (when real-time PCR thermocycler is used for PCR and subsequent melting temperature analysis)	9 (PCR, gel analysis, denaturation, hybridization, 2 washing steps, 3-step color development)	4 (PCR, gel analysis, purification, pyrosequencing)	5 (PCR, enzymatic cleaning, sequencing reaction, purification, analysis on sequencer)	5 (PCR, enzymatic cleaning, SBE reaction, enzymatic cleaning, analysis on sequencer)
automatic analysis	no	no	no	yes	yes	no	yes	yes	yes
number of analyses for complete <i>MBL2</i> haplogenotype¹	12	6	6	6	5	1	4 ⁹	2	1
number of oligonucleotide primers + labelled primers/probes for complete <i>MBL2</i> haplogenotype¹	24 primers	15 primers	6 primers	6 TaqMan assays (12 primers + 12 TaqMan probes)	10 primers + 5 TaqMan probes	4 primers	8 primers + 4 biotinylated primers	2 primers	8 primers
estimated cost of analysis of whole haplogenotype¹	1 USD	1 USD	2 USD	2 USD	1 USD	product was discontinued	2 USD	5 USD	1.50 USD
input amount of template DNA	20–200 ng	20–200 ng	50–500 ng	1–20 ng	10–20 ng	200–500 ng	10–100 ng	10–250 ng	10–100 ng
assay robustness	low	low	low–medium	medium–high	high	low–medium	medium	medium–high	medium–high
special equipment requirement	-	-	-	real-time PCR thermocycler	real-time PCR thermocycler or fluorescence scanning/detection system	water bath with shaking platform, aspiration apparatus	vacuum prep workstation, pyrosequencing machine	automated DNA sequencer	automated DNA sequencer
SNP genotyping throughput	low	low	low	high	high	medium	high	high	high
software for automatic allele calling	no	no	no	yes (SDS software, SNPman program) ⁷	yes (real-time PCR instruments with HRMA compatible software with genotype auto-calling function)	no	no	yes (Mutation Surveyor, GeneMarker, Minor Variant Finder Software, SeqScape™ Software, Variant Reporter™ Software) ¹⁰	yes (GeneMapper, GeneMarker) ¹¹
Ref.	[41]	[30,42]	[43,44]	[27]	[28]	[29]	[45]	[37]	-

¹ rs11003125, rs7096206, rs7095891, rs5030737, rs1800450 and rs1800451; ² Analysis time depends on polymerase chain reaction (PCR) length and gel concentration; ³ ARMS—amplification refractory mutation system; ⁴ Separation time depends on gel concentration and the length of cleaved fragments; ⁵ TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems), probes: C__11876879_10 (rs11003125), C__27858274_10 (rs7096206), C__26813436_10 (rs7095891), C__2336610_10 (rs5030737), C__2336609_20 (rs1800450) and C__2336608_20 (rs1800451); ⁶ depends on number of cycles; ⁷ Sequence Detection Software (SDS) by Applied Biosystems™ (www.thermofisher.com (accessed on 2 November 2020)), SNPman program by Konopac et al. [46]; ⁸ Time of temperature melt analysis depends on a temperature range and thermal ramp rate of the instrument; ⁹ Due to the proximity of the three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in exon 1 only one analysis is needed to determine these SNPs; ¹⁰ Mutation Surveyor® and GeneMarker® by SoftGenetics® (https://softgenetics.com (accessed on 2 November 2020)), Minor Variant Finder Software, SeqScape™ Software and Variant Reporter™ Software by Applied Biosystems™ (www.thermofisher.com (accessed on 2 November 2020)); ¹¹ GeneMapper™ by Applied Biosystems™ (www.thermofisher.com (accessed on 2 November 2020)), GeneMarker® by SoftGenetics® (https://softgenetics.com (accessed on 2 November 2020)). Single-base extension (SBE). Mannose-binding lectin gene (*MBL2*). Reverse hybridization with membrane-immobilized sequence-specific oligonucleotide probes (reverse PCR-SSOP).

Genetické asociační studie

– Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu

– Proteiny zapojené do vývoje skloviny

AMELX – gen pro amelogenin

ENAM – gen pro enamelin

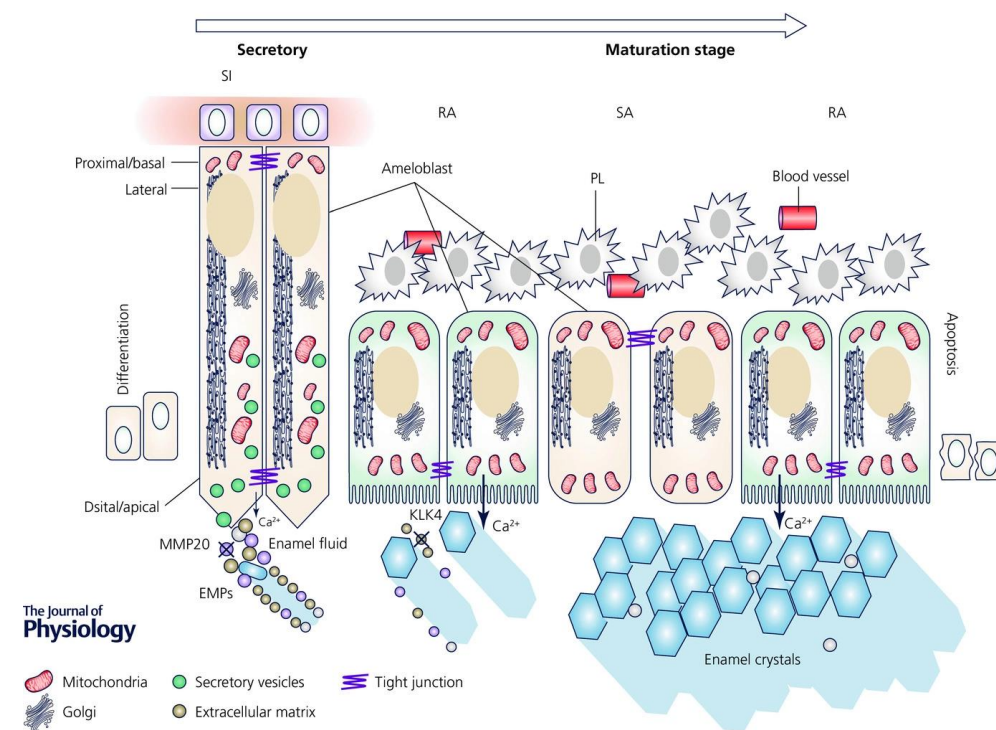
TUFT1 – gen pro tuftelin

KLK4 – gen pro kallikrein 4

AMBN – gen pro ameloblastin

TFIP11 – gen pro protein interagující s tuftelinem

MMPs (MMP20) – geny pro matrixové metaloproteinázy

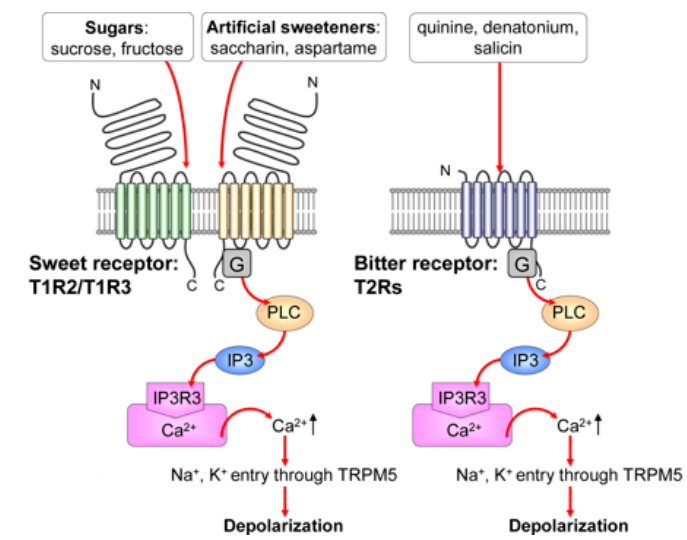


Schematic diagram of histological changes in amelogenesis. The histological development of enamel crystals goes hand in hand with changes in ameloblast morphology. Undifferentiated epithelial cells receive signals to transform into secretory ameloblast cells of some 75 μm tall and $\sim 5 \mu\text{m}$ in diameter with a specialized distal cell process (Tomes' process) which plays an important role in matrix exocytosis. These same cells will retransform into shorter cells ($\sim 35 \mu\text{m}$ tall) during maturation devoid of the Tomes' process. In maturation stage, ameloblasts undergo cyclical changes from a cell with a distal ruffled border, the ruffled-ameloblast (RA), to a cell with a smooth distal border, the smooth-ameloblast (SA). Tight junctions are found at the basal and apical pole of secretory ameloblasts. The apical or distal pole is closest to the enamel crystals. In RA cells, tight junctions are found only at the apical pole but in SA cells they are located at the basal pole. Organellar distribution differs in cells at each stage (see text for details). SI = stratum intermedium, PL = papillary layer, EMPs = enamel matrix proteins. MMP20 and KLK4 are the main proteases in AMEL processing. See also organellar distribution at each stage.

<https://doi.org/10.1113/JP272775>

Genetické asociační studie

- Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu



<https://doi.org/10.3390/s100403411>

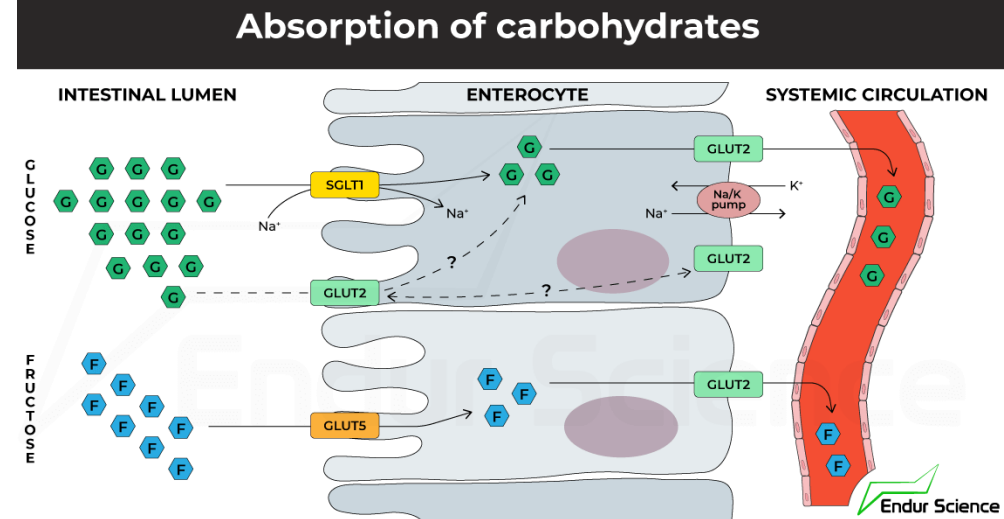
- Chuťové receptory → asociace s preferencí ke sladké chuti → ↑ příjem cukrů

TAS2R38 – gen pro chuťový receptor (Taste receptor 2 member 38) – receptor spřažený s G-proteinem, zodpovědný za citlivost k hořké chuti

TAS1R1/TAS1R3 – geny pro chuťové receptory (Taste receptor 1 member 1/3) – receptory spřažené s G-proteinem, zodpovědné za citlivost ke sladké chuti

Genetické asociační studie

- Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu



<https://doi.org/10.3390/s100403411>

- Glukózový transportér → asociace s preferencí ke sladké chuti → ↑ příjem cukrů

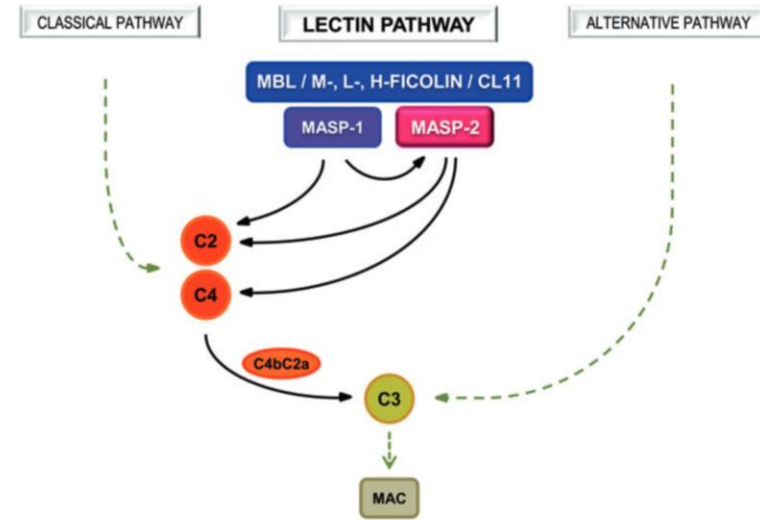
GLUT2 – gen pro glukózový transportér 2 – potřebný pro glukózou stimulovanou sekreci inzulínu (β -buňky pankreatu), řídí vnímání glukózy (nervový systém) → kontrola příjmu potravy, jeho exprese nutná pro fyziologickou kontrolu genů citlivých na glukózu a její inaktivace vede ke zhoršené glukózou stimulované sekreci inzulínu (játra).

Genetické asociační studie

- Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu

- Proteiny imunitní odpovědi

MBL2 – gen pro lektin vázající manózu (mannose-binding lectin) – rozpustný sérový lektin rozpoznávající specifické sacharidy na površích bakterií → ↓ aktivace komplementu



Schematic representation of the lectin pathway of the complement system. The lectin pathway (LP) is triggered by five pattern recognition receptors (PRR): mannose-binding lectin (MBL), ficolin-1, -2, and -3, and collectin 11 (CL11 or CL-K1). The LP is initiated when these PRRs bind to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) on the surface of pathogens or to apoptotic or necrotic cells (damage-associated molecular patterns, DAMPs). Circulating MBL, CL11, and ficolins form complexes with MASP-1 and MASP-2. After the binding of MBL, ficolins, and CL-11 to their targets, MASP-1 auto-activates and triggers MASP-2. Activated MASP-2 cleaves C4 and C2 allowing the assembly of the C3 (C4bC2a) and C5 (C4bC2a(C3)_n) convertases and the subsequent activation of the terminal pathway. Activated MASP-1 also cleaves C2. MAC = membrane attack complex.

https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9209-2_7-1

<https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1856821>

Genetické asociační studie

– Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu

– Proteiny sliny

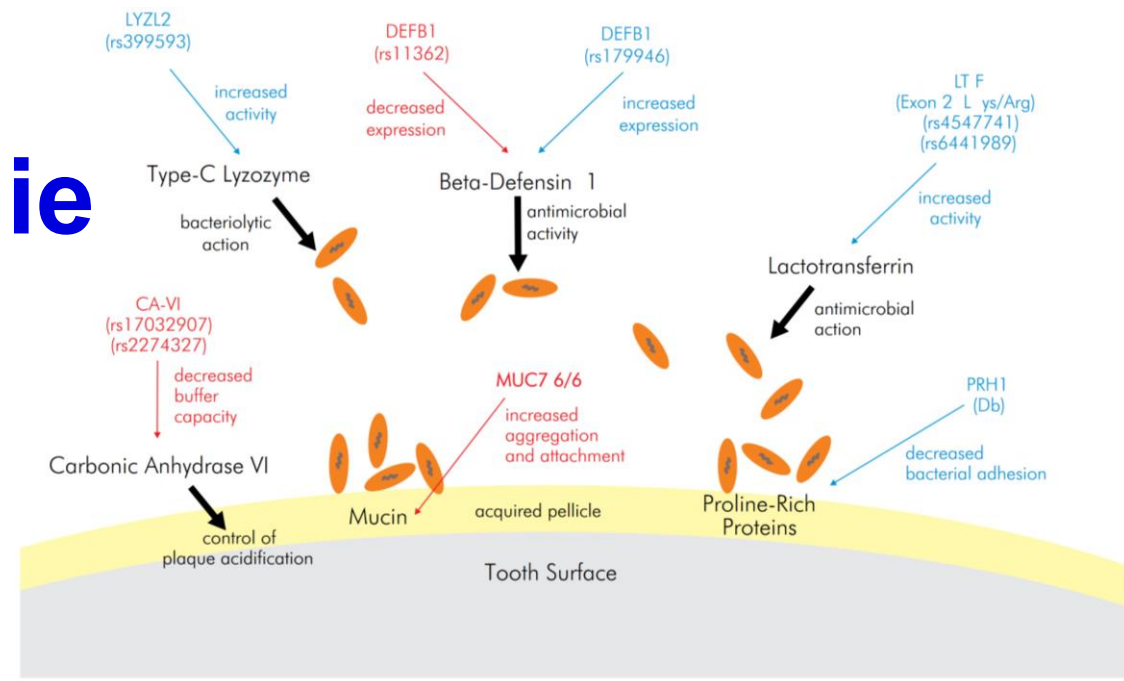


Figure 4. Salivary proteins and functions (black) that present polymorphisms associated positively (red) or negatively (blue) with dental caries experience. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0041>

DEFB1 – gen pro beta defenzin 1 – antimikrobiální peptid z rodiny defenzinů (alfa, beta), která zahrnuje cyklické kationtové peptidy bohaté na cystein. Jsou součástí vrozené imunity, vytváří kanály v cytoplasmatické membráně bakterií, stimulují imunitní systém vč. komplementu (klasická cesta), působí jako chemoatraktanty.

LTF – gen pro laktoferin – transportní globulární glykoprotein, váže volné železo. Součást vrozené imunity, antibakteriální (při interakci s bakteriální membránami vznikají peroxidy), antivirová (kompetice adheze virových částic na buňky hostitele, vazba na částice určitých typů virů), antifungální (proti *C. albicans*) aktivita, stimulace fagocytózy.

LYZL2 – gen pro lysozymu podobný protein 2 (lysozyme-like protein 2) – součástí rodiny lysozymů typu C. Hydrolyzuje glykosidické vazby v peptidoglykanech (rozkládá buněčnou stěnu G⁺ bakterií).

Genetické asociační studie

– Kandidátní geny asociované s rizikem vzniku zubního kazu

– Proteiny sliny

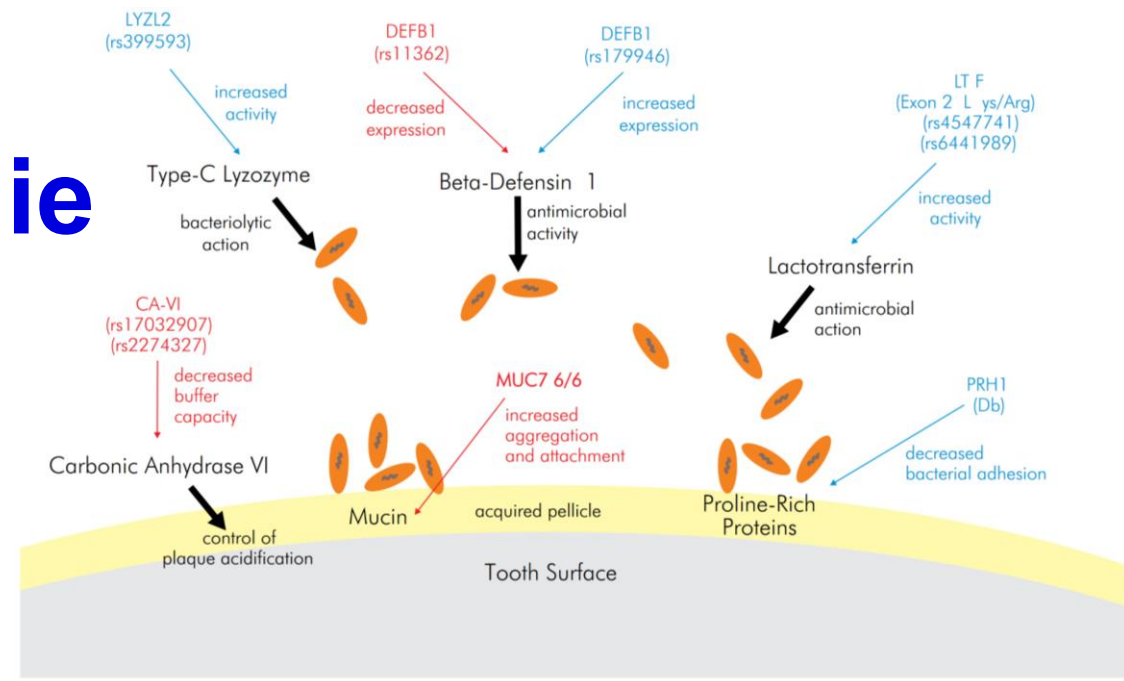


Figure 4. Salivary proteins and functions (black) that present polymorphisms associated positively (red) or negatively (blue) with dental caries experience.

<https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0041>

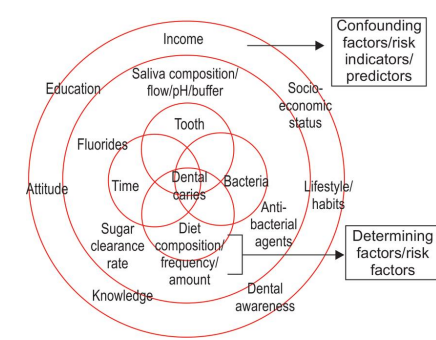
CA6 – gen pro karbonickou anhydrázu VI – enzym gustin, katalyzuje hydrataci oxidu uhličitého za vzniku hydrogenuhličitanového iontu a protonu, kontrola pH sliny (bikarbonátový pufrací systém).

MUC7 – gen pro mucin 7 – nízkomolekulární glykoprotein (MG2), podílí se na vzniku pelikuly a tím na bakteriální adhezi.

MUC5B – gen pro mucin 5B – glykoprotein, podílí se na vzniku pelikuly a tím na bakteriální adhezi.

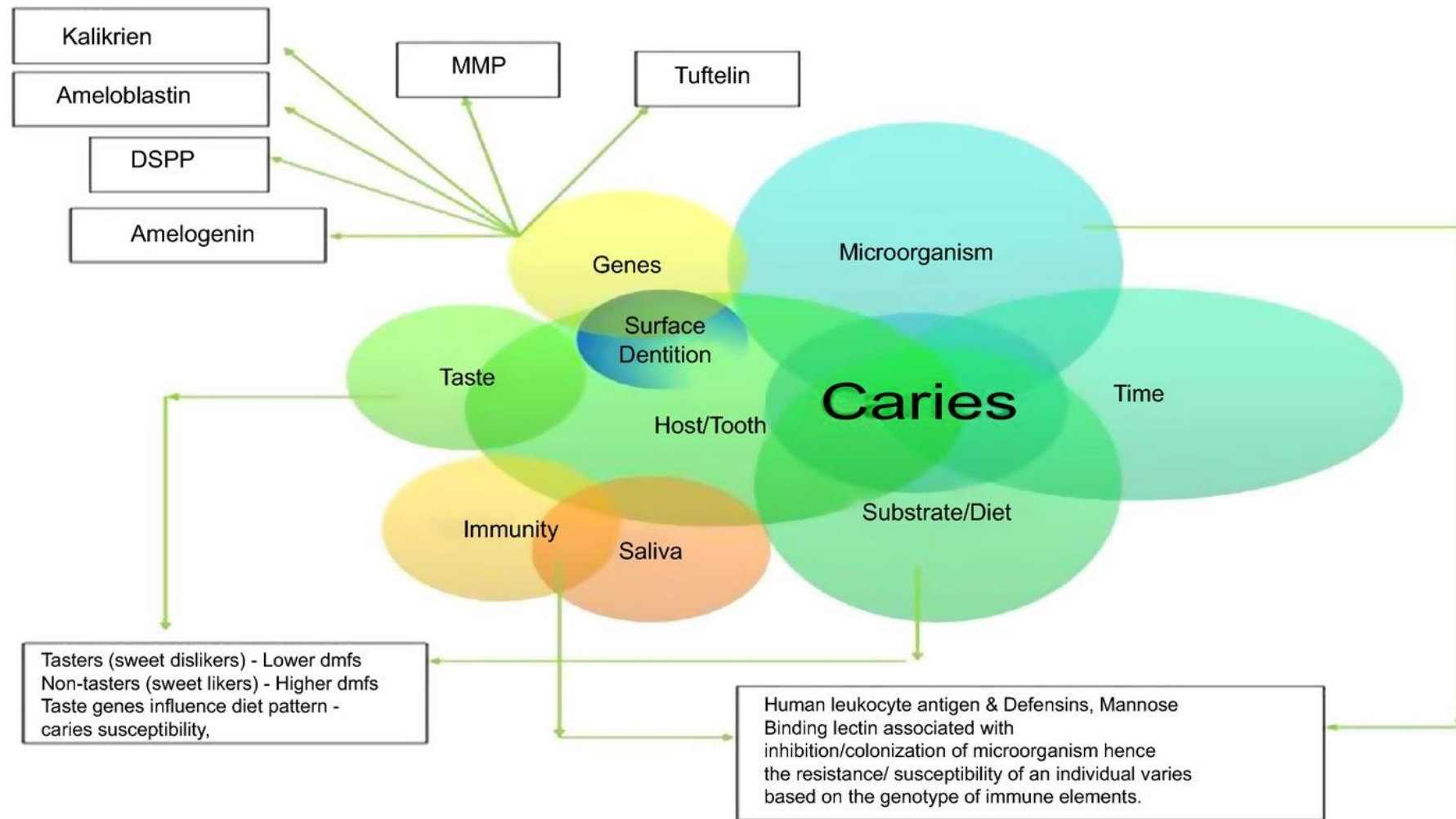
PRH1 – gen pro kyselý PRP – protein bohatý na prolin (proline-rich protein), podílí se na vzniku pelikuly a tím na bakteriální adhezi.

Genetické asociační studie



– Úskalí genetických asociačních studií ve vztahu k zubnímu kazu

- příliš mnoho faktorů majících úlohu v etiopatogenezi → pacienti (cases) nikdy nejde dokonale roztrdit do kategorií → nelze vytvořit dokonale definovaný soubor → maximálně definovaný soubor dle možností
- většina studií nepotvrdí asociaci pouze naznačí, ale málokdy potvrdí (některé studie dávají dokonce protichůdné výsledky) → další studie, nezbytné k porozumění předchozích nalezených korelací
- Další asociační studie s více vzorky → studie jednotlivých polymorfismů (ale jejich efekt může být malý), ale i genů a lokusů (gene-based a gene-cluster analýzy → další posílení výsledků
- meta-analýza – kombinace dat získaných vyčerpávajícím vyhledáváním publikovaných i nepublikovaných světových dat → zvyšování konzistence výsledků (tím, že se zvyšuje síla výsledku). Mnoho primárních studií je příliš malých nato, aby mohly prokázat důležitý klinický účinek (nemají dostatečnou sílu). Kombinací všech studií, které odpovídají na stejnou klinickou otázku → zvýšení statistické, klinické nebo významové síly.
- podrobné dotazníky pro zhodnocení vlivu psychologických, sociologických, ekonomických a behaviorálních faktorů → rozmělnění souboru na příliš velké množství skupinek o příliš malém počtu pacientů



M U N I

M E D