

LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY PALACKÉHO V OLMOUCI

Doktorandská disertační práce

Mikrobiální analýza parodontitid

MUDr. Zdeněk Pokorný

Olomouc 2012

Obsah

1. Úvod	4
1.1. Teorie vzniku parodontitid	4
1.2. Rozdělení parodontitid	5
1.3. Biofilm	6
1.4. Rozdělení bakterií dle patogenity	7
1.5. Bakterie s vysokou patogenitou	9
2. Cíl práce	12
3. Mikrobiální analýza u pacientů s klinickými a rentgenologickými projevy agresivní parodontitidy	13
3.1. Úvod	13
3.2. Metodika	13
3.2.1. Výběr pacientů	13
3.2.2. Měření resorpce alveolární kosti	14
3.2.3. Vyšetření bakteriálního složení	15
3.3. Výsledky	17
3.4. Diskuse	28
3.5. Závěr	29
4. Mikrobiální analýza agresivních parodontitid – terapeutická část	30
4.1. Úvod	30
4.2. Používaná antibiotika v závislosti na periopatogenech a jejich patogenitě	30
4.3. Metodika	30
4.3.1. Výběr pacientů	30
4.3.2. Hodnocené parametry	31
4.3.3. Výběr antibiotik a mechanoterapie	31
4.4. Výsledky	31
4.5. Diskuse	35
4.6. Závěr	35

5. Mikrobiální vyšetření sulku implantátů a vlastních zubů u pacientů s léčenou parodontitidou	36
5.1. Úvod	36
5.2. Morfologie gingiválního sulku, spojovacího epitelu a sulku implantátu	36
5.3. Metodika.....	38
5.3.1. Výběr pacientů	38
5.3.2. Klinické vyšetření	39
5.3.3. Mikrobiologické vyšetření	39
5.4. Výsledky.....	39
5.5. Diskuse	46
5.6. Závěr	47
6. Význam pro klinickou praxi.....	48
6.1. Prevence	48
6.2. Terapeutické možnosti.....	48
6.3. Implantace u pacientů s parodontitidou.....	49
7. Souhrn	50
8. Literatura	51
Poděkování	56

1. Úvod

1.1. Teorie vzniku parodontitid

V průběhu dvacátého století se intenzivně pátralo po příčinách vzniku onemocnění parodontu.

V letech 1920 až 1940 převládal názor, že onemocnění parodontu je konstituční poruchou daného jedince spojenou s okluzním traumatem a že bakteriální infekce je v tomto procesu sekundární [1].

Před rokem 1960 stál v popředí zájmu zubní kámen. Předpokladem této hypotézy byl fakt, že depozita zubního kamene chronicky traumatizují tkáň [2].

Teprve v roce 1965 Løe a kol. představili nespecifickou plakovou teorii [3]. Uvedli, že plak je příčinou onemocnění parodontu. Jejich studie byla založena na tom, že všechen plak (supra- i subgingivální) má vždy stejné mikrobiální složení. Vznik a progresse onemocnění jsou tedy ovlivněny kvantitou plaku a nikoliv virulencí bakteriálních kmenů. Během klinických výzkumů se zjistilo, že pacienti s dobrou hygienou dutiny ústní a malým množstvím plaku nemají žádné nebo velmi mírné postižení parodontu. Avšak u některých jedinců se i přes dobrý stav hygieny dutiny ústní nacházela disproporce mezi tímto faktem a stavem parodontu. Proto i tato nespecifická teorie byla napadena a začalo se uvažovat nad virulencí a agresivitou konkrétních bakteriálních kmenů.

Díky zaměření se na kvalitativní složení plaku Loesche a kol. v roce 1976 uvedli specifickou plakovou teorii [4], která tvrdí, že pouze některý plak je patogenní, záleží na kvalitativním složení a nikoliv na kvantitě. Podstatná myšlenka byla, že za onemocnění je zodpovědná specifická bakterie přítomná v plaku, který je rozdílného složení než plak nacházející se u zdravého parodontu. Proto byl výzkum zaměřen na specifické parodontální patogeny (dále jen „periopatogeny“) a jejich produkty. Zároveň se uvažovalo o rozdílu v patogenitě plaku adheujícího a neadheujícího. Neadheující (tzv. free floating) plak měl být více patogenní. Díky této teorii byly zavedeny nové instrumentální a medikamentózní metody léčby parodontitid zaměřující se na potlačení infekce. Jenže následné studie dokázaly, že pouze přítomnost periopatogenů není jedinou příčinou vzniku parodontitidy a pravděpodobně záleží na náchylnosti hostitele [5].

Poslední teorie je založena na faktu, že destrukce závěsného aparátu je dána interakcí mezi hostitelskou imunitní odpovědí a specifickou bakteriální invazí. Má-li dojít k destrukci attachmentu, je tedy nutná přítomnost periopatogenů ve virulentní formě. Tyto periopatogeny fungují vždy v tzv. biofilmu. Některé kmeny jsou schopny průniku nejen do závěsného aparátu, ale také do okolních měkkých tkání. Je otázkou daného jedince a schopnosti jeho imunitní odpovědi danou infekci potlačit. Pokud je tato imunitní odpověď z jakéhokoliv důvodu oslabena, dochází ke kaskádě pochodů na buněčné i molekulární úrovni, která způsobí větší či menší destrukci parodontálních tkání. Roli zde hraje výsledný poměr mezi destruktivními a reparativními procesy.

1.2. Rozdělení parodontitid

Parodontitidy dělíme dle klinického a rentgenologického obrazu na dvě hlavní skupiny.

- I. Chronická - lokalizovaná
- generalizovaná
- II. Agresivní - lokalizovaná
- generalizovaná

Všechny se dále dělí dle míry postižení attachmentu na lehkou, mírnou a těžkou formu parodontitid. Další skupiny parodontálních onemocnění jsou parodontitidy při manifestaci celkových systémových onemocnění, nekrotizující, parodontální absces, parodontitidy spojené s endodontickými lézemi a jinak vzniklé deformity[6].

Plakem indukovaná zánětlivá reakce parodontu, která vede ke ztrátě zubu, je označovaná jako chronická parodontitida. Je jednou z nejčastějších příčin ztráty zubu na celém světě. Je všeobecným konsensem, že chronická parodontitida je iniciována a udržována bakteriálním biofilmem. Hostitelská imunitní odpověď je odpovědná za míru destrukce tkání parodontu [7].

Lokalizovaná forma agresivních parodontitid postihuje první moláry, řezáky a maximálně dva další zuby v jedné čelisti. Generalizovaná agresivní parodontitida postihuje nejméně tři další zuby spolu s prvními moláry a řezáky [8]. Agresivní parodontitis je stejně jako chronická forma iniciována kombinací invaze bakteriálního biofilmu a snížené imunitní odpovědi. Obě dvě formy - lokalizovaná

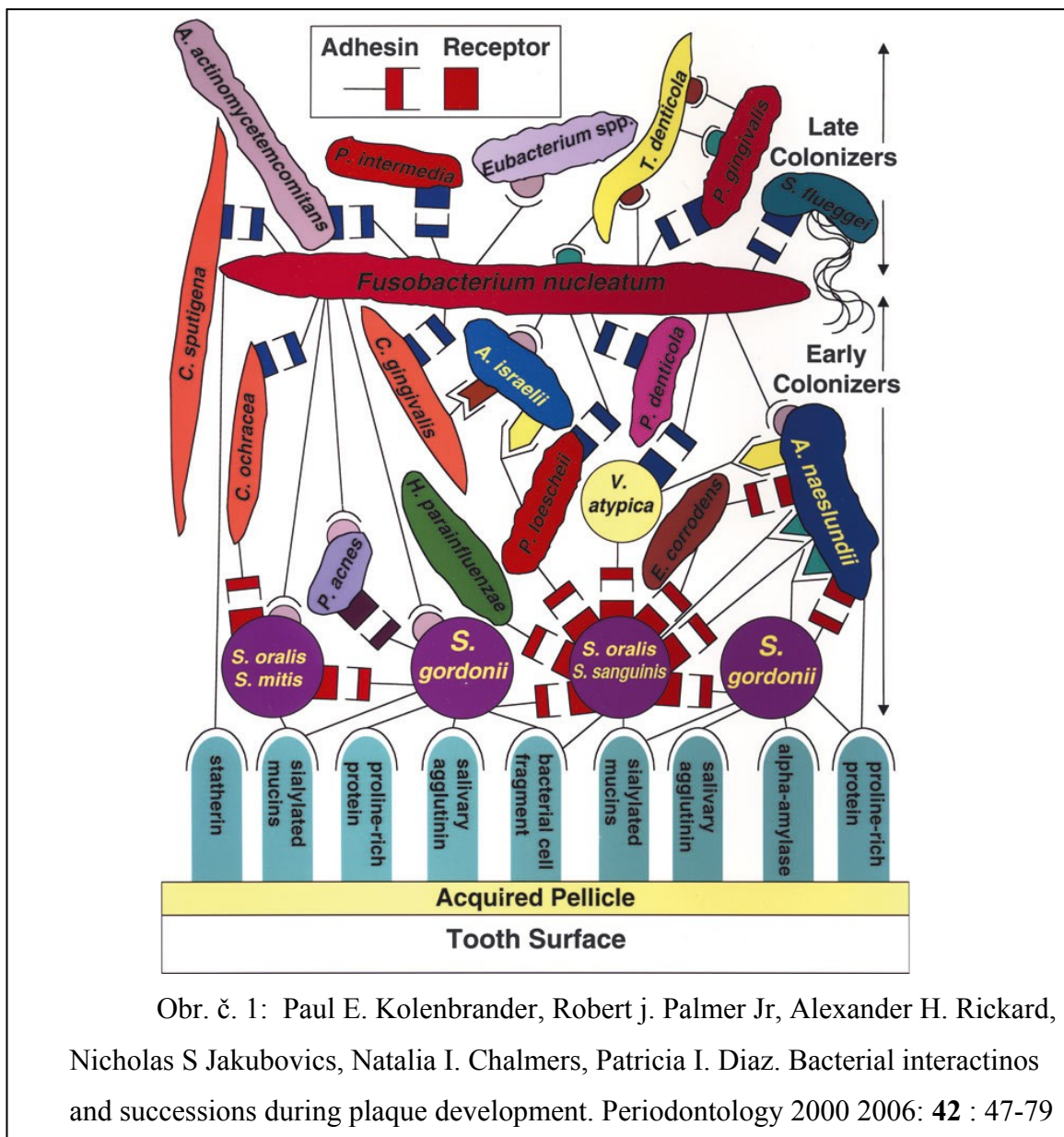
agresivní parodontitida i generalizovaná agresivní parodontitida jsou typické progresivním úbytkem závěsného aparátu a alveolární kosti.

1.3. Biofilm

Biofilm je složitá struktura, která je tvořena mikrokoloniemi bakteriálních buněk, které tvoří 15-20% jeho objemu. Tyto buňky jsou náhodně rozloženy ve zformované matrix nebo glykokalixu, tvoří 75-80 % objemu. Matrix je tvořená především vodou a vodnými roztoky, sušina je složena z exopolysacharidů, proteinů, solných derivátů a buněčného materiálu. Exopolysacharidy, které jsou produktem bakterií biofilmu, jsou největší částí sušiny, tvoří 50-95% hmotnosti [9]. Ve starších studiích tlustých biofilmů prováděných v čistírnách odpadních vod, byla zmiňována přítomnost dutin a vodních kanálů mezi mikrokoloniemi. Distribuce vody společně s živinami těmito kanály „hrála oběhový systém“ [10]. Tvar biofilmu je dán smykovými silami vznikajícími průchodem tekutiny biofilmem [11]. Jednotlivé mikrokolonie se mohou skládat z jednoho i více druhů bakterií. Nejdůležitějším prvkem v rozvoji biofilmu je schopnost adheze bakterií k pevnému povrchu. V dutině ústní se dokážou některé bakterie obsahující povrchové fimbrie (bílkovinám podobné „vlasy“ na povrchu bakterie), vázat na povrchy jako je epitel nebo pelikula na povrchu zubů [12].

Kolonizace bakteriemi se dělí na tzv. časné a pozdní „kolonizátory“. První fáze kolonizace pelikuly nevykazuje patogenitu a je typická pro zdravý parodont.

A. naeslundii jako jeden z hlavních časných kolonizátorů má na svém povrchu fimbrie obsahující adhesiny. Proto je *A. naeslundii* spolu s dalšími druhy *Actinomyces* jedním z nejdůležitějších prvků v osídlení a následné tvorbě jakéhosi „lešení“ biofilmu [13]. V pozdních fázích kolonizace dentálního biofilmu, kde již převažují gramnegativní bakterie, dominuje bakterie *F. nucleatum* [14]. Většina těchto pozdních „kolonizátorů“ nemá vazby s časnými „kolonizátory“, ale dokonce ani mezi sebou. Nicméně všechny tzn. pozdní i časné kolonizující periopatogeny se váží k *F. nucleatum*, jelikož obsahuje adhesin, který rozpoznává funkčně stejné receptory. Takže *F. nucleatum* funguje jako most mezi těmito dvěma skupinami (viz obr. č. 1).



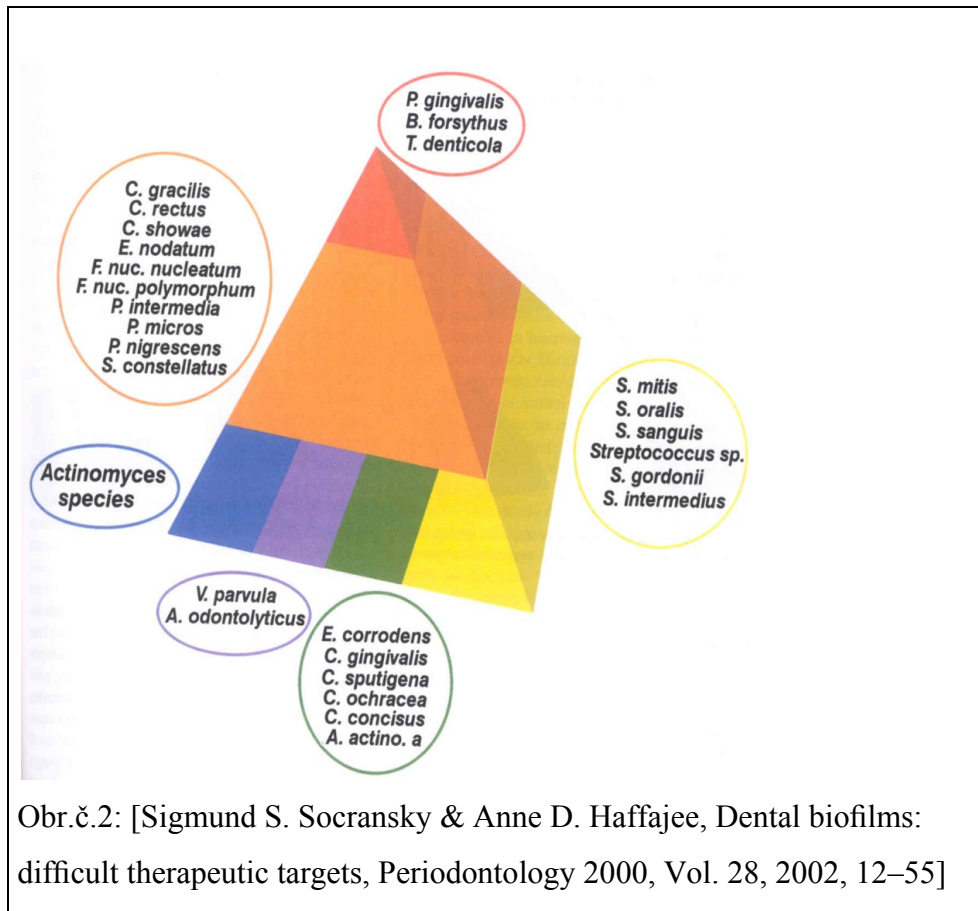
Obr. č. 1: Paul E. Kolenbrander, Robert J. Palmer Jr, Alexander H. Rickard, Nicholas S Jakubovics, Natalia I. Chalmers, Patricia I. Diaz. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology* 2000 2006: **42** : 47-79

Subgingivální biofilm vykazuje jistou variabilitu v kvalitativním složení. Rozdílná kompozice bakterií je v části biofilmu asociovaného s povrchem zubu a s epiteliálními buňkami. V biofilmu asociovaném s povrchem zubu je velmi podobné složení biofilmu supragingiválního, nacházejí se zde především *Actinomyces* a méně patogenní bakterie. V biofilmu asociovanému s epiteliálními buňkami se nacházejí ve větší míře bakterie z červeného a oranžového komplexu [15].

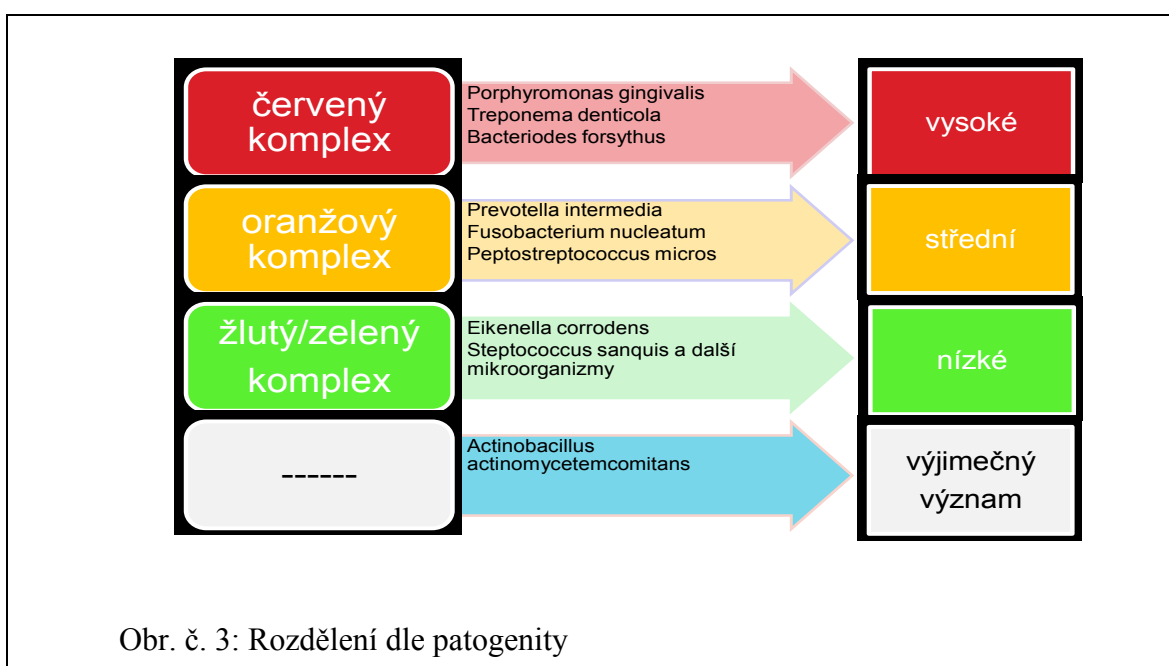
1.4. Rozdělení bakterií dle patogenicity

Socranský rozdělil skupiny periopatogenů biofilmu do komplexů dle patogenicity ve vztahu k parodontálním tkáním. Tyto komplexy uspořádal do tzv.

Socranského pyramidu. U báze pyramidu se nachází komplexy s nejnižší afinitou k destrukci parodontálních tkání (viz obr. č. 2).



Nejvíce diskutované komplexy periopatogenů s rizikem destrukce parodontálních tkání jsou vypsány v následujícím schématu (viz obr. č. 3).



1.5. Bakterie s vysokou patogenitou

Actinobacillus (Aggregatibacter) actinomycetemcomitans

A. actinomycetemcomitans je jedním z nejdiskutovanějších a nejzkoumanějších periopatogenů vůbec. Dle Socranského není tento periopatogen zařazen do žádného komplexu, má v jeho pyramidě zvláštní postavení.

Jde o terciární periopatogen, který je spojován s lokalizovanou agresivní parodontitis.

A. actinomycetemcomitans dokáže kolonizovat jako první výstelkový epitel dutiny ústní již u dětí bez dentice [16,17]. Rudney a spol. popsali, že *A. actinomycetemcomitans* dokonce kolonizuje bukalní epitel a dokáže se „schovat“ pro budoucí osídlení povrchu zubu [18,19]. Díky těmto faktům je polemizováno, zda nejde o přenos od matky již v raném věku dítěte [20].

A. actinomycetemcomitans produkuje tři hlavní autotransportní proteiny Aae, EmA a ApiA, které jsou známější pod názvem Omp 100, jde o proteiny vnější membrány, které tomuto periopatogenu zajišťují specifické funkce [21]. Aae je hlavním adhesinem, který je zapojený do vazby *A. actinomycetemcomitans* na hostitelský epitel. Avšak existuje několik otázek, jak k funkci některých sekvencí Aae, tak k receptorovým buňkám pro Aae v epitelu [22]. EmaA zlepšuje kolonizaci *A. actinomycetemcomitans* usnadněním vazby na kolagen [22]. ApiA inhibuje aktivaci komplementu na povrchu bakterií. Inaktivace ApiA vedla ke zvýšení citlivosti bakterií k usmrcení normálním lidským sérem a naopak exprese ApiA vedla k výrazné rezistenci k usmrcení lidským sérem [23]. Bylo také prokázáno, že při expresi ApiA od *A. actinomycetemcomitans* u *E. Coli* může mít tento protein vliv na mezibuněčnou adhezi [24].

Další mechanismus virulence *A. actinomycetemcomitans* napadením obranných mechanismů hostitele, a tím schopnosti průniku do měkkých tkání a povrchu kořene popsal Fine a spol. [22]. Zjistil, že se v odebraném vzorku objevuje mnoho subtypů *A. actinomycetemcomitans* a některé jsou více virulentní než jiné. *A. actinomycetemcomitans* serotyp B s delecí 530tého páru, kde je lokalizován promotor leukotoxinového genu, je jedinečně virulentní. Samotný leukotoxin LtxA ničí hostitelské leukocyty tak, že po přilnutí na jejich povrch aktivuje

apoptózu[25,26,27] nebo procesem odlišným od klasické apoptózy a to aktivací kaspázy 1 [28].

Možná díky těmto vlastnostem *A. actinomycetemcomitans* Socranský nezařadil do žádného komplexu. Vypadá to, že jeho hlavním úkolem je průnik do tkání a zde potlačování imunitní odpovědi.

Porphyromonas gingivalis

Červený komplex je na Socranského pyramidě na samotném vrcholu, patří do něj tři periopatogeny : *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*.

P. gingivalis je gram-negativní anaerob, který je asociovaný s těžkou chronickou parodontitis a způsobuje výraznou destrukci parodontálních tkání. Ovlivňuje i některá systémová onemocnění, především aterosklerózu [29].

Virulence *P. gingivalis* je spojena s produkcí proteáz, endotoxinů, kolagenáz a vytvářením povrchových struktur, jako jsou fimbrie a kapsulární polysacharidy [30]. Stejně jako *A.actinomycetemcomitans* je *P. gingivalis* schopna adheze k epitelu, pojivové tkáni a k buňkám endotelu. Diericksx a spol. zkoumali 6 serotypů *P. gingivalis* (opouzdřené a neopouzdřené) a zjistili, že opouzdřené serotypy mají signifikantně vyšší tendenci adheze k epitelu [31]. Průnik *P. gingivalis* do parodontálních tkání je umožněn díky expresi fimbrií a povrchovými adhesiny.

***Tannerella forsythia* (dříve *Bacteroides forsythus*)**

Jako všechny bakterie z „červeného komplexu“ je *T. forsythia* gram-negativní anaerob. Několik studií z populací na celém světě dokazuje asociaci *T. forsythia* s agresivní parodontitis a refrakterní parodontitis (chovající se jako agresivní) [32]. *T. forsythia* byla dokonce detekována i u počátečních parodontitid a to kultivací, imunofluorescencí i PCR [33,34,35]. Detekce *T. forsythia* je možná i „chair side“ biochemickým testem tzv. BANA(benzoyl-DL-arginin-2- naftylamid) test, při kterém *T. forsythia*, *P. gingivalis* a *T. denticola* mají stejnou vlastnost, hydrolyzují tuto látku [21]. Vzhledem k nálezům *T. forsythia* u zdravého parodontu bude rozhodujícím faktorem virulence, bio- nebo genotyp *T. forsythia* [32].

Treponema denticola

Je spojována s časně vzniklou parodontitis. Spolu s dalšími proteolytickými G- bakterii hraje významnou roli v progresi parodontopatií. Bylo prokázáno, že adhezuje k buňkám epitelu i pojivové tkáně a dokonce i ke komponentům extracelulární matrix v parodontálních tkáních. Produkuje látky jako jsou peptidázy, chymotrypsinu a trypsinu podobné proteinázy a adhesiny, které umožňují adhezi k již zmíněným tkáním, má hemolytické a hemaglutinační vlastnosti, všechny tyto faktory zvyšují virulenci tohoto periopatogenu [36].

2. Cíl práce

Cílem práce bylo analyzovat bakteriální kolonizaci parodontálních chobotů souboru pacientů s agresivní parodontitidou. U vybraných pacientů z tohoto vzorku byla zvolena kombinovaná mechano-antibiotická léčba a po třech měsících byla zhodnocena její úspěšnost. V další části práce nás zajímalo, zda se zásadně liší bakteriální osídlení oblasti sulku enoseálních implantátů a sulku vlastních zubů u dispenzarizovaných pacientů s již léčenou parodontitidou.

Konkretizované cíle práce:

- Mikrobiální analýza u pacientů s klinickými a rentgenologickými projevy agresivní parodontitidy
- Mikrobiální analýza agresivních parodontitid – terapeutická část
- Mikrobiální vyšetření sulku enoseálních implantátů a vlastních zubů u pacientů s léčenou parodontitidou

Z výsledků analýz byly stanoveny doporučení pro klinickou praxi v léčbě parodontitid a implantací u pacientů s parodontitidou.

3. Mikrobiální analýza u pacientů s klinickými a rentgenologickými projevy agresivní parodontitidy

3.1. Úvod

Vertikální resorpce alveolární kosti u agresivních parodontitid je multifaktoriálního podkladu. Tato resorpce však nevznikne bez bakteriální infekce. Dle dostupných studií víme, že každá z bakterií mikrobiálního biofilmu má určité vlastnosti, které ovlivňují destrukci attachmentu nebo imunitní odpověď v místě ataky. Za destrukci parodontálních tkání jsou odpovědné bakterie produkující peptidázy, proteázy a kolagenázy. Toto jsou především bakterie červeného komplexu. Další druhy jako je *A. actinomycetemcomitans* produkují toxiny, které tlumí imunitní odpověď. Samostatně tyto bakterie zřejmě nedokážou nijak zásadně ovlivnit míru resorpce alveolární kosti. Případně potlačit imunitní odpověď jedince na takovou míru, aby jeden druh bakterie způsobil výraznější destrukci attachmentu. Proto bylo cílem studie zjistit, zda v bakteriálním biofilmu existuje bakterie nebo skupiny bakterií, které by výrazněji ovlivňovaly míru resorpce alveolární kosti.

3.2. Metodika

3.2.1. Výběr pacientů

Agresivní parodontitis byla označována v dřívějších dobách též jako tzv. časně vzniklá (early onset parodontitis). Pro nynější stanovení diagnózy agresivní parodontitidy již není podstatný věk pacienta, ale klinický a rentgenologický obraz. Proto výběr pacientů nebyl omezen věkem, ale výhradně klinickým a RTG vyšetřením.

Do studie byli vybráni pacienti s diagnózou agresivní parodontitis, kteří byli dispenzarizováni na parodontologickém oddělení Kliniky zubního lékařství v Olomouci. Pro potvrzení diagnózy byl zhotoven digitální OPG jako standardizované rentgenologické vyšetření. OPG bylo zhotoveno před parodontologickou intervencí. Agresivní parodontitis má zcela jednoznačný RTG obraz s typickými vertikálními defekty alveolární kosti. U souboru pacientů s vybranými parodontálními defekty bylo nutné vyloučit jinou příčinu vzniku těchto

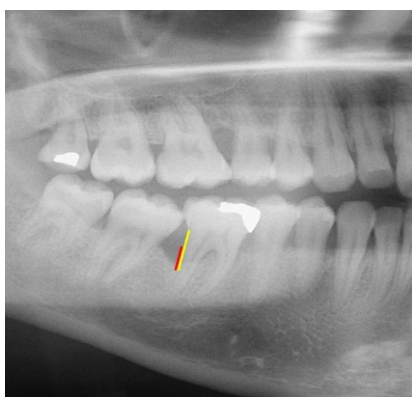
defektů. Při klinickém vyšetření bylo sledováno, zda v místě vzniku vertikálního defektu nedochází k chronické traumatizaci parodontu. Především zda u zubů s aproximálními výplněmi nebo u zubů opatřených fixní protetickou prací je kvalitní okrajový uzávěr. Dále zda nedochází k traumatické okluzi v rámci ortodontických vad nebo jako následek nedokonalého konzervačního nebo protetického ošetření. Rovněž byli vyloučeni pacienti, u kterých byl vznik vertikálního defektu vázán na ortodontickou léčbu pacientů s neléčenou parodontitidou.

Dle anamnestických údajů se v souboru nevyskytovali pacienti s celkovým systémovým onemocněním, které by mohlo ovlivnit prevalenci výskytu agresivní parodontitidy u daného jedince.

U všech pacientů odpovídala hloubka sondáže WHO sondou rentgenologickému obrazu. Parodontální choboty byly při vyšetření bez purulentní exsudace.

3.2.2. Měření resorpce alveolární kosti

Pro statistické hodnocení míry resorpce alveolární kosti jsme používali digitální orthopantomogram, který je standardizovaným radiografickým vyšetřením. Mírou resorpce byl stanoven vertikální rozměr daného defektu. Byly měřeny dvě hodnoty. Jednou byla hloubka samotného kostního defektu, který byl měřen od úrovně okolní výšky alveolární kosti po dno kostěného chobotu. U některých pacientů ve vzorku již byla jistá míra resorpce nebo atrofie alveolární kosti v celém rozsahu horní i dolní čelisti. Proto druhá měřená hodnota byla od cemento – sklovinné hranice po dno kostěného chobotu, tedy celková míra resorpce v dané lokalizaci (viz obr. č. 4).



Obr. č. 4

Vzhledem k tomu, že u některých pacientů s diagnostikovanou agresivní parodontitidou se vyskytovalo více vertikálních defektů, byly u jednotlivých pacientů do statistického hodnocení zpracovány vždy maximální (max.), minimální (min.) a průměrná (mid.) hodnota v obou měřených rozměrech. Ke statistické analýze byl použit software SPSS v.15 (SPSS Inc., Chicago, USA). K ověření normality dat byl použit test Shapiro-Wilk, testy byly dělány na hladině signifikance 0,05.

3.2.3. *Vyšetření bakteriálního složení*

U vybraných parodontálních chobotů bylo hodnoceno složení bakteriální mikroflóry (periopatogenů). Víme, že kolonizace parodontálních chobotů s projevy agresivní parodontitidy je u daného jedince v celém rozsahu dutiny ústní téměř identická [37].

Proto u jednoho pacienta byly odebrány vždy maximálně čtyři vzorky, ze kterých byla provedena smíšená analýza. Smíšenou analýzou bylo získáno spektrum periopatogenů osídlujících parodontální choboty.

Pacienti byli poučeni, aby před odběrem vzorku subgingiválního plaku prováděli hygienu dutiny ústní bez použití pasty a ústní vody. Odběr vzorku byl prováděn sterilními papírovými čepy. Nejdříve byl odstraněn případný supragingivální plak.

Osušením paramarginálního prostoru bylo provedeno vzduchovou pistolí. Sterilní papírový čep byl zaveden na cca 10 sekund do subgingiválního prostoru (viz obr. č. 5), následně usušen a vložen do transportní zkumavky.



Obr. č. 5

Stanovení periopatogenů bylo prováděno PCR metodou. Hodnoceny byly periopatogeny z červeného a oranžového komplexu dle Socranského. Z červeného komplexu *Porphyromonas gingivalis*(P.g.), *Tannerella forsythia*(T.f.), *Treponema denticola*(T.d.), z oranžového komplexu *Fusobacterium nucleatum*(F.n.), *Peptostreptococcus micros*(P.m.) a *Prevotella intermedia*(P.i.). Navíc byl hodnocen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(A.a.), kterému Socranský dal zvláštní význam a nezařadil ho do žádného komplexu.

Vzorky byly vyšetřeny ve dvou mikrobiologických laboratořích. Laboratoř v Českých Budějovicích (viz obr. č. 6) provedla 40 PCR vyšetření a laboratoř v Brně 21. Řádovou kvantifikaci vyšetřovaných periopatogenů v době vyšetření prováděla pouze laboratoř v Českých Budějovicích, negativní nález odpovídal počtu periopatogenů menšímu než 10^3 , slabě pozitivní nález 10^3 - 10^4 , středně pozitivní 10^4 – 10^5 , silně pozitivní počet větší než 10^5 . Od laboratoře z Brna byl pouze pozitivní nebo negativní nález.

Laboratorní zpráva

DNA průkaz parodontálních patogenů testem VariOr-Dento:

VariOr Dento

Místo odběru: Smíšená analýza

Výsledková tabulka:

Patogeny	Zkr.	Nález
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fn	+++
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Aa	+++
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Pg	--
<i>Tannerella forsythensis</i> (<i>Bacteroides forsythus</i>)	Tf	+
<i>Treponema denticola</i>	Td	+
<i>Peptostreptococcus micros</i>	Pm	+++
<i>Prevotella intermedia</i>	Pi	+
Celkové riziko resorpce závěsného aparátu		Vysoké

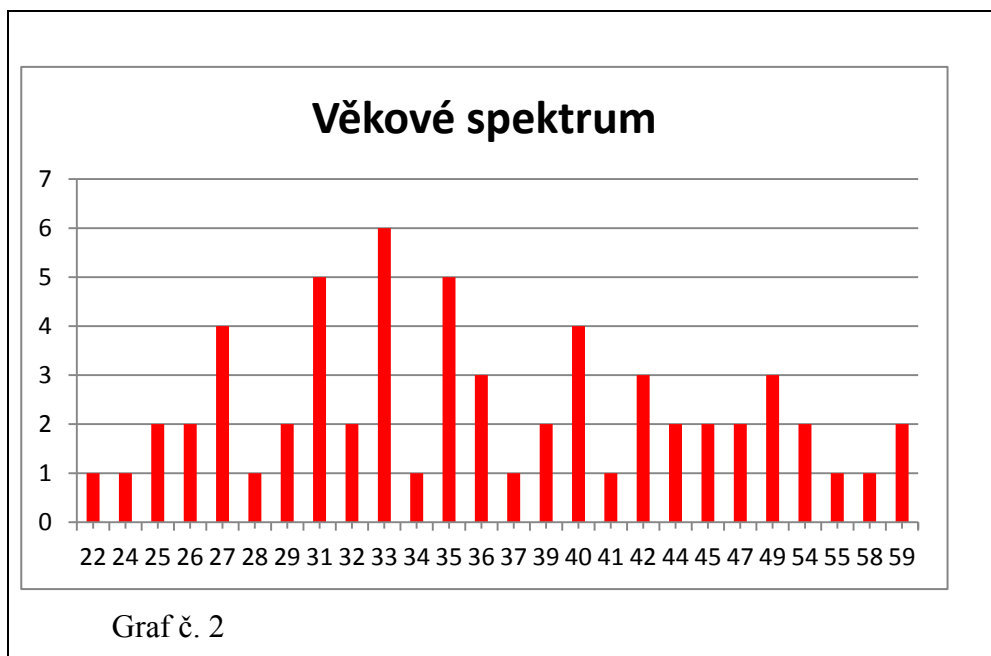
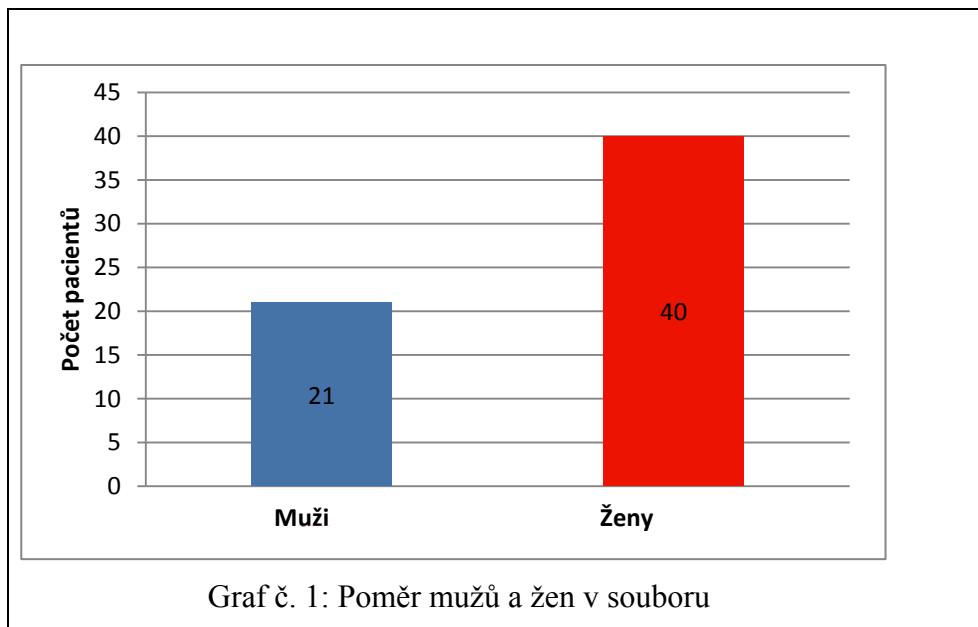
Legenda: (--) nedetekován, odpovídá počtu bakterií $<10^3$
 (+) slabě pozitivní, odpovídá počtu bakterií $10^3 - 10^4$
 (++) středně pozitivní, odpovídá počtu bakterií $10^4 - 10^5$
 (+++) silně pozitivní, odpovídá počtu bakterií $>10^5$

Obr. č. 6: Laboratorní zpráva České Budějovice

Výsledky ze dvou laboratoří ovlivnily i statistické vyhodnocení. Jedna část analýzy byla prováděna pro celý vzorek a to pouze jako pozitivní nález a druhá se zabývala i kvantitativním složením periopatogenů.

3.3. Výsledky

Ve vyšetřovaném souboru bylo celkem 61 pacientů s diagnózou agresivní parodontitis. Věk vybraných pacientů byl od 22 do 59 let s průměrným věkem 37 let. Věkové spektrum (viz graf č. 2). Poměr mužů a žen v tomto souboru byl 21/40 (viz graf č. 1).



U těchto pacientů bylo měřeno 237 vertikálních defektů. V rozměru hloubka kostního defektu byla maximální naměřená hodnota 8,40, minimální hodnota 1,00 a průměrná hodnota 2,78. U rozměru vzdálenost cemento-skloviná hranice dno

parodontálního chobotu byla maximální naměřená hodnota 12,20, minimální hodnota 2,30 a průměrná hodnota 6,09.

Při hodnocení pozitivních nálezů jednotlivých periopatogenů v celém souboru byl pozitivní nález *Fusobacterium nucleatum* u 38 vzorků (62,29%), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* u 12 vzorků (19,67%), *Porphyromonas gingivalis* u 49 vzorků (80,33%), *Tannerella forsythia* u 59 vzorků (96,72%), *Treponema denticola* u 53 vzorků (86,88%), *Peptostreptococcus micros* u 30 vzorků (49,18%), *Prevotella intermedia* u 37 vzorků (60,66%).

U souboru vyšetřovaného v Českých Budějovicích, kde byla provedena i kvantifikace periopatogenů, jsou výsledky výskytu periopatogenů dle četnosti uvedeny v tabulkách (tabulky č. 1-7).

Aa ^a					Fn ^a				
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0	34	85,0	85,0	85,0	Valid 0	2	5,0	5,0	5,0
1	4	10,0	10,0	95,0	1	19	47,5	47,5	52,5
2	1	2,5	2,5	97,5	2	12	30,0	30,0	82,5
3	1	2,5	2,5	100,0	3	7	17,5	17,5	100,0
Total	40	100,0	100,0		Total	40	100,0	100,0	

a. laboratoř = České Budějovice

Pi ^a					Tf ^a				
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0	15	37,5	37,5	37,5	Valid 0	1	2,5	2,5	2,5
1	19	47,5	47,5	85,0	1	9	22,5	22,5	25,0
2	3	7,5	7,5	92,5	2	9	22,5	22,5	47,5
3	3	7,5	7,5	100,0	3	21	52,5	52,5	100,0
Total	40	100,0	100,0		Total	40	100,0	100,0	

a. laboratoř = České Budějovice

Pg ^a					Pm ^a				
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0	9	22,5	22,5	22,5	Valid 0	10	25,0	25,0	25,0
1	3	7,5	7,5	30,0	1	18	45,0	45,0	70,0
2	5	12,5	12,5	42,5	2	8	20,0	20,0	90,0
3	23	57,5	57,5	100,0	3	4	10,0	10,0	100,0
Total	40	100,0	100,0		Total	40	100,0	100,0	

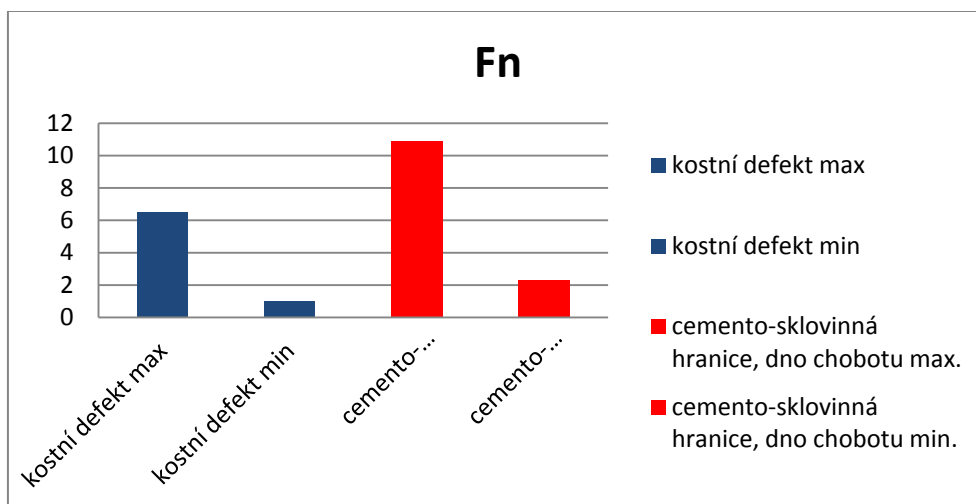
a. laboratoř = České Budějovice

Td ^a				
	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid 0	5	12,5	12,5	12,5
1	33	82,5	82,5	95,0
3	2	5,0	5,0	100,0
Total	40	100,0	100,0	

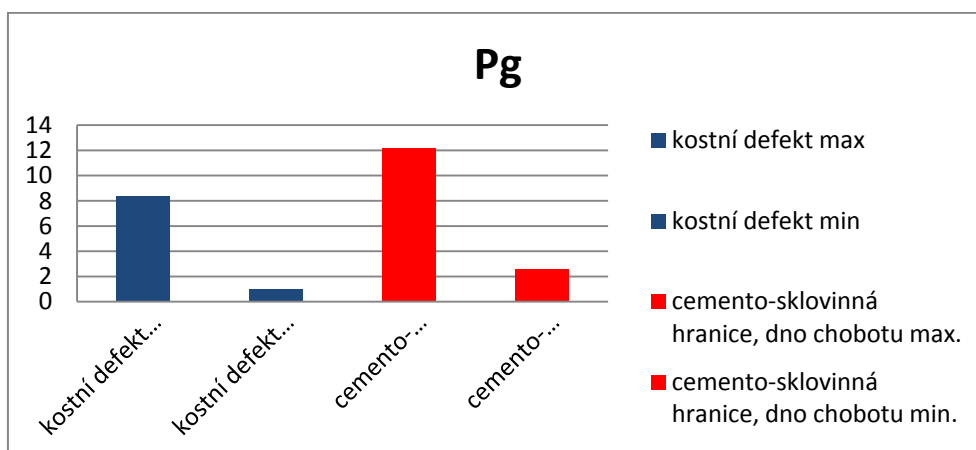
a. laboratoř = České Budějovice

Tabulky č. 1-7

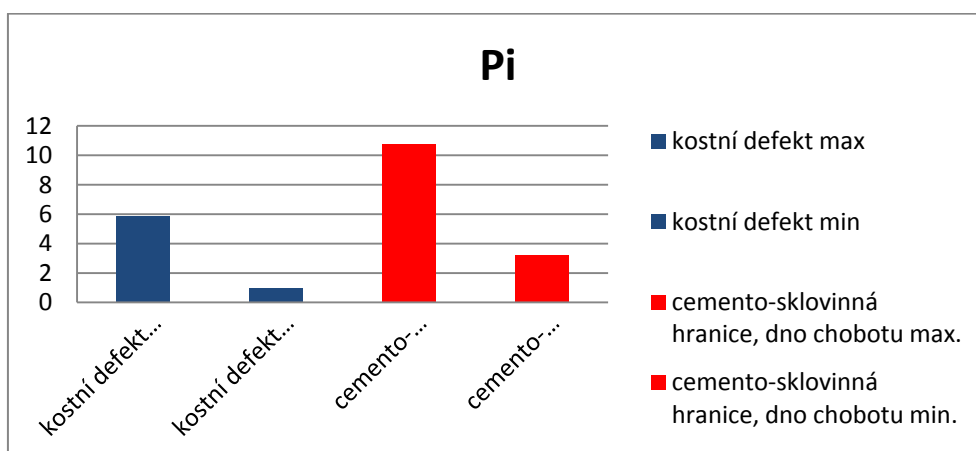
V případě, že byl zaznamenán pozitivní nález periopatogenu, byla hodnocena maximální a minimální naměřená hodnota hloubky kostního defektu a vzdálenosti cemento-sklovinná hranice dno chobotu. Dle tabulek lze zhodnotit, že tyto hodnoty se nijak zvlášť nelišily. Viz grafy č. 3-9.



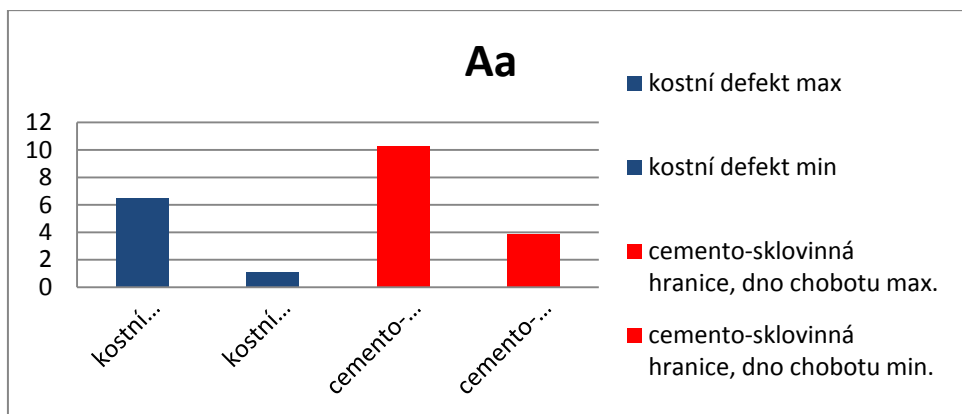
Graf č. 3



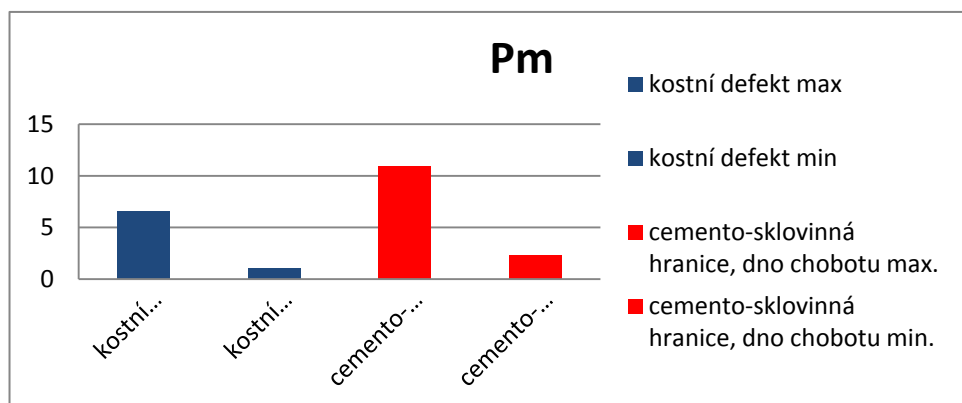
Graf č. 4



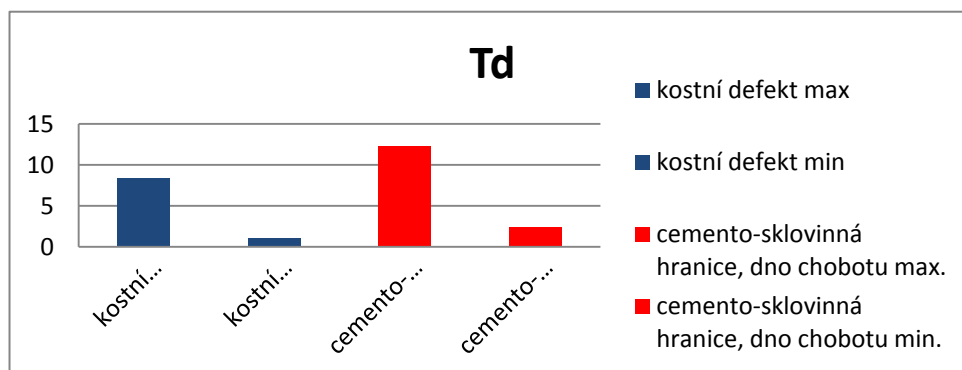
Graf č. 5



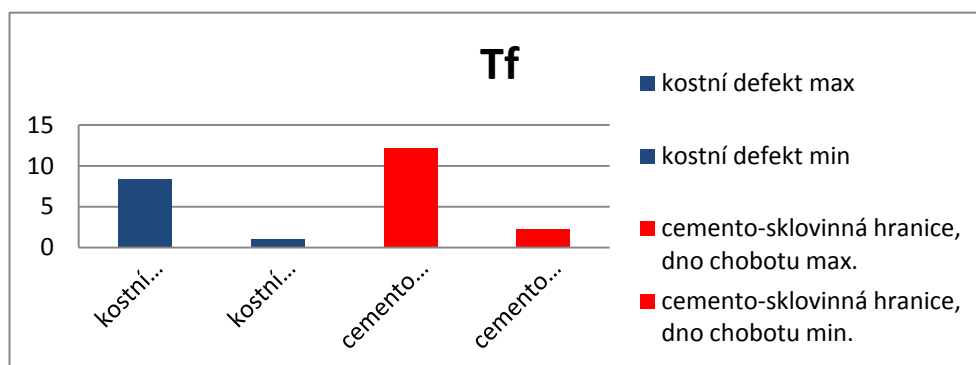
Graf č. 6



Graf č. 7



Graf č. 8



Graf č. 9

K posouzení závislosti mezi hloubkou kostního defektu a přítomností periopatogenu byl použit neparametrický Mann-Whitney U-test.

Test Mann-Whitney prokázal signifikantní závislost mezi mírou úbytku kosti a přítomností periopatogenu *T. denticola*.

V případě přítomnosti *T. denticola* byla prokázána:

- signifikantně menší hloubka kostního defektu min (medián hloubky 1,70 vs. 2,35 bez přítomnosti *T. denticola*), $p = 0,031$ (viz tabulka č. 9 a graf č. 10).
- signifikantně menší hloubka kostního defektu mid (medián hloubky 2,60 vs. 3,50 bez přítomnosti *T. denticola*), $p = 0,038$ (viz tabulka č. 9 a graf č. 11).

Mezi mírou úbytku kosti a přítomností ostatních periopatogenů nebyla signifikantní závislost prokázána.

Td		Hloubka kostního defektu, Max.	Hloubka kostního defektu, Min.	Hloubka kostního defektu, Mid.	Vzdálenost, Max.	Vzdálenost, Min.	Vzdálenost, Mid.
0	N	8	8	8	8	8	8
	Minimum	2,5	1,1	1,7	3,2	3,2	3,2
	Maximum	6,5	4,0	4,5	10,9	7,5	9,4
	Median	4,000	2,350	3,500	7,600	5,700	7,150
	Průměr	4,075	2,450	3,400	7,563	5,725	6,663
	Std. odchylka	1,3112	,8799	,9681	2,6907	1,6551	2,0605
1	N	53	53	53	53	53	53
	Minimum	1,2	1,0	1,2	3,2	2,3	3,2
	Maximum	8,4	4,9	5,6	12,2	9,7	10,9
	Median	3,600	1,700	2,600	7,300	4,600	5,800
	Průměr	3,594	1,909	2,687	7,247	4,834	6,004
	Std. odchylka	1,3609	,7333	,8823	1,9850	1,5114	1,5181

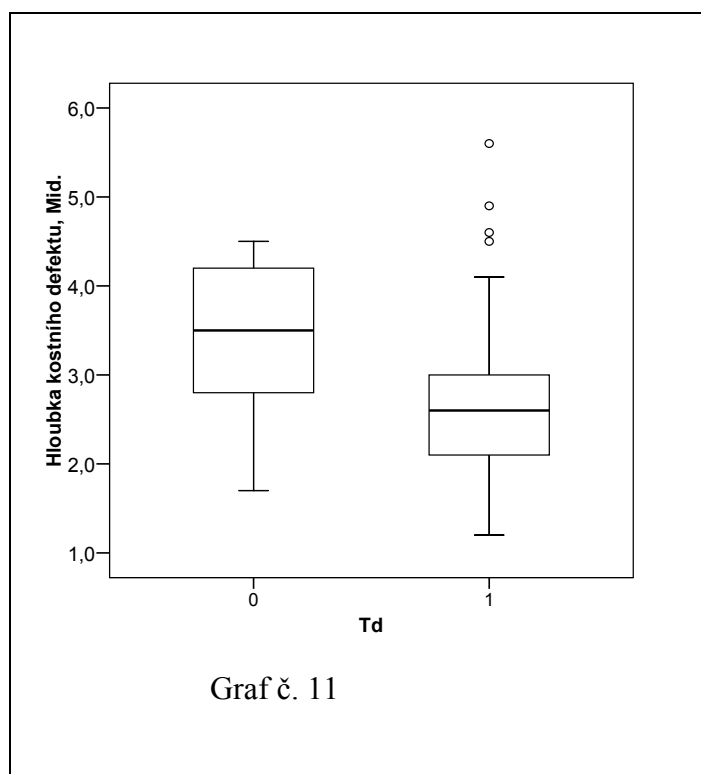
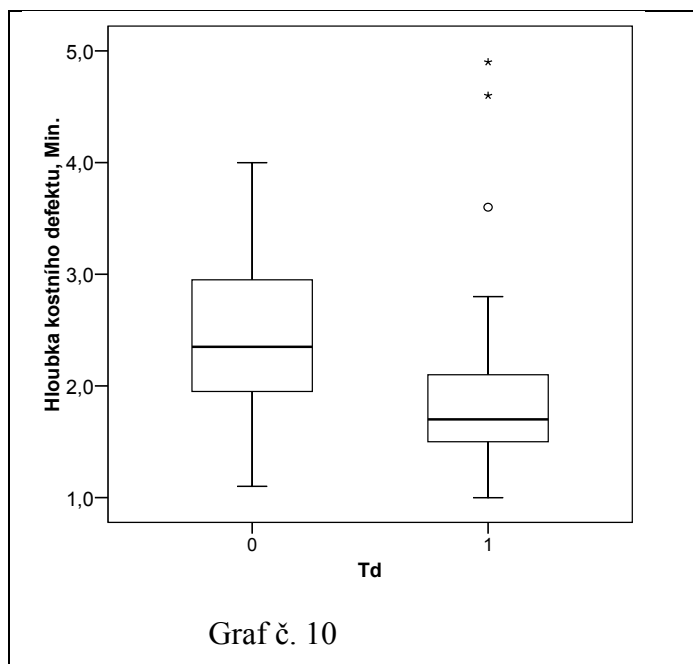
Tabulka č. 9: Výchozí tabulka pro Mann-Whitney U-test

Test Statistics^a

	Hloubka kostního defektu, Max.	Hloubka kostního defektu, Min.	Hloubka kostního defektu, Mid.	Vzdálenost, Max.	Vzdálenost, Min.	Vzdálenost, Mid.
Mann-Whitney U	168,500	111,000	115,000	191,500	139,500	157,500
Asymp. Sig. (2-tailed)	,352	,031	,038	,661	,121	,244

a. Grouping Variable: Td

Tabulka č. 10



V box grafu jsou znázorněny kvartily – silná čára uprostřed boxu odpovídá mediánu hodnot (tj. 2. kvartilu), dno boxu odpovídá 1. kvartilu a víko boxu 3. kvartilu. Anténka nahoře a dole zobrazuje maximální a minimální neodlehlu hodnotu, symbol kroužek prezentuje odlehle hodnoty a symbol hvězdička extrémní hodnoty.

Výsledky pouze laboratoř „České Budějovice“:

Ke statistickému hodnocení souboru pacientů z „Českých Budějovic“ byla použita k porovnání závislosti míry úbytku alveolární kosti na přítomnosti jednotlivých periopatogenů (vzhledem k malým počtům případů ve skupinách a použití ordinální škály pro zaznamenání přítomnosti periopatogenu) neparametrická Spearmanova korelační analýza (viz tabulka č. 11).

Neparametrická Spearmanova korelační analýza ^a								
		Fn	Aa	Pg	Tf	Td	Pm	Pi
Hloubka kostního defektu, Max.	Spearman's Correlation Coefficient	,270	-,061	,042	,046	-,155	,356*	-,296
	Sig. (2-tailed)	,091	,709	,795	,779	,341	,024	,064
	N	40	40	40	40	40	40	40
Hloubka kostního defektu, Min.	Spearman's Correlation Coefficient	,291	,081	,133	,094	-,602**	,148	-,082
	Sig. (2-tailed)	,068	,621	,415	,564	,000	,362	,616
	N	40	40	40	40	40	40	40
Hloubka kostního defektu, Mid.	Spearman's Correlation Coefficient	,369*	-,022	,088	,063	-,368*	,360*	-,217
	Sig. (2-tailed)	,019	,892	,587	,698	,019	,023	,178
	N	40	40	40	40	40	40	40
Vzdálenost, Max.	Spearman's Correlation Coefficient	,303	,063	,177	,097	-,067	,445**	-,229
	Sig. (2-tailed)	,058	,701	,274	,550	,680	,004	,156
	N	40	40	40	40	40	40	40
Vzdálenost, Min.	Spearman's Correlation Coefficient	,379*	,132	,153	-,038	-,175	,197	,021
	Sig. (2-tailed)	,016	,415	,345	,816	,281	,223	,899
	N	40	40	40	40	40	40	40
Vzdálenost, Mid.	Spearman's Correlation Coefficient	,393*	,114	,195	,054	-,139	,361*	-,123
	Sig. (2-tailed)	,012	,484	,227	,741	,391	,022	,449
	N	40	40	40	40	40	40	40

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).
 **. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).
 a. laboratoř = České Budějovice

Tabulka č. 11

První číslo v buňce udává hodnotu Spearmanova korelačního koeficientu, druhý údaj je hladina signifikance testu nenulovosti korelačního koeficientu. Spearmanův korelační koeficient nabývá hodnot od -1 do +1, hodnoty blízké nule znamenají žádná závislost. V případě signifikance < 0,05 byla prokázána závislost mezi mírou úbytku kosti a „mírou pozitivitu“ periopatogenu.

Vyhodnocení tabulky:

Spearmanova korelační analýza prokázala **slabou pozitivní korelaci** (tj. čím vyšší míra pozitivivity periopatogenu, tím větší hloubka kostního defektu nebo vzdálenost cemento-sklovinná hranice dno chobotu) mezi:

- „Hloubkou kostního defektu, max“ a mírou pozitivivity periopatogenu *P. micros* (r = 0,356)
- „Hloubkou kostního defektu, mid“ a mírou pozitivivity periopatogenu *P. micros* (r = 0,360)
- „Hloubkou kostního defektu, mid“ a mírou pozitivivity periopatogenu *F. nucleatum* (r = 0,369)
- „Vzdáleností, min“ a mírou pozitivivity periopatogenu *F. nucleatum* (r = 0,379)
- „Vzdáleností, mid“ a mírou pozitivivity periopatogenu *F. nucleatum* (r = 0,393)
- „Vzdáleností, mid“ a mírou pozitivivity periopatogenu *P. micros* (r = 0,361)

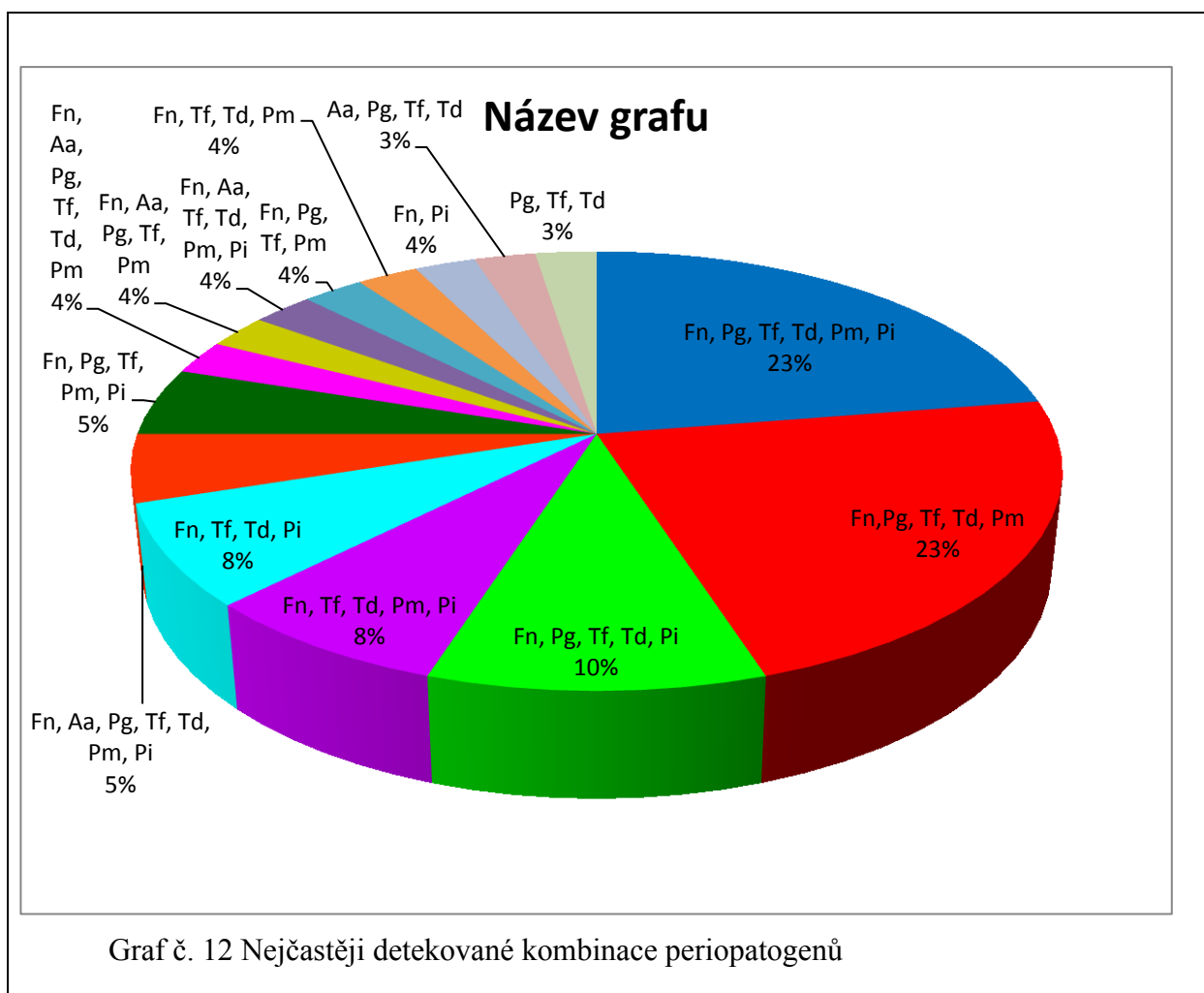
Spearmanova korelační analýza prokázala **střední pozitivní korelaci** mezi:

- „Vzdáleností, max“ a mírou pozitivivity periopatogenu *P. micros* (r = 0,445)

Spearmanova korelační analýza prokázala:

- **střední negativní korelaci** (tj. čím vyšší míra pozitivivity periopatogenu, tím menší hloubka kostního defektu) mezi „Hloubkou kostního defektu, min“ a mírou pozitivivity periopatogenu *T. denticola* (r = - 0,602)
- **slabou negativní korelaci** mezi „Hloubkou kostního defektu, mid“ a mírou pozitivivity periopatogenu *T. denticola* (r = - 0,368)

Hodnocení nejčastěji detekovaných kombinací periopatogenů:

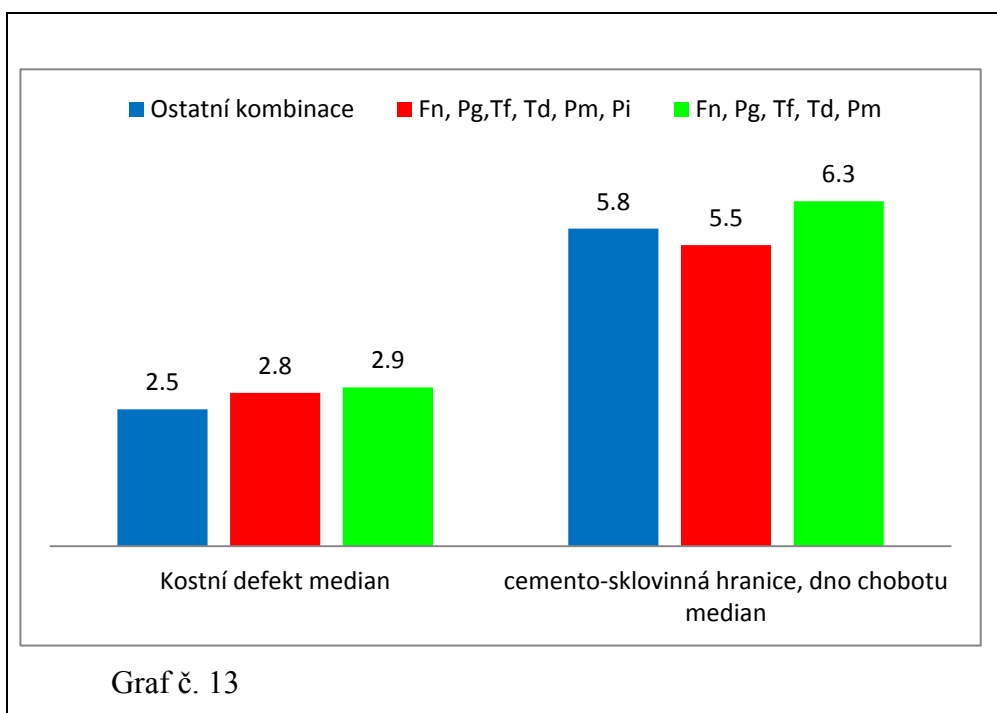


Z koláčového grafu je jasně patrné, které kombinace periopatogenů byly nejčastěji detekovány u jednotlivých vzorků. U 68% vzorků byl detekován červený komplex (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* byl detekován pouze u 15% vzorků. *Fusobacterium nucleatum* v 95% vzorků.

Při hodnocení míry resorpce byla statisticky hodnocena hloubka kostního defektu „mid“ a vzdálenost cemento-sklovinná hranice dno chobotu „mid“ u nejčastěji detekovaných kombinací vůči ostatním kombinacím.

Porovnání nejčastěji detekovaných kombinací k ostatním kombinacím pomocí Mann-Whitney a Kruskal-Wallis testu.

Mann-Whitney Test



Ranks				
	neg Aa nebo neg Aa a Pi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hloubka kostního defektu, Mid.	0	22	18,93	416,50
	1	18	22,42	403,50
	Total	40		
Vzdálenost, Mid.	0	22	19,68	433,00
	1	18	21,50	387,00
	Total	40		

Tabulka č. 12: Výchozí data pro Mann-Whitney test

Test Statistics ^b		
	Hloubka kostního defektu, Mid.	Vzdálenost, Mid.
Mann-Whitney U	163,500	180,000
Asymp. Sig. (2-tailed)	,348	,624

b. Grouping Variable: neg Aa nebo neg Aa a Pi

Tabulka č. 13

Vybrané skupiny se signifikantně neliší od zbytku souboru v hodnotách sledovaných parametrů „mid“ (Mann-Whitney test, $p = 0,348$, resp. $p = 0,624$)(viz graf č. 13 a tabulka č. 12 a 13).

Kruskal-Wallis test:

Ranks			
		N	Mean Rank
Hloubka kostního defektu, Mid.	ostatní kombinace	22	18,93
	"1011111"	9	21,89
	"1011110"	9	22,94
	Total	40	
Vzdálenost, Mid.	ostatní kombinace	22	19,68
	"1011111"	9	21,22
	"1011110"	9	21,78
	Total	40	

Tabulka č. 14

Test Statistics ^a		
	Hloubka kostního defektu, Mid.	Vzdálenost, Mid.
Chi-Square	,919	,250
df	2	2
Asymp. Sig.	,632	,882

a. Kruskal Wallis Test

Tabulka č. 15

Porovnávané skupiny se neliší signifikantně v hodnotách sledovaných parametrů „mid“ (Kruskal-Wallis, $p = 0,632$, resp. $p = 0,882$)(viz tabulka č 14 a 15).

3.4. Diskuse

Fusobacterium nucleatum, periopatogen, který byl zmiňován jako velmi podstatná součást maturace biofilmu, kde má svými vazebnými místy funkci „mostu“ mezi časnými a pozdními kolonizátory, se vyskytoval u 95% vzorků „České Budějovice“. Takto častý pozitivní nález byl pouze u tohoto periopatogenu ze všech sledovaných. Na rozdíl od Kamma JJ a spol. kteří pomocí sterilních papírových čepů identifikovali jako nejčastěji se vyskytující periopatogeny v subgingiválním plaku u agresivních generalizovaných forem parodontitid *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* a *Campylobacter* [38]. Proto by naše výsledky spíše odpovídaly lokalizované formě agresivních parodontitid, při kterých je bakteriální spektrum v subgingiválním plaku velmi podobné bakteriální mikroflóře u chronických parodontitid. Z tohoto biofilmu jsou nejčastěji izolovány druhy jako *Eubacterium*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *C. rectus* a *Veillonella* [39,40].

V souboru „České Budějovice“ byly ve 22,5% detekovány dvě kombinace periopatogenů. Složení periopatogenů bylo u těchto kombinací následující. V jedné se nacházely *F.nucleatum*, *P.gingivalis*, *T.forsythensis*, *T.denticola*, *P.micros*, *P.intermedia* , ve druhé *F.nucleatum*, *P.gingivalis*, *T.forsythensis*, *T.denticola*, *P.micros*. Obě kombinace obsahují červený komplex a tzv. „most“ *F. nucleatum*. Zajímavé je, že ani v jedné kombinaci není přítomen *A. actinomycetemcomitans*, který je považován za hlavní periopatogen oslabující hostitelskou imunitní odpověď. Nicméně ani jedna z těchto kombinací se významně neliší v míře resorpce alveolární kosti od ostatních nalezených kombinací.

Mikrobiální podklad refrakterní parodontitidy je velmi variabilní a není otázkou jednoho subjektu. Mikroflóra tohoto typu parodontitidy je až neobvykle rozdílná u jednotlivých pacientů. Mikroflóra může dokonce obsahovat i enterobakterie, stafylokoky a *Candidu* [41]. U jiných se ve větším množství vyskytují bakterie *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *S. intermedius*, *P. intermedia*, *P. micros* a *Eikenella corrodens* [42]. Nejčastější složení mikroflóry vyšetřovaného souboru se velmi podobá bakteriálnímu složení refrakterní parodontitidy dle literárních údajů.

A. actinomycetemcomitans v literatuře velmi diskutovaný ve spojitosti s agresivní parodontitidou se vyskytoval pouze u 12,5% vzorků. Je tedy otázkou, zda tento periopatogen zastává až tak významnou roli v potlačení imunitní odpovědi.

Některé signifikantní statistické výsledky však byly do jisté míry překvapivé. Při pozitivním nálezu periopatogenu *T. denticola* byla dle Mann-Whitneyho testu míra resorpce u měřené hodnoty hloubka kostního defektu „min“ ($p = 0,031$) a „mid“ ($p = 0,038$) menší. *T. denticola* je řazena mezi bakterie s vysokou agresivitou a měla by způsobovat větší destrukci alveolární kosti.

3.5. Závěr

Ve vyšetřovaném souboru pacientů s agresivní parodontitidou se nacházely tzv. mechano-rezistentní bakterie (*A. actinomycetemcomitans*) jen v minimálním zastoupení. Tzn. že kvalitní mechanická terapie má poměrně dobrou perspektivu v úspěšnosti léčby agresivních parodontitid. Nepodařilo se však prokázat nijak výraznou signifikantní závislost mezi mírou resorpce a přítomností určitého periopatogenu nebo skupiny periopatogenů. Míra resorpce tedy může být výrazně ovlivněna možnostmi individuální imunitní odpovědi.

4. Mikrobiální analýza agresivních parodontitid – terapeutická část

4.1. Úvod

U části pacientů z vyšetřovaného souboru z „Českých Budějovic“ byla komplexní parodontologická léčba provedena včetně celkové aplikace antibiotik. Tato část práce se věnuje úspěšnosti kombinované antibioticko-mechanické léčby u pacientů s výraznějšími klinickými projevy agresivní parodontitidy.

4.2. Používaná antibiotika v závislosti na periopatogenech a jejich patogenitě.

Bakterie	Patogenita	Účelná ATB terapie
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	+++	Kombinace Amoxicilin + Metronidazol (event. Ofloxacin, tetracykliny)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+++	Běžně citlivé na samotné:
<i>Prevotella intermedia</i>	++	- Amoxicilin
<i>Bacteroides forsythus</i>	++	- metronidazol
<i>Treponema denticola</i>	++	- clindamycin
<i>Peptostreptococcus micros</i>	+	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	
<i>Selemonas species</i>	+	
<i>Eikenella corrodens</i>	+	
<i>Campylobacter rectus</i>	++	
<i>Streptococcus intermedius</i>	+	

Obr. č. 7

4.3. Metodika

4.3.1. Výběr pacientů

Výběr pacientů, u kterých se aplikovala antibiotická léčba, byl prováděn dle klinického a rentgenologického obrazu. U klinického vyšetření jsme se především zabývali úrovní ústní hygieny ve vztahu k aktivitě onemocnění. Aplikace antibiotik

byla provedena u pacientů s projevy generalizované agresivní parodontitidy, s purulentní exsudací z parodontálních chobotů. Celkový vzorek obsahoval 23 pacientů.

4.3.2. *Hodnocené parametry*

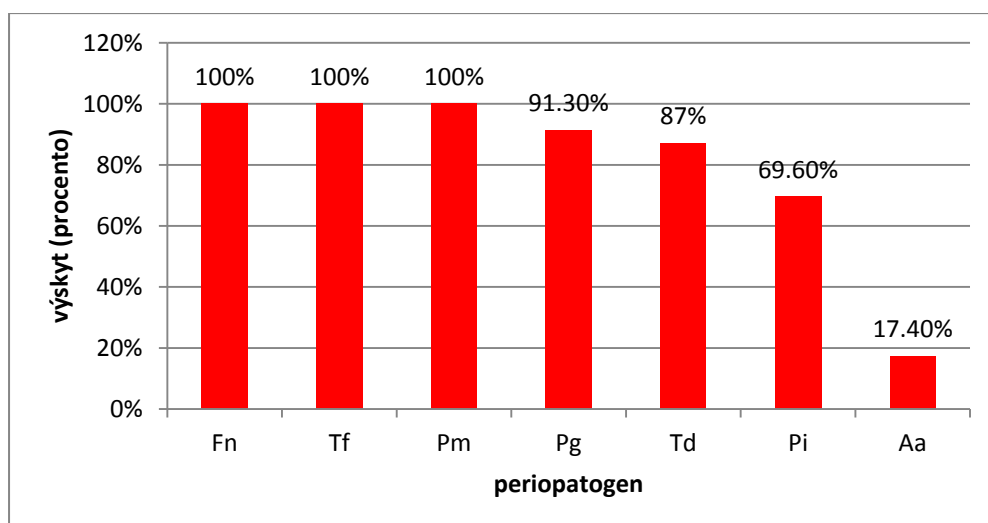
U pacientů bylo provedeno standardní parodontologické vyšetření po iniciální fázi léčby, kde se provedla hygienická instruktáž, motivace pacientů a byly odstraněny nejméně výraznější deposita kamene. Při vyšetření byly hodnoceny indexy CPI a PBI u každého zubu resp. papily. Stejně vyšetření bylo provedeno i 3 měsíce po aplikaci antibiotické léčby kombinované s mechanoterapií.

4.3.3. *Výběr antibiotik a mechanoterapie*

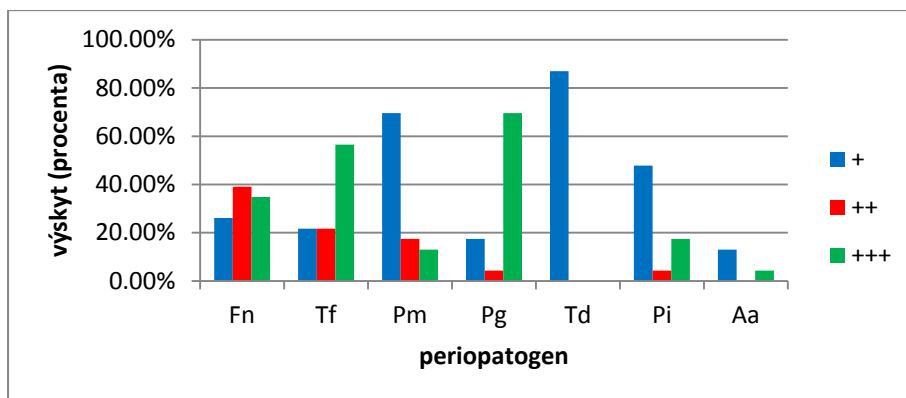
Dle mikrobiálního spektra a klinických projevů bylo zvoleno doporučené antibiotikum nebo jejich kombinace. Druhý a třetí den užívání antibiotik byl proveden důkladný deep scale postižených zubů. Byly aplikovány 4 druhy antibiotické léčby: Metronidazol, Clindamycin, Amoxicilin a kombinace tzv. „Winkelhoffův koktejl“ Amoxicilin + Metronidazol.

4.4. *Výsledky*

Hodnocený soubor se skládal z 23 pacientů, z toho 15 žen (65,2%) a 8 mužů (34,8%). Nejmladší pacient měl 15 a nejstarší 51 let. Věkový průměr byl 35,7 let. Ve vzorku bylo při přítomnosti periopatogenů následující procentuální zastoupení jednotlivých periopatogenů (viz graf č. 14).

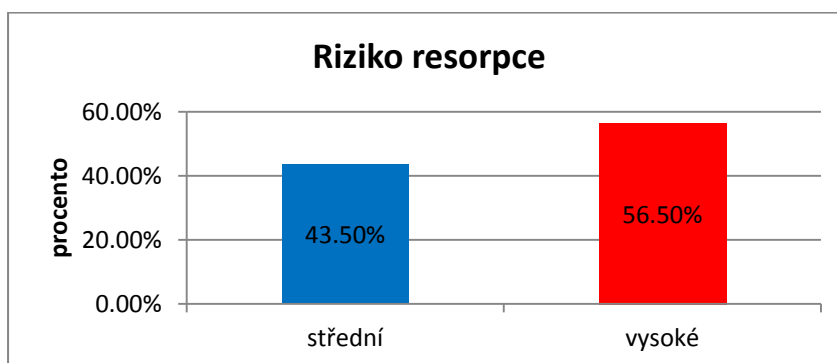


Graf č. 14: Procentuální zastoupení detekovaných periopatogenů v souboru.



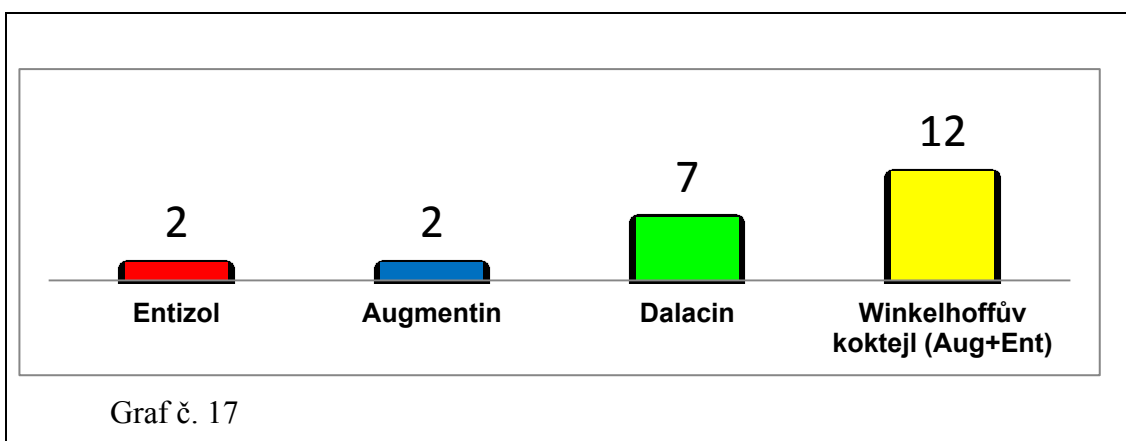
Graf č. 15: Detekované periopatogeny dle četnosti (+ = 10^3 - 10^4 , ++ = 10^4 - 10^5 , +++ = více než 10^5).

Mikrobiální analýza stanovila dle bakteriálního složení i míru rizika resorpce (viz graf č. 16)



Graf č.16

Dle výsledků mikrobiální analýzy byla aplikována tato antibiotika (viz graf č. 17).



Graf č. 17

Terapeutická dávka u jednotlivých pacientů byla podávána jeden týden. Dávkování bylo Entizol 250 mg 1-1-1-1, Augmentin 1g 1-0-1 nebo 625 mg 1-1-1, Dalacin 300mg 1-1-1, v případě Winkelhoffova koktejlu Augmentin 1g 1-0-1 a Entizol 250 mg 1-1-1-1.

Posouzení změny PBI ve vyšetřovaném vzorku před léčbou a 3 měsíce po léčbě pomocí neparametrického Wilcoxonova párového testu (viz tabulka č. 16,17 a graf č. 18).

Wilcoxon Signed Ranks Test

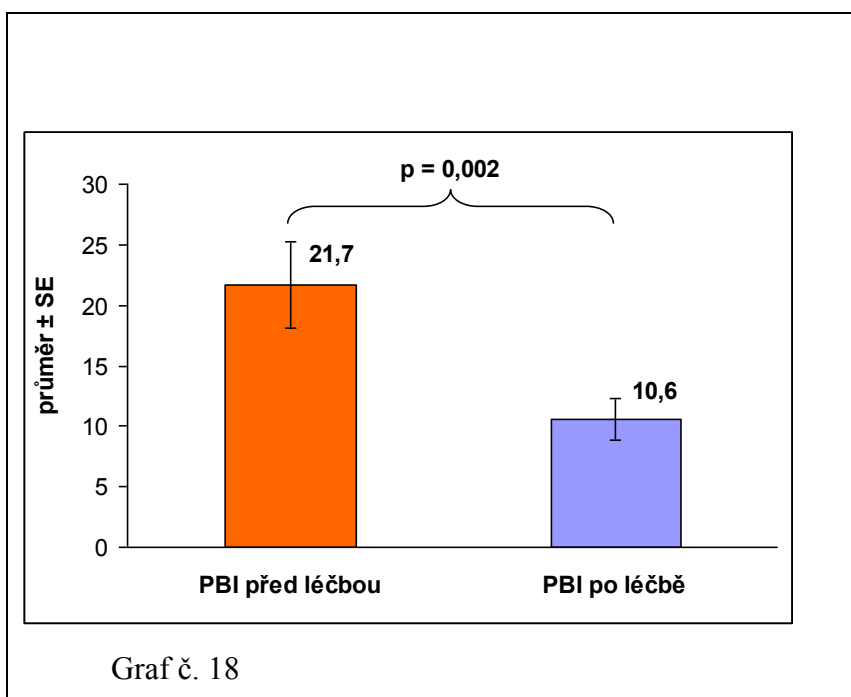
		Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
PBI (po - před)	Negative Ranks (snížení hodnoty)	14	11,07	155,00
	Positive Ranks (zvýšení hodnoty)	4	4,00	16,00
	Ties (žádná změna)	3		
	Total	21		

Tabulka č.16

Test Statistics ^b	
	PBI (po - před)
Z	-3,028 ^a
Signifikance	,002

a. Based on positive ranks.
b. Wilcoxon Signed Ranks Test

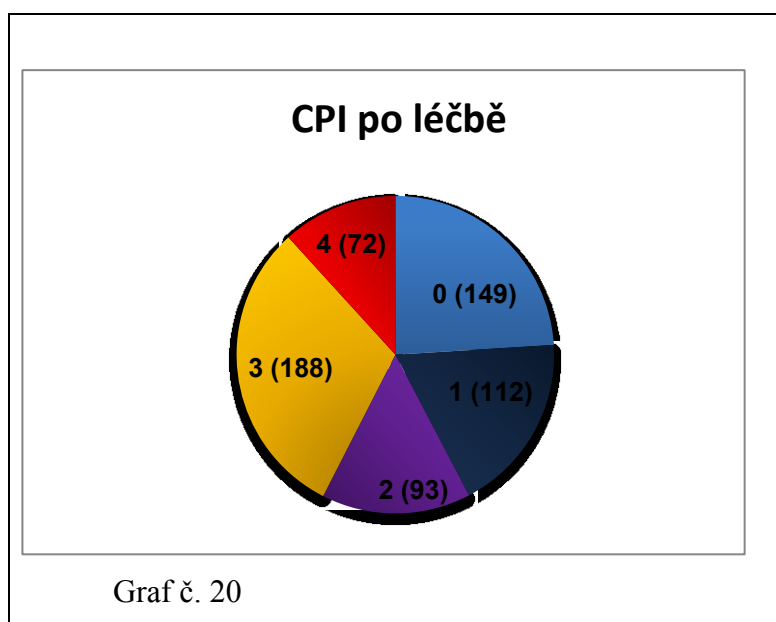
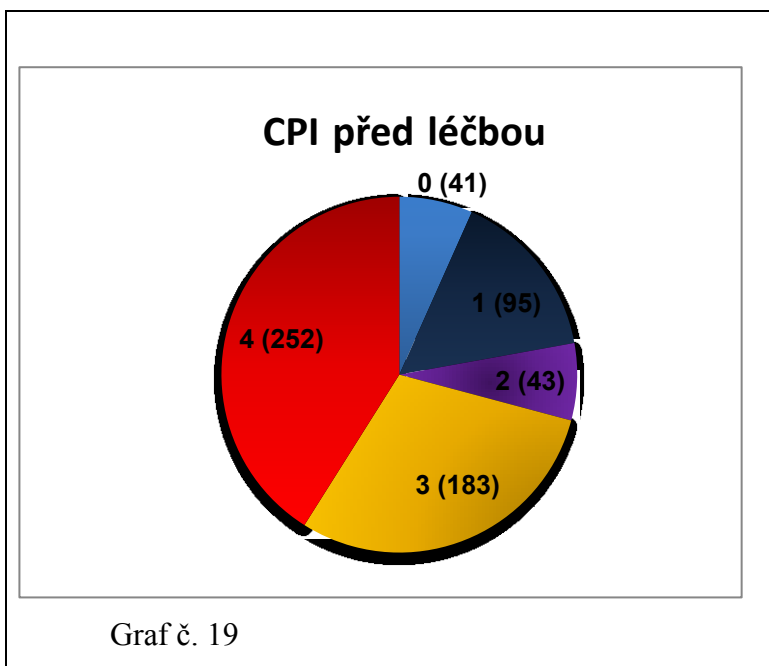
Tabulka č. 17



Neparametrický Wilcoxonův párový test prokázal statisticky významné snížení hodnot PBI po léčbě ($p = 0,002$).

Po léčbě došlo ke snížení hodnoty PBI u 14 pacientů, u 4 pacientů se hodnota PBI zvýšila a u 3 pacientů nedošlo k žádné změně.

Hodnoty CPI v souboru pacientů před léčbou a 3 měsíce po léčbě. V grafech č. 19 a 20 je zcela zřejmý posun z hodnot CPI 4 a 3 do hodnot 0,1,2 - výrazná redukce hloubky parodontálních chobotů.



4.5. Diskuse

Po kombinované léčbě se v našem souboru u 180 vyšetřovaných zubů snížila hloubka sondáže z CPI 4 (>5,5 mm) do CPI 3 (5,5 mm – 3,5 mm) a menší. Nárůst v oblasti sondáže menší než 3,5 mm byl o 175 vyšetřovaných zubů. Tyto výsledky jsou obdobné se studií Sigusche a kol., kteří prokázali výrazné zmenšení hloubky sondáže u pacientů s agresivní parodontitidou po provedeném SRP (scaling and root planning) a podané antibiotické léčbě oproti kontrolní skupině, kde byl proveden pouze SRP. U hloubky sondáže menší než 6 mm před léčbou a celkové léčby Clindamycinem bylo zmenšení hloubky sondáže o 1,9 mm větší než u kontrolního vzorku a při použití Metronidazolu o 2,3 mm. U chobotů s hloubkou sondáže větší než 6 mm před léčbou byl tento rozdíl u Clindamycinu 3,3 mm a u Metronidazolu 3,2 mm [45].

4.6. Závěr

V odborné literatuře nalezneme dvě systematické review, které jednoznačně potvrzují benefit antibiotické systémové terapie doplňujících mechanoterapii u pacientů s parodontitidou [43,44]. Pozitivní vliv aplikace antibiotik při léčbě parodontitidy byl potvrzen i v naší studii. Z tohoto pohledu je přínos antibiotik v léčbě parodontitid jednoznačný. Při uvažování o antibiotické léčbě však musíme být velmi obezřetní a volit tuto léčbu jen ve správně zvolených případech. Bakterií rezistentních na antibiotickou léčbu stále narůstá a také v oboru parodontologie je třeba brát tento závažný fakt v úvahu.

5. Mikrobiální vyšetření sulku implantátů a vlastních zubů u pacientů s léčenou parodontitidou

5.1. Úvod

Parodontitida je onemocnění, které je nejčastější příčinou ztráty zubů celosvětově [46]. U pacientů s parodontitidou tedy velmi často uvažujeme o náhradě ztráty zubu nebo zubů pomocí dentálních implantátů. Při úvaze náhrady zubů dentálními implantáty se neřídíme pouze nabídkou kostí pro implantaci, ale velmi důležitým aspektem je celkový habitus dutiny ústní. Není tedy vhodné zavádět dentální implantáty u pacientů s neléčenou parodontitidou. V bakteriální mikroflóře u nelečených parodontitid se vyskytují bakterie, které jsou poměrně často detekovány u periimplantitid. Víme, že obranné mechanismy na zevní podněty v okolí dentálních implantátů jsou daleko menší než v parodontu vlastních zubů. I nižší hostitelská odpověď na bakteriální invazi v okolí implantátu je důvodem, proč periimplantitidy probíhají s rentgenologickým i klinickým obrazem agresivních parodontitid.

5.2. Morfologie gingiválního sulku, spojovacího epitelu a sulku implantátu

Spojení měkkých tkání s povrchem zubu a enoseálních implantátů vykazuje jisté rozdíly. Tkáň nacházející se v okolí implantátu nelze nazývat parodontem. Do tkání souvisejících s enoseálními implantáty řadíme alveolární kost a keratinizovanou sliznici. Při zavedení enoseálního implantátu probíhá hojení (osseointegrace) vznikem ankylózy, tedy pevným spojením povrchem enoseálního implantátu s alveolární kostí. Toto spojení postrádá vmezeřené buňky, takže zde nejsou přítomná infraalveolární parodontální vlákna a především cévní parodontální plexus jako u vlastního zubu. Spojení sliznice s enoseálními implantáty se zdá být na první pohled téměř identické, nachází se zde epitel orální, sulkulární i spojovací. Rozdíl je především v uspořádání spojovacího epitelu, který má u enoseálních implantátů charakter spíše dlouhého spojovacího epitelu. Tento rozdíl je dán způsobem vzniku spojení a jistě i absencí cementu na povrchu implantátu. Zatímco dentogingivální uzávěr vlastních zubů vzniká jako tzv. sekundární spojení měkkých a tvrdých zubních tkání při erupci zubů, u dentálních enoseálních implantátů se spojení měkkých tkání a povrchem implantátu vytváří během hojení rány po zavedení

enoseálního implantátu (jednofázové procedury) nebo po umístění vhojovacího válečku (dvoufázové procedury). Toto spojení funguje jako základní bariéra proti noxám ohrožujícím klidný průběh osseointegrace. Odlišné uspořádání lze rovněž pozorovat také u supraalveolárních vláken, u enoseálních implantátů se nenacházejí vlákna podobná dentoperiostálním a dentogingiválním (viz obr. č. 8,9).

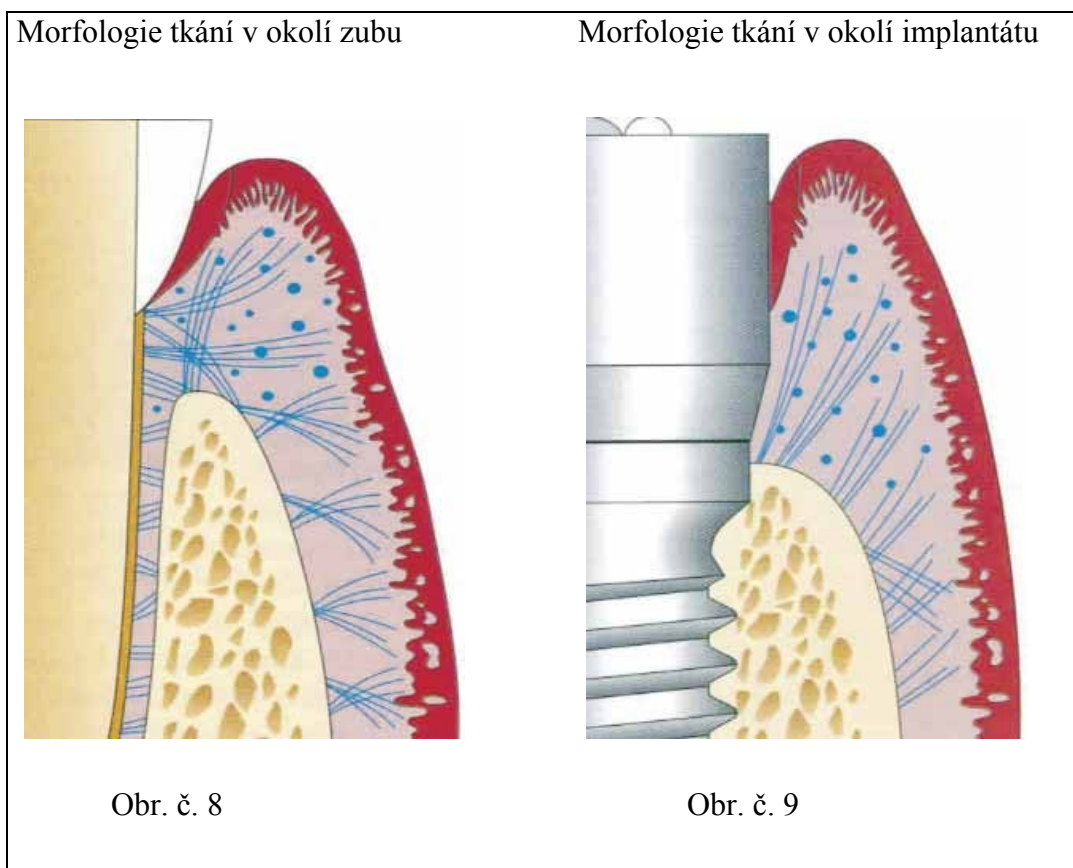


Schéma anatomických struktur kolem implantátu a zubu. [Martin Starosta, Význam připojené gingivy v okolí zubního implantátu, Stomatologický časopis 2008/9]

Pouze absence těchto typů vláken nemůže ovlivnit stabilitu měkkých tkání v okolí enoseálních implantátů, jelikož u vlastních zubů je stabilizačním prvkem celý komplex supraalveolárních vláken, které se navzájem proplétají.

Celkově lze měkké tkáně v okolí transmukózní části implantátu charakterizovat jako méně vaskularizované a celulárně méně bohaté oproti tkáním v okolí zubního krčku. Při porovnání výše uvedených anatomických charakteristik

v okolí zubu a zubního implantátu je jasné, že tkáň v transmukózní oblasti implantátu je více náchylná k mechanickému a bakteriálnímu traumatu [47].

5.3. Metodika

5.3.1. Výběr pacientů

Na našem parodontologickém oddělení kliniky zubního lékařství v Olomouci jsou dispenzarizováni pacienti s léčenou parodontitidou, u kterých byla zvolena náhrada zubů dentálními enoseálními implantáty firmy Impladent (viz obr. č. 10).

Bylo vybráno a vyšetřeno celkem 23 pacientů, u kterých byla primárně diagnostikována parodontitis. V souboru je smíšená skupina pacientů s agresivní i chronickou formou parodontitidy. U vyšetřovaných pacientů byla nejdříve léčena parodontitida pomocí konzervativně-chirurgických postupů.

Po stabilizaci parodontu byly zavedeny enoseální implantáty, jako náhrada jednoho či více zubů. Implantace byly prováděny dle běžného implantologického protokolu. U některých pacientů i s použitím standardních augmentačních technik.

Výběr do souboru byl omezen na pacienty s dobou minimálně 12 měsíců od zavedení enoseálního implantátu po samotnou realizaci měření.



Obr. č. 10

5.3.2. *Klinické vyšetření*

U vybraných pacientů byla prováděna vyšetření parodontální sondou s milimetrovou kalibrací. Byl hodnocen sulkus enoseální implantátu a gingivální sulkus vlastního zubu stejné lokalizace antagonistní čelisti. V případě, že nebyl přítomen antagonistní vlastní zub, byl hodnocen nejbližší možný. U jednotlivých sulků byla hodnocena hloubka sondáže v milimetrech a krvácení na podráždění. Krvácení na podráždění bylo hodnoceno jako pozitivní nebo negativní nález. Anamnesticky byli vyloučeni pacienti se systémovými onemocněními a celkovou medikací, což by mohlo ovlivnit klinický obraz onemocnění parodontu.

5.3.3. *Mikrobiologické vyšetření*

Mikrobiální analýza tohoto souboru byla prováděna standardní PCR metodou vyšetření periopatogenů v laboratoři Brno. U vyšetřovaných sulků vlastních zubů a dentálních implantátů byla prováděna individuální PCR analýza. Do každého vyšetřovaného sulků byl zaveden sterilní papírový čep a po následném osušení vložen do individuální transportní zkumavky.

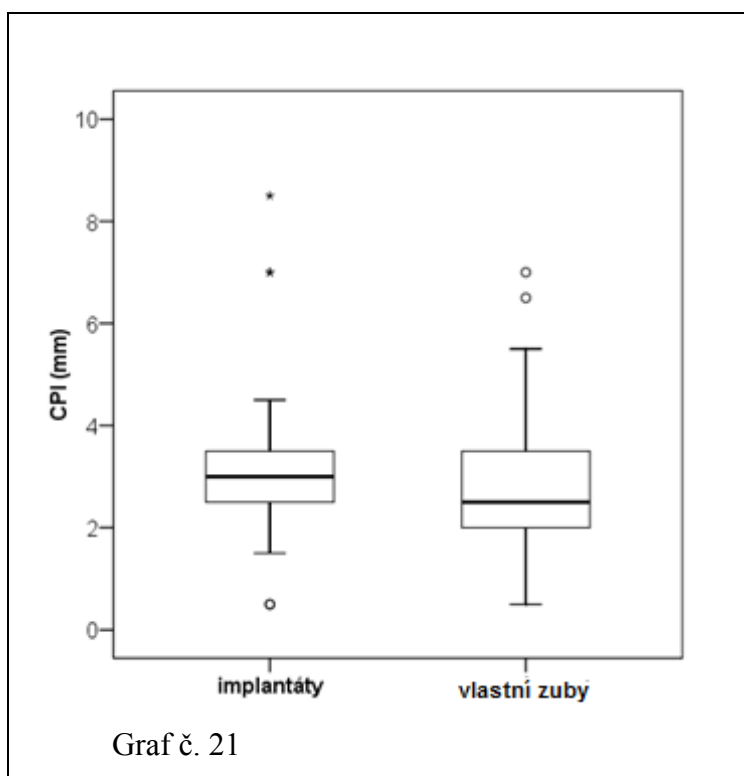
PCR analýzou byly vyhodnocovány periopatogeny *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. PCR vyšetření stanovilo jak kvalitativní složení periopatogenů, tak i řádovou kvantifikaci, negativní nález odpovídal počtu periopatogenů menšímu než 10^3 (ve statistickém vyhodnocení 0), slabě pozitivní nález 10^3 - 10^4 (ve statistickém vyhodnocení 1), středně pozitivní 10^4 – 10^5 (ve statistickém vyhodnocení 2), silně pozitivní počet větší než 10^5 (ve statistickém vyhodnocení 3).

5.4. *Výsledky*

Celkový počet pacientů v souboru byl 23, z toho 16 žen (69,6%), 7 mužů (30,4%). U deseti pacientů byly zavedeny dva hodnocené enoseální implantáty. Celkový počet hodnocených enoseálních implantátů byl 33. Průměrný věk pacientů 52 let (min-max: 31 let – 67 let), směrodatná odchylka věku 9,6 let, medián věku 55 let. Medián doby od zavedení enoseálního implantátu do realizace měření byl 39 měsíců (12 měsíců až 154 měsíců).

Medián hloubky sulku u enoseálního implantátu byl 3,0 mm (min-max: 0,5 – 8,5 mm). Medián hloubky sulku u vlastního zubu byl 2,5 mm (min-max: 0,5 – 7,0 mm). Wilcoxonův párový test neprokázal statisticky významný rozdíl v hloubce sulku mezi enoseálním implantátem a vlastním zubem (viz graf č. 21). Přesně vypočítaná hladina signifikance testu $p = 0,416 (> 0,05)$.

Kvartilový box graf



Box graf popisuje distribuci hodnot CPI pomocí kvartilů. Silná čára uvnitř boxu reprezentuje medián hodnot (tj. 2. kvartil), dno boxu reprezentuje 1. kvartil a víko boxu 3. kvartil. Výška boxu odpovídá mezikvartilovému rozpětí (tj. charakteristice variability dat – v intervalu mezi 1. a 3. kvartilem leží 50% naměřených hodnot). Anténka dole a nahoře odpovídají minimální a maximální neodlehlejší hodnotě. Odlehlejší hodnoty jsou označeny symbolem kroužek a extrémní hodnoty symbolem hvězdička.

U enoseálních implantátů se vyskytlo krvácení na podráždění v 17 případech (51,5%), u vlastních zubů v 21 případech (63,6%).

Rozdíl ve výskytu krvácení není statisticky významný, přesně vypočítaná hladina signifikance Fisherova přesného testu $p = 0,455 (> 0,05)$.

Při porovnání výskytu periopatogenů v sulku u enoseálních implantátů a vlastních zubů Fisherův přesný test neprokázal signifikantní rozdíl ve výskytu bakterií u implantátů a vlastních zubů.

Porovnání výskytu jednotlivých bakterií u enoseálních implantátů a vlastních zubů (viz tabulka č. 18).

	% výskytu implantáty	% výskytu vlastní zuby	p
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	57,6%	54,5%	1,000
<i>Tannerrela forsythensis</i>	30,3%	15,2%	0,240
<i>Treponema denticola</i>	36,4%	21,2%	0,270
<i>Prevotella intermedia</i>	9,1%	3,0%	0,613
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	3,0%	9,1%	0,613

p ... hladina signifikance Fisherova přesného testu

Tabulka č. 18

Posouzení závislosti mezi výskytem krvácení na podráždění a výskytem bakterií (0-3) u enoseálních implantátů a vlastních zubů.

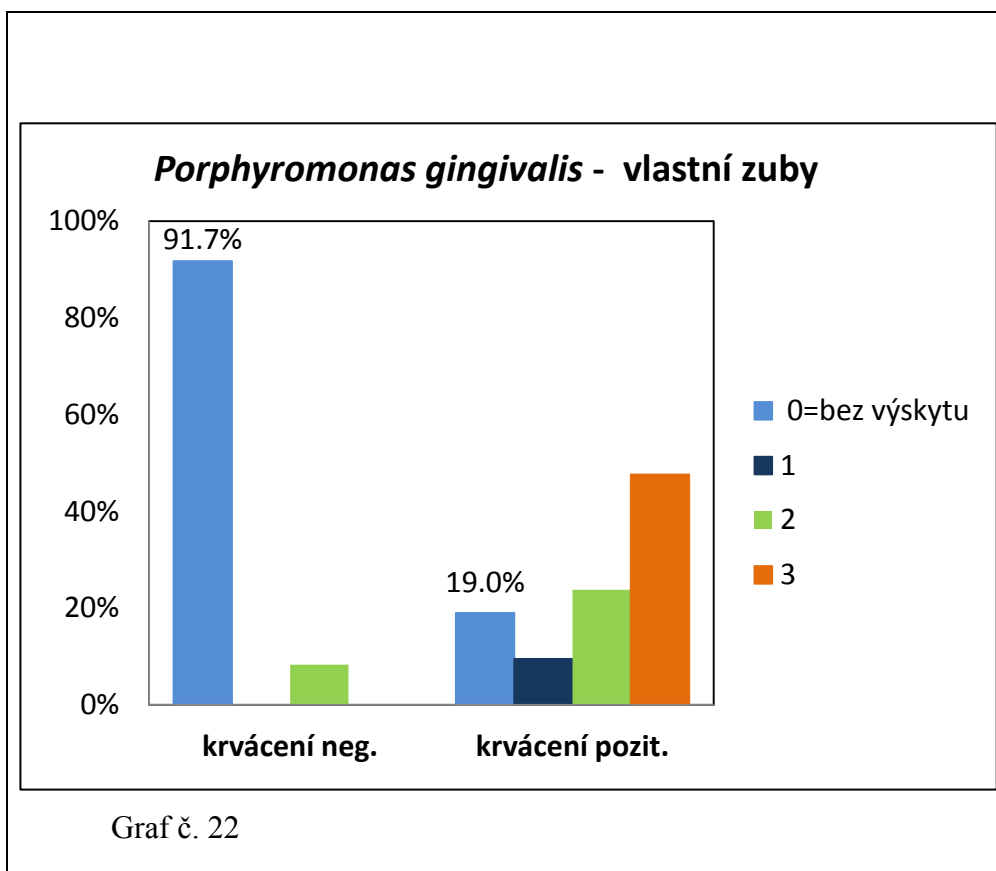
Signifikance Fisherova přesného testu

	implantáty	vlastní zuby
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,507	0,0003
<i>Tannerrela forsythensis</i>	0,608	0,486
<i>Treponema denticola</i>	0,719	0,102
<i>Prevotella intermedia</i>	1,000	1,000
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1,000	0,756

Tabulka č. 19

Fisherův přesný test prokázal signifikantně vyšší výskyt bakterie *P. gingivalis* u vlastních zubů s výskytem krvácení (přesně vypočítaná hladina signifikance testu p = 0,0003)(viz tabulka č. 19).

Výsledky Fisherova přesného testu pro *P. gingivalis*. Posouzení výskytu krvácení na podráždění a výskytu bakterií (0-3) u vlastních zubů (viz graf č. 22).



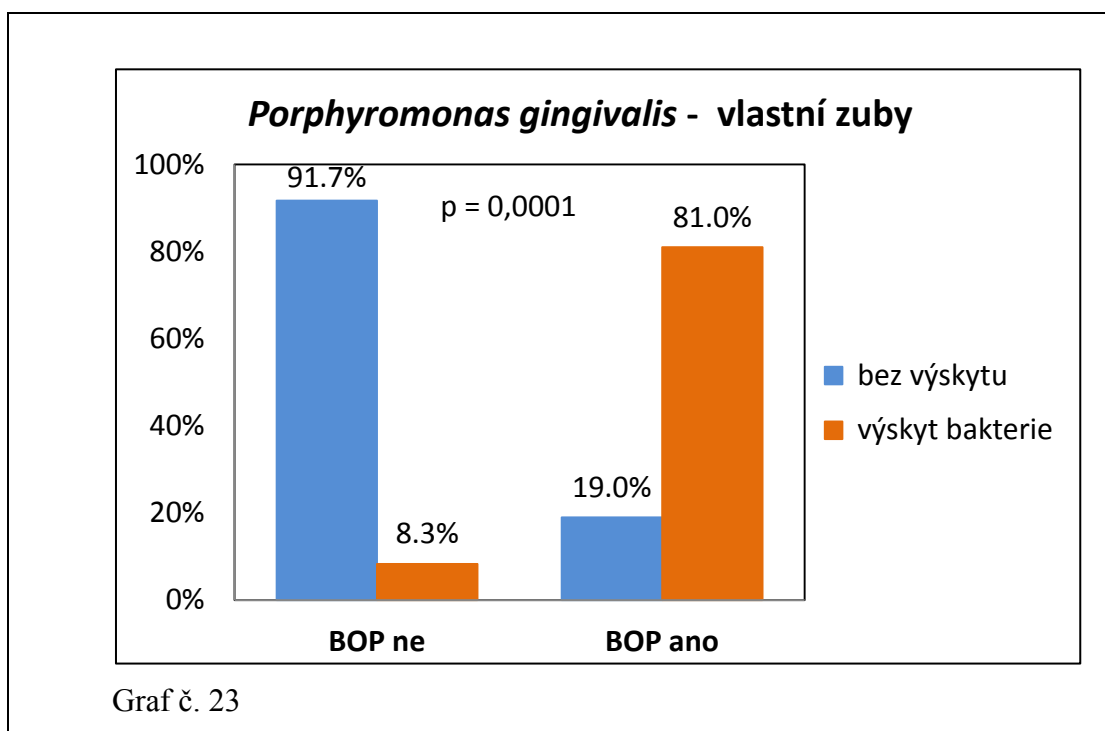
Posouzení závislosti krvácení na podráždění a výskytem bakterií (0/1-3) u enoseálních implantátů a vlastních zubů (viz tabulka č. 20).

Signifikance Fisherova přesného testu pro kategorizaci výskytu bakterií (0=bez výskytu / 1-3= s výskytem)

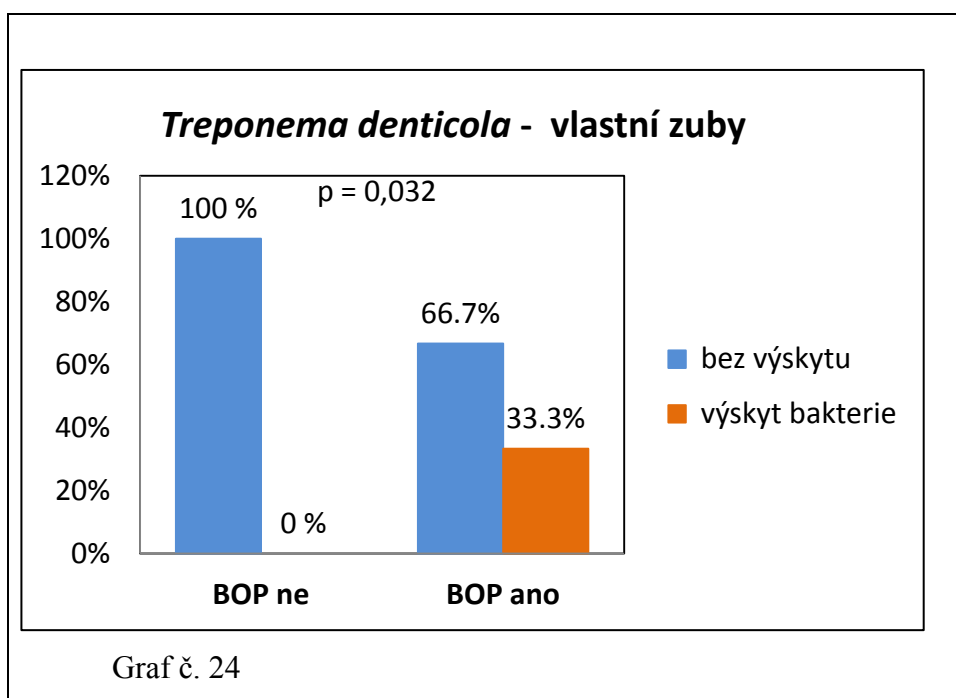
	implantáty	vlastní zuby
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1,000	0,0001
<i>Tannerella forsythensis</i>	1,000	0,133
<i>Treponema denticola</i>	0,282	0,032
<i>Prevotella intermedia</i>	1,000	1,000
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1,000	1,000

Tabulka č. 20

Fisherův přesný test prokázal signifikantně vyšší výskyt bakterie *P. gingivalis* u vlastních zubů s výskytem krvácení (81% vs. 8% u vlastních zubů bez krvácení), přesně vypočítaná hladina signifikance testu $p = 0,0001$ (viz graf č. 23).



Fisherův přesný test prokázal signifikantně vyšší výskyt bakterie *T. denticola* u zdravých zubů s výskytem krvácení (33% vs. 0% u vlastních zubů bez krvácení), přesně vypočítaná hladina signifikance testu $p = 0,032$ (viz graf č. 24).



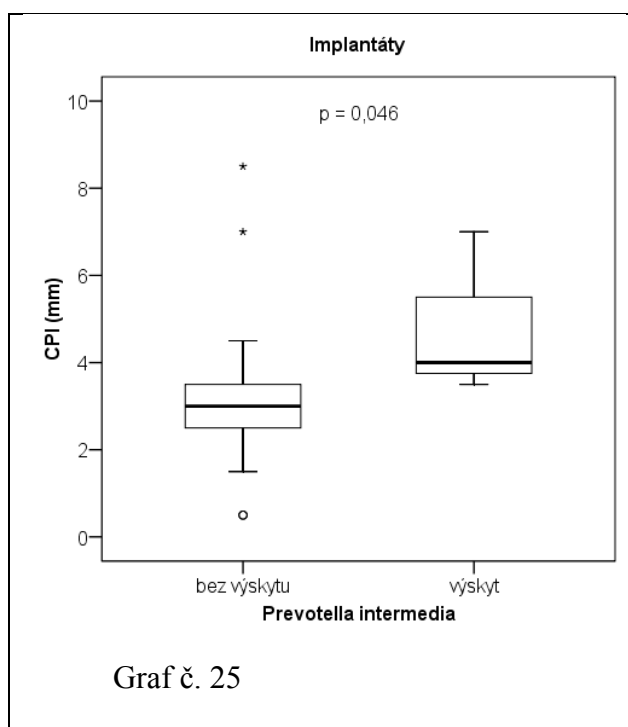
Posouzení závislosti mezi výskytem bakterií a hloubkou sulku u enoseálních implantátů.

Test Mann-Whitney prokázal signifikantě větší hloubku sulku u enoseálních implantátů s výskytem bakterie *P. intermedia* (medián CPI 4,0 mm vs. 3,0 mm u enoseálních implantátů bez výskytu bakterie). Přesně vypočítaná hladina signifikance testu $p = 0,046$ (viz tabulka č. 21,22 a graf č. 25).

	Hloubka sulku (mm) - implantáty		p
	s výskytem	bez výskytu	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3,0 (0,5-8,5)	3,0 (0,5-4,0)	0,543
<i>Tannerella forsythensis</i>	3,5 (0,5-8,5)	3,0 (0,5-7,0)	0,204
<i>Treponema denticola</i>	3,5 (0,5-7,0)	2,5 (0,5-8,5)	0,120
<i>Prevotella intermedia</i>	4,0 (3,5-7,0)	3,0 (0,5-8,0)	0,046
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	3,5 (3,5-3,5) ^a	3,0 (0,5-8,5)	0,523

medián (min-max), pouze 1 výskyt, p ... signifikance Mann-Whitney testu

Tabulka č. 21



Výsledky testu Mann-Whitney

Ranks				
	Prevotella intermedia	N	Mean Rank	Sum of Ranks
CPI (mm)	0	30	15,95	478,50
	1-3	3	27,50	82,50
	Total	33		

Test Statistics ^b	
	CPI (mm)
Mann-Whitney U	13,500
Z	-1,997
Asymp. Sig. (2-tailed)	,046

b. Grouping Variable: Prevotella intermedia

Tabulka č. 22

Posouzení závislosti mezi výskytem bakterií a hloubkou sulku u vlastních zubů.

U vlastních zubů nebyla prokázána signifikantní závislost mezi výskytem bakterií a hloubkou sulku (Mann-Whitney test), (viz tabulka č. 23).

	Hloubka chobotu (mm) – vlastní zuby		
	s výskytem	bez výskytu	p
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3,3 (1,0-7,0)	2,0 (0,5-5,5)	0,056
<i>Tannerella forsythensis</i>	3,5 (1,0-5,0)	2,5 (0,5-7,0)	0,649
<i>Treponema denticola</i>	3,5 (1,0-7,0)	2,3 (0,5-5,5)	0,206
<i>Prevotella intermedia</i>	4,5 (4,5-4,5) ^a	2,5 (0,5-7,0)	0,290
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	3,0 (1,5-3,5)	2,5 (0,5-7,0)	0,950

medián (min-max), pouze 1 výskyt, p ... signifikance Mann-Whitney testu

Tabulka č. 23

Posouzení závislosti mezi výskytem bakterií a dobou od zavedení enoseálních implantátů.

Mann-Whitney test neprokázal signifikantní závislost mezi výskytem bakterií a dobou od zavedení enoseálního implantátu (viz tabulka č. 24).

	Doba od zavedení implantátu (měsíce)		p
	s výskytem	bez výskytu	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	39 (14 - 154)	41 (12 - 102)	0,785
<i>Tannerrela forsythensis</i>	42 (15 - 154)	39 (12 - 95)	0,388
<i>Treponema denticola</i>	36 (12 - 102)	45 (15 - 154)	0,172
<i>Prevotella intermedia</i>	39 (15 - 79)	41 (12 - 154)	0,900
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	102 (102–102) ^a	38 (12 - 154)	-

medián (min-max), pouze 1 výskyt, p ... signifikance Mann-Whitney testu

Tabulka č. 24

5.5. Diskuse

Bylo publikováno několik studií týkajících se složení biofilmu v submukózní oblasti enoseálních implantátů. Výsledky průřezových [48,49] a longitudinálních studií [50,51] ukázaly podobnou strukturu a složení biofilmu v periimplantátové oblasti jako v subgingiválním prostoru vlastních zubů. V souboru byl výskyt periopatogenů v subgingivální oblasti vlastních zubů a v periimplantátovém sulku procentuálně téměř identický. U pacientů s léčenou parodontitidou s pravidelnými recally tedy nejsou žádné zásadní rozdíly v kolonizaci vlastních zubů a enoseálních implantátů.

Signifikantní závislost mezi četností výskytu periopatogenu *P. gingivalis* a krvácením na podráždění u vlastních zubů, je zcela očekávaný výsledek statistického vyhodnocení, vzhledem k charakteristickým vlastnostem tohoto periopatogenu z červeného komplexu. Ze stejného důvodu byla detekována signifikantní závislost mezi prostou přítomností (bez verifikace četnosti) a krvácením na podráždění periopatogenu *P. gingivalis* a *T. denticola*.

Za zmínku v diskusi stojí i signifikantní závislost mezi hloubkou sondáže u enoseálních implantátů a výskytem bakterie *P. intermedia*. Byl popsán vztah mezi počtem jednotlivých genotypů *P. intermedia* a zvětšením hloubky sondáže, tzn. čím více genotypů, tím větší hloubka sondáže [52]. Žádná jiná signifikantní závislost mezi hloubkou sondáže a výskytem periopatogenů u vlastních zubů nebo enoseálních implantátů nebyla prokázána.

U každého enoseálního implantátu stejně jako u vlastních zubů dochází k fyziologické atrofii měkkých i tvrdých podpůrných tkání. U enoseálních implantátů dochází k přirozenému obnažování povrchu fixtury, tento nerovný povrch by mohl podporovat výraznější kolonizaci periopatogeny. Tato teorie nebyla statisticky potvrzena, jelikož nebyla nalezena signifikantní závislost mezi dobou od zavedení implantátu a výraznějším výskytem periopatogenů.

5.6. Závěr

Bakteriální osídlení subgingiválního prostoru vlastního zubu a submukózního prostoru enoseálního implantátu u pacientů s léčenou parodontitidou je velmi podobné. U pacientů s lokálními projevy zánětu marginálních měkkých tkání se nacházely bakterie s úzkým vztahem k resorpci tvrdých podpůrných tkání. U těchto pacientů je oslaben základní obranný mechanismus-okrajový uzávěr. Jedině kvalitní okrajový uzávěr má schopnost tvořit dobrou bariéru vůči bakteriální invazi, případně ovlivňovat vyžrávání biofilmu.

6. Význam pro klinickou praxi

Z výše uvedených výsledků mikrobiálních analýz lze vyvodit závěry podstatné pro klinickou praxi. Obecně je můžeme rozdělit na preventivní aspekty a možnosti terapie parodontitid, stejně jako nejdůležitější zásady použití dentálních implantátů u pacientů s parodontitidou.

6.1. Prevence

U většiny pacientů, kteří se dostaví na parodontologické oddělení s diagnózou agresivní parodontitis, je nevyhovující hygiena prvním faktorem umožňujícím formaci supragingiválního biofilmu. Eliminace biofilmu obsahujícího virulentní formy periopatogenů je jednoznačnou nutností při prevenci vzniku parodontitid. V případě již probíhajícího onemocnění je nutná včasná diagnostika a zahájení terapie.

Informovanost pacientů již v raném věku o správných postupech k udržování hygieny dutiny ústní je základním nedostatkem v České republice. Pacienti by měli být instruováni vhodnou atraumatickou metodou čištění zubů, stejný důraz je kladen také na volbu kartáčků a dalších pomůcek jako jsou interdentální kartáčky či používané antimikrobiální výplachy. Hygienická instruktáž a motivace pacienta by měla být prováděna pravidelně a individuálně upravována.

V rámci preventivních prohlídek prováděných 2x ročně je nutné kontrolovat stav parodontu. Jedině takto je možná včasná diagnostika jakéhokoliv onemocnění parodontu a umožněna okamžitá intervence.

6.2. Terapeutické možnosti

Terapii agresivních parodontitid je nutné opřít především o kvalitní mechanickou léčbu, samozřejmě v návaznosti na kvalitní ústní hygienu. Úvaha o celkové antibiotické léčbě by měla být až při vyčerpání všech možných konzervativně-chirurgických postupů, včetně využití augmentačních technik. Využití celkové antibiotické léčby vždy v kombinaci s mechanoterapií bych dle zkušeností doporučoval jen v případech refrakce nebo výrazně generalizované agresivní parodontitidy s purulentní exsudací z parodontálních chobotů. Volba použitých

antibiotik by měla být dána mikrobiálním PCR vyšetřením. V případě spektra periopatogenů neobsahujících *A. actinomycetemcomitans* by mělo postačit využití jednotlivých antibiotik dle citlivosti (Metronidazol, Amoxicilin, Clindamycin) s dávkováním dle standardního doporučení.

6.3. *Implantace u pacientů s parodontitidou*

Před plánovanou implantací je vždy nutné provést důkladnou rozvahu nejen nad lokální morfologií tkání, ale vždy uvažovat nad habitem celé dutiny ústní. Jednou ze stránek pohledu je i stav parodontu, který do jisté míry limituje možnou implantaci.

Téměř totožné bakteriální osídlení sulku vlastních zubů a enoseálních implantátů u pacientů s léčenou parodontitidou nám dokázalo, že u těchto pacientů tedy není bakteriální kolonizace limitujícím faktorem. Dlouhodobá prognóza enoseálního implantátu je tedy totožná, jako u „zdravých“ pacientů. U enoseálního implantátu zavedeného dle všech pravidel implantologického protokolu platí stejně jako u vlastních zubů, že prevence je na prvním místě.

7. Souhrn

První část práce se zabývá mikrobiálním osídlením parodontálních chobotů u agresivních parodontitid a vlivem jednotlivých periopatogenů na destrukci attachmentu. Druhá část práce konfrontuje možnost použití antibiotik při plánování komplexní parodontologické léčby. Ve třetí části je zkoumáno bakteriální osídlení implantátového sulku a sulku vlastních zubů u pacientů s léčenou parodontitidou.

Z výsledků analýz vypracovaných ve spolupráci s Ústavem lékařské biofyziky bylo vyvozeno několik doporučení: pro parodontologickou terapii agresivních parodontitid, pro antibiotickou léčbu u pacientů s agresivní parodontitidou a pro možnosti implantace u pacientů s parodontitidou.

Summary

Key words: aggressive periodontitis, periopathogenes, implant sulcus, attachment loss

The first part deals with the microbial colonization in periodontal pockets of aggressive periodontitis and ability of individual periopathogenes to destruct periodontal attachment. The second part confronts the possibility of using antibiotics in the planning of complex periodontal treatment. The third part examined the bacterial population of implants sulcus and sulcus of own teeth in patients treated for periodontitis.

The results of the analyzes developed in collaboration with the Department of Medical Biophysics was some recommendations: for periodontal treatment of aggressive periodontitis, antibiotic treatment for patients with aggressive periodontitis and options for implantation in patients with periodontitis.

8. *Literatura*

1. Grant DA, Stern IB, Listgarten MA. Periodontics. 6th ed. St. Louis, Mo: CV Mosby Company; 1988:159.
2. Nield-Gehrig JS, Willman D. Foundations of Periodontics for the Dental Hygienist. Philadelphia, Pa: Lippincott, Williams, and Wilkins; 2002:56,57,87.
3. Løe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. J Periodontol. 1965;36:177-183.
4. Newman MG, Takei H, Carranza FA Jr. Carranza's Clinical Periodontology. 9th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Company; 2002:89,102,104,105,135,136.
5. Hodges K. Concepts in Nonsurgical Periodontal Therapy (Rp Dental Assisting Procedures). Independence, Ky: Delmar Learning; 1997:11,12,16.
6. Classification of Periodontal Diseases and Conditions, 1999 International Workshop for Classification of Periodontal Diseases and Conditions
7. Gary C Armitage, Diagnosis and Clasification of Periodontal Diseases, Periodontics: Medicine, Surgery, and implants 20-31,2004
8. Lang N, Cullinan M, et al: Consensus report: aggressive periodontitis, Ann Periodontol 4:53, 1999
9. Sutherland IW. Biofilm matrix polymers – role in adhesion. In: Newman HN, Wilson M, ed. Dental plaque revisited. Cardiff: Bioline, 1999: 49–62.
10. Sigmund S. Socransky & Anne D. Haffajee, Dental biofilms: difficult therapeutic targets, Periodontology 2000, Vol. 28, 2002, 12–55
11. Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scott HM. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. J Appl Microbiol 1999: 85: S19–S28.
12. Duguid JP, Smith IW, Dempster G, Edmunds PN. Non-flagella filamentous appendages (“fimbriae”) and haemagglutinating activity in Bacterium col. J Pathol Bacteriol 1955: 70: 335–348.
13. Hallberg K, Holm C, Ohman U, Stromberg N. *Actinomyces naeslundii* displays variant fimP and fimA fimbrial subunit genes corresponding to

- different types of acidic prolinerich protein and beta-linked galactosamine binding specificity. *Infect Immun* 1998; 66: 4403–4410.
14. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994; 5: 66–77.
 15. Listgarten MA. Formation of dental plaque and other oral biofilms. In: Newman HN, Wilson M, ed. *Dental plaque revisited*. Cardiff: Bioline, 1999: 187–210.
 16. Lamell CW, Griffen AL, McClellan DL, Leys EJ. Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1196-1199.
 17. Tanner AC, Milgrom PM, Kent R Jr, Mookkeem SA, Page RC, Riedy CA, Weinstein P, Bruss J. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J Dent Res* 2002; 81: 53-57.
 18. Asikainen S, Chen C, Alaluusua S, Slots J. Can one acquire periodontal bacteria and periodontitis from a family member? *J Am Dent Assoc* 1997; 128: 1263-1271.
 19. Rudney JD, Chen C, Sedgewick GJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res* 2005; 84:59-63.
 20. Rudney JD, Chen C Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 1999; 20: 65-81.
 21. Komatsuzawa H, Asakawa R, Kawai T, Ochiai K, Fujiwara T, Taubman MA, Ohara M, Kurihara H, Sugai M. Identification of six major outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene* 2002; 288: 195-201.
 22. Daniel H. Fine, Jeffrey B. Kaplan, Scott C. Kachlany, Helen C. Schreiner. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases. *Periodontol* 2000 2006; 42:114-157
 23. Asakawa R, Komatsuzawa H, Kawai T, Yamada S, Goncalves RB, Izumi S, Fujiwara T, Nakano Y, Suzuki N, Uchida Y, Ouhara K, Shiba H, Taubman MA, Kurihara H, Sugai M. Outer membrane protein 100, a versatile virulence

- factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Mol Microbiol 2003: 50 : 1125-1139
24. Li L, Matevski D, Aspiras M, Ellen RP, Lepine G. Two epithelial cell invasion-related loci of the oral pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Oral Microbiol Immunol 2004: 19: 16-25
 25. Korostoff J, Wang JF, Kieba I, Miller M, Shenker BJ, Lally ET. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. Infect Immun 1998: 66: 4474-4483.
 26. Lally ET, Hill RB, Kieba IR, Korostoff J. The interaction between RTX toxins and target cells. Trends Microbiol 1999: 7: 356-361
 27. Yamaguchi N, Kieba IR, Korostoff, Howard PS, Shenker BJ, Lally ET. Maintenance of oxidative phosphorylation proteus cells from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. Cell Microbiol 2001: 3: 811-823
 28. Kelk P, Johansson A, Claesson R, Hanstrom L, Kalfas S. Caspase 1 involvement in human monocyte lysis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. Infect Immun 2003: 71: 4448-4455.
 29. Chun YH, Chun KR, Olguin D, Wang HL. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis. J Clin Periodontal Res 2005: 40: 87-95.
 30. Holt SC, Kesavalu I, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontol 2000 1999: 20:168-238.
 31. Kurt Dierickx , Martine Pauwels , Marja L. Laine , Johan Van Eldere , Jean-Jacques Cassiman , Arie J. Van Winkelhoff , Daniel Van Steenberghe , Marc Quirynen. Adhesion of *Porphyromonas gingivalis*. Serotypes to Pocket Epithelium. Journ of Periodon 2003: 74, 844-848.
 32. Tanner ACR, Izard J. *Tannerella forsythia*, a periodontal pathogen entering the genomic era. Periodontology 2000 2006: 42 :88-113.
 33. Machtei EE, Dunford R, Hausmann E, Grossi S, Ho A, Davis G, Chandler J, Zambon JJ, Genco RJ. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. J Clin Periodontol 1999: 26: 374-380.
 34. Tanner ACR, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. J Clin Periodontol 1998: 25: 85-98.

35. Tran SD, Rudney JD, Sparks BS, Hodges JS. Persistent presence of *Bacteroides forsythus* as a risk factor for attachment loss in a population with low prevalence and severity of adult periodontitis. J Periodontol 2001; 72: 1-10.
36. Michael N. Sela. Role of *Treponema Denticola* in Periodontal Diseases. Crit Rev Oral Biol Med 2001; 12:399-413.
37. Bacterial Profiles of Subgingival Plaques in Periodontitis; W. J. Loesche, S. A. Syed, E. Schmidt and E. C. Morrison, Journal of Periodontology, August 1985, Vol. 56, No. 8, Pages 447-456
38. Kamma JJ, Nakou M, Manti FA: Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressing periodontitis, J periodont Res 30:66-72,1995.
39. Moore WEC, Moore LVH: The bacteria of periodontal diseases, Periodontology 2000 5:66-77,1994.
40. Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, et al: Comparative bacteriology of juvenile periodontitis, Infect immun 48:507-519,1985
41. Dahlén G, Wikström M: Occurrence of enteric rods, staphylococci and *Candida* in subgingival samples, Oral Microbiol Immunol 10:42-46,1995.
42. Edwardsson S, Bing M, Axtelius B, et al: The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapyresistant periodontitis, J Clin Periodontol 26: 143-152,1999.
43. Haffajee AD, Socransky SS, Gunsolley JC. Systemic antiinfective periodontal therapy. A systematic review. Ann Periodontol 2003; 8: 115–181.
44. Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S. A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planing in periodontitis patients. J Clin Periodontol 2002; 29 (Suppl. 3): 136–159.)
45. Sigusch, B., Beier, M., Klinger, G., Pfister, W. & Glockmann, E. (2001) A 2 - step non-surgical procedure and systemic antibiotics in the treatment of rapidly progressive periodontitis. Journal of Periodontology 72, 275–283.
46. American Academy of Periodontology: Consensus report. Discussion section I, Proceeding of World Workshop in Clinical Periodontics. Chicago, 1989, American Academy of Periodontology, pp I-23-I-32.
47. Martin Starosta, Význam připojené gingivy v okolí zubního implantátu, Stomatologický občasník 2008/9

48. Mombelli, A., van Oosten, M.A.C., Schürch & Lang, N.P. (1987). The microbiota associated with successful or failing osseointegrated implants. *Oral Microbiology and Immunology* 2, 145-151.
49. Mombelli, A., Marxer, M., Gaberhüel, T., Grunder, U. & Lang, N.P. (1995). The microbiota of osseointegrated implants in patients with a history of periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology* 22, 124-130.
50. Mombelli, A, Buser, D. & Lang, N.P. (1988). Colonization of osseointegrated titanium implants in edentulous patients: early results. *Oral Microbiology and Immunology* 3, 113-120.
51. Pontoriero, R., Tonelli, M.P., Carnevale, G., Mombelli, A., Nyman, S.R. & Lang, N.P. (1994). Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clinical Oral Implants Research* 5, 254-259.
52. Ana Cláudia B.A. Alves, Marcelo H. Napimoga, Marlise I. Klein, Jose F. Hofling, and Reginaldo B. Gonçalves .Increase in Probing Depth Is Correlated With a Higher Number of *Prevotella intermedia* Genotypes. *Journal of Periodontology* January 2006, Vol. 77, No. 1, Pages 61-66

Poděkování

Děkuji všem, kteří se podíleli se mnou na řešení uvedené problematiky.

Svému školiteli doc. MUDr. Martinu Starostovi, Ph.D., vedoucímu oddělení parodontologie a onemocnění ústní sliznice Kliniky zubního lékařství Univerzity Palackého Olomouc, děkuji za odborné vedení při stanovení metodického plánu práce.

Mgr. Janě Zapletalové, Dr., z Ústavu lékařské biofyziky děkuji za spolupráci při statistickém vyhodnocení výsledků.

Mgr. Haně Neoralové, odb. as. MUDr. Simoně Kaprálové, Ph.D. a MUDr. Rostislavovi Kozákovi děkuji za jazykovou úpravu a spolupráci při konečném zpracování práce.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně a uvedl jsem veškerou použitou literaturu a jiné prameny.

V Olomouci dne 14. 3. 2012