
Mikrobiologisk diagnostik ved sygdomme i mundhulen

NILS-ERIK FIEHN

Hovedparten af en tandlæges arbejde er forebyggelse, diagnostik, behandling, prognosevurdering og kontrol af sygdomme i mundhulen med mikrobiologisk ætiologi. Langt de fleste af disse sygdomme er infektionssygdomme, hvor værtsorganismen søger at eliminere infektionen gennem inflammatoriske reaktioner. Det drejer sig fx om sygdomme som gingivitis, marginal og apikal parodontitis, infektioner i slimhinde og i knogle. Caries, som er den mundhulesygdom, tandlæger har beskæftiget sig mest med, er som bekendt også en mikrobiologisk induceret sygdom, men rammer ikke vaskulariseret tandvæv, hvorfor de almindelige immunologiske reaktioner ikke igangsættes.

I den klinisk-medicinske verden er mikrobiologisk diagnostik et vigtigt redskab i diagnostik og behandling af mange generelle infektionssygdomme. Man kan stille spørgsmålet, hvorfor dette ikke har været tilfældet i den klinisk-odontologiske verden, da tandlæger som nævnt overvejende er beskæftiget med sygdomme med en mikrobiologisk baggrund? Der er flere umiddelbare årsager. I modsætning til generelle infektionssygdomme er infektioner i mundhulen som oftest kroniske infektioner, som relativt let diagnosticeres og behandles ved mekanisk fjernelse af fx carieret tandvæv og dental plak. Herved elimineres mikroorganismerne, som er årsag til udvikling af de dominerende sygdomme i mundhulen, caries, gingivitis og marginal parodontitis. Følges behandlingen op med ændrede kost- og tandplejevaner, fasthol-

des normalt et vellykket behandlingsresultat. En anden grund til, at tandlæger ikke har anvendt mikrobiologisk diagnostik, er den komplekse mikrobiologiske baggrund for de væsentlige og dominerende mundhulesygdomme. De generelle infektionssygdomme har ofte en specifik mikrobiologisk ætiologi, hvor den mikrobiologiske diagnostik hjælper lægen i valg af behandling; fx kan en lungeinfektion være forårsaget af *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila* eller *Mycoplasma pneumoniae*, som er egentlige patogene mikroorganismer. Modsat har de fleste infektioner i mundhulen en meget mere kompliceret mikrobiologisk baggrund, hvor mange mikroorganismer, som tilhører den normalt forekommende mikroflora i mundhulen, samtidigt er involveret i sygdomsudvikling. En mikrobiologisk undersøgelse vil derfor ofte resultere i et meget broget mikrobiologisk billede, som er vanskeligt at tolke. Der er dog undtagelser herfra, fx for slimhindeinfektioner og visse knogleinfektioner, som ofte viser en vis specificitet, hvor en mikrobiologisk undersøgelse kan være til stor hjælp for den kliniske diagnose og valg af behandling (1).

Epidemiologiske undersøgelser har vist, at nogle individer har forøget sygdomsrisiko og rammes af fx aggressive former for marginal parodontitis og af særlig høj cariesaktivitet (2,3). Her kan mikrobiologiske undersøgelser tænkes at hjælpe til at vurdere risiko for udvikling af sygdom.

Rationalet for mikrobiologisk diagnostik har således flere facetter og muligheder. Spørgsmålet er, i hvilke situationer kan mikrobiologisk diagnostik hjælpe tandlægen i valg af behandling, kontrol af behandling, vurdering af sygdomsrisiko, prognosevurdering og evt. til vurdering af patientens Kooperation? Med henblik herpå vil denne artikel fokusere på nuværende status for diagnostik af bakterier og gærsvampe ved mundhulesygdomme - caries, marginal parodontitis, følgesygdomme efter disse samt infektioner i den orale mucosa.

Kort om mundhulesygdommenes mikrobiologi

Vor viden om mikrofloraen i mundhulen baserer sig hovedsageligt på mange tværsnitsundersøgelser. Der er påvist mere end 700 forskellige mikroorganismer i mundhulen tilhørende dens normalflora. Op imod halvdelen af disse er ikke-dyrkbare og mange heraf endnu ikke navngivet (4). Dette indebærer en betydelig vanskelighed for evt. mikrobiologisk diagnostik i forbindelse med sygdomme i mundhulen, idet egenskaber knyttet til de ikke-dyrkbare mikroorganismer selvsagt er ukendte. Normalfloraen er i udgangspunktet ikke sygdomsfremkaldende, men i forbindelse med akkumulation af mikroorganismer i mundhulen kombineret med uhensigtsmæssige skift i dens sammensætning kan sygdom initieres og videreudvikles af normalfloraen (5). Normalfloraens sammensætning er forskellig fra lokalisation til lokalisation i mundhulen. Generelt er blandingsfloraen i balance ved homøostatiske mikrobielle mekanismer. Dette kommer særligt til udtryk i mikrofloraen i den dentale plak (5). Tabel 1 viser eksempler på dominerende mikroorganismer på de glatte slimhinder og tungeryg, i saliva, samt i supra- og subgingival plak med angivelse af deres relative andel af mikrofloraen. Ud over de i tabellen angivne bakteriearter forekommer forskellige arter af gærsvampen *Candida* især på de glatte slimhinder og i saliva. Oplysningerne i tabellen angående den supra- og subgingivale plak vedrører en udviklet plak. Plakudviklingen indledes typisk med bakterier tilhørende Gram-positive kokker og Gram-positive stave; siden forekommer Gram-negative kokker og forskellige former for Gram-negative stave, som overvejende tilhører de anaerobe bakterier. Det er beskrevet, at 4-5 bakteriekomplekser i forbindelse med udvikling af plak efterfølger hinanden (6).

Slår de mikrobielle homøostatiske mekanismer i mikrofloraen ikke til, fx pga. af utilstrækkelig mundhygiejne, ændrede kostvaner og medicinindtagelse, kan der ske betydelige mikrobielle skift i mikrofloraens sammensætning, hvilket kan føre til udvikling af

Tabel 1. Dominerende bakteriegrupper og -arter i normalfloraen ved forskellige lokalisationer i mundhulen baseret på dyrkningsundersøgelser og mikroskopi (spirokæter). +++, ++, + og (+) angiver den relative dominans af bakterierne ved de angivne lokalisationer, hvor +++ betyder større procentandele af den samlede mikroflora og (+) betyder en meget lille andel af den samlede mikroflora.

Forkortelser: S.: Streptococcus; P.: Parvimonas.

Bakteriegruppe/-art	Glatte slimhinder	Tunge-ryg	Saliva	Supra-gingival plak	Sub-gingival plak
Gram-positive kokker					
- orale streptokokker					
<i>S. sanguinis</i>	+++	+++	+	++	++
<i>S. mitis</i>	++		++	++	+
<i>S. gordonii</i>	++			+	+
<i>S. mutans</i> -gruppen				+	+
<i>S. salivarius</i>	+	++	++		+
<i>S. anginosus</i> / <i>S. constellatus</i>	+	+		++	++
<i>P. micra</i>					++
Gram-positive stave					
<i>Actinomyces</i> -arter		++	++	++	+
<i>Lactobacillus</i> -arter		+	+	+	
<i>Bacterionema</i>				+	
Gram-negative kokker					
<i>Neisseria</i> -arter	+		++		
<i>Veillonella</i> -arter		+	+	+	+
Gram-negative stave					
<i>Hæmophilus</i> -arter	+		+	+	+
<i>Prevotella intermedia</i> m.fl.		+	(+)	+	++
<i>Porphyromonas</i> <i>gingivalis</i>		+			+
<i>Fusobacterium</i> -arter		+	(+)	+	++
<i>Tannerella forsythia</i>		+			+
Filamenter				+	+
Bevægelige stave		(+)			+
Spirokæter		(+)		+	++

sygdom. Dette kommer særligt til udtryk i plakken, hvor udvikling af caries og marginal parodontitis kan blive resultatet. Disse sygdomme udgør grundlaget for udvikling af en række efterfølgende infektionssygdomme i mundhulen. Tabel 2 viser eksempler på de vigtige mikroorganismer i floraen ved aktiv caries, aggressiv marginal parodontitis, apikal parodontitis og andre infektioner i knoglen samt infektioner i oral mucosa. For caries og marginal parodontitis er vægten lagt på bakterier, som dominerer ved aktiv sygdom. For caries, marginal parodontitis og apikal parodontitis er der ved avancerede molekylærbiologiske teknikker fundet en del bakterier, som ikke er indeholdt i Tabel 2, og disse bakteriers egenskaber må betragtes som ukendte. *Streptococcus mutans*-gruppen består af 7-8 bakteriearter. De vigtige bakteriearter ved marginal parodontitis tilhører to komplekser - det orange og det røde kompleks. Det er især bakterierne i det røde kompleks: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* og *Treponema denticola*, der forbindes med aggressiv parodontitis samt *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ved juvenil parodontitis, som også er en aggressiv form for parodontitis. Ved aggressiv parodontitis er mikrofloraen, ligesom ved apikal parodontitis, abscesser og osteomyelitis domineret af anaerobe bakterier. *Staphylococcus aureus*, *Candida*-arter og tarmbakterier kan dominere ved vanskeligt behandlelige tilfælde af marginal parodontitis. Dette er især observeret efter forudgående behandlinger af infektionssygdomme med antibiotika. Det er karakteristisk, at hovedparten af infektioner vist i Tabel 2 drejer sig om samtidig forekomst af mange forskellige bakteriearter. Undtagelsen er infektioner i den orale mucosa, hvor der ofte findes dominans af en af den angivne mikroorganismer, hyppigst af *Candida*-arter. Aktinomykose og osteomyelitis kan også opfattes som undtagelser, da *Actinomyces*-arter er årsag til aktinomykose, og osteomyelitis kan have en specifik bakteriologisk årsag.

Bakteriegruppe/-art	Aktiv caries	Aggressiv parodontitis	Apikal parodontitis	Absces	Osteomyelitis	Aktinomykose	Mucosa infektion
Gram-positive kokker							
<i>S. sanguinis</i>	+		+	+	+		
<i>S. mitis</i>				+	+		
<i>S. mutans-gruppen</i>	+		+				
<i>S. salivarius</i>							
<i>S. anginosus/S. constellatus</i>	+	+		+	+		
<i>S. pyogenes</i>				+	+		+
<i>Staph. aureus</i>				+	+		+
<i>E. faecalis</i>			+				+
<i>Parvimonas micra</i>		+		+	+		
Gram-positive stave							
<i>Actinomyces-arter</i>	+		+	+	+	+	
<i>Lactobacillus-arter</i>	+			+			
<i>Bacterionema</i>	+						
<i>Bifidobacterium</i>	+		+	+	+		
<i>Eubacterium-arter</i>	+	+	+	+	+		
<i>Propionibacterium</i>	+					+	
Gram-negative kokker							
<i>Veillonella</i>	+			+	+		
Gram-negative stave							
<i>Haemophilus-arter</i>						+	
<i>A. actinomycetemcomitans</i>		+				+	
<i>P. intermedia, m. fl.</i>		+	+	+	+	+	
<i>P. gingivalis</i>		+		+	+		
<i>P. endodontalis</i>			+				
<i>Fusobacterium-arter</i>		+	+	+	+		
<i>Tannerella forsythia</i>		+					
<i>Bevægelige stave</i>		+	+	+	+		
<i>Tarbakterier</i>							+
Spirokæter							
<i>T. denticola</i>		+		+	+		
Gærsvampe							
<i>Candida-arter</i>			+				+

Tabel 2. Hyppig forekomst af vigtige bakteriegrupper og –arter samt gærsvampe ved mundhulesygdomme baseret på dyrkningundersøgelse og checkerboard DNA-DNA hybridisering.

Forkortelser: *S.*: Streptococcus; *Staph.*: Staphylococcus; *E.*: Enterococcus; *A.*: Aggregatibacter; *P. intermedia*: Prevotella intermedia; *P. gingivalis* og *P. endodontalis*: Porphyromonas gingivalis og Porphyromonas endodontalis.

Mikrobiologisk diagnostik

Den mikrobiologiske diagnostik udføres i et mikrobiologisk laboratorium på anmodning fra klinikerens og hjælper denne til vurdering af sygdom og patientbehandling.

Den diagnostiske cyklus

Fig. 1 illustrerer det forløb, en patientprøve gennemløber, og samspillet mellem laboratoriet og klinikken. Forløbet starter med, at klinikerens tager en mikrobiologisk prøve, og ender med, at denne modtager en rapport fra laboratoriet til brug for sin beslutningstagen. Forløbet kan sammenfattes i følgende punkter (7):

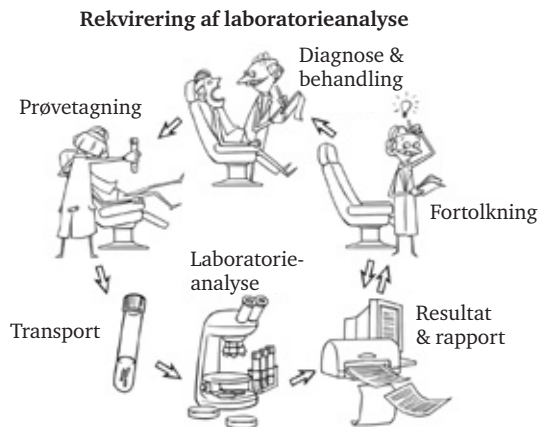


Fig. 1. Den diagnostiske cyklus. En mikrobiologisk prøves gang fra klinik til mikrobiologisk laboratorium og tilbage til klinik. [Tegning af Lasse Bekker Weinreich].

1. Klinikerens rekvirering af mikrobiologisk undersøgelse med samtidig foreløbig information om patienttilfældet.
2. Prøvetagning og transport af prøven til laboratoriet.
3. Laboratorieanalyse.
4. Prøveresultat og rapport til klinikerens.
5. Klinikerens tolkning af prøveresultatet og beslutning.

Ad. 1

I forbindelse med fremsendelse af den mikrobiologiske prøve til laboratoriet er det vigtigt, at den bliver forsynet med en fyldestgørende foreløbig information om patienttilfældet. Det drejer sig om oplysning om, hvorfra prøven er taget, beskrivelse af den kliniske tilstand, evt. tidligere og/eller igangværende antibiotisk behandling, historik om bivirkninger af denne samt om formålet med prøvetagningen. Disse oplysninger er nødvendige for, at laboratoriet kan vælge de rette metoder til analyse af prøven.

Ad. 2

Det er afgørende, at prøvetagningen udføres på en sådan måde, at prøvematerialet er relevant for bedømmelse af den givne sygdom og ikke bliver kontamineret under prøvetagningen. Dette er særdeles følsomt ved prøvetagning i mundhulen, hvor det mikrobiologiske billede varierer fra lokalisation til lokalisation. Som hovedregel er det vigtigt, at prøven transporteres så hurtigt som muligt til laboratoriet og under omstændigheder, der sikrer, at der ikke sker ændringer i prøvens mikrobiologiske sammensætning. For eksempel kan nogle bakterier ikke overleve lange transporttider, mens andre evt. kan vokse, hvis der fx er en næringskilde i prøvematerialet samt en temperatur, som er gunstig for vækst. Sådanne forhold kan føre til fejlagtige resultater af en analyse.

Ad. 3

Laboratorieanalyser af mikrobiologiske prøver består i påvisning og identifikation af mikroorganismer i prøver samt i følsomhedsbestemmelser over for antibiotika. De metoder, som anvendes i forbindelse med identifikation af mikroorganismer, er mikroskopiske undersøgelser, dyrkningsundersøgelser og molekylærbiologiske undersøgelser. Disse undersøgelsesmetoder beskrives kort nedenfor. Immunologiske undersøgelser, fx til påvisning af mikrobielle antigener eller antistoffer mod mikroorganismer i vævsvæsker, kan også komme på tale, men har kun været meget begrænset anvendt i forbindelse med klinisk odontologi.

Ad. 4

De opnåede analyseresultater af mikrobiologiske prøver sammenfattes i en rapport til klinikerens. Den vil typisk bestå af oplysning, om hvilke mikroorganismer en prøve indeholdt, evt. antallet af disse samt deres procentuelle fordeling, og om hvilke antibiotika relevante mikroorganismer er følsomme overfor samt om graden af denne følsomhed. Da mikrofloraen i mundhulen er meget kompleks, vil et mikrobiologisk svar for en prøve herfra normalt afspejle dette med oplysninger om tilstedeværelse af flere, evt. mange forskellige mikroorganismer.

Ad. 5

Til sidst er det op til klinikerens at tolke resultatet af den mikrobiologiske analyse. Dette kan være let ved specifikke infektionssygdomme, men meget vanskeligt ved sygdomme, som har en mere kompleks mikrobiologisk baggrund, der er gældende for mange mundhulesygdomme. Ofte er en dialog mellem klinikerens og mikrobiologen nødvendig, og evt. kan supplerende prøver med tilhørende mikrobiologiske analyser blive nødvendig, inden endelig vurdering og beslutning kan tages.

Laboratoriemetoder

De metoder, som hidtil overvejende har været anvendt i relation til odontologisk klinik, er mikroskopi, dyrkning, herunder antibiotikumfølsomhedsbestemmelser og molekylærbiologiske teknikker.

Mikroskopi

Lysmikroskopi er den generelt anvendte mikroskopiske metode. Udstrygningspræparater kan anvendes ufarvet eller farvet. Den hyppigst anvendte farvemethode er Gram-farvning, som specielt anvendes inden for bakteriologien. Metoden kan også anvendes til gærsvampe, men ofte anvendes PAS-farvning ved gærsvampediagnostik. Ved mikroskopi af ufarvede præparater anvendes ofte fasekontrastmikroskopi eller mørkefeltmikroskopi. Disse mikroskopiske metoder er særligt anvendelige for spirokæter, som har en meget lille diameter. Små spirokæter, som kan dominere i subgingival plak, har ofte en diameter i størrelsesordenen $0,1 \mu\text{m}$. De fleste øvrige bakterier i mundhulen har en diameter $> 0,5 \mu\text{m}$; disse påvises let ved almindelig lysmikroskopi.

En mikrobiologisk prøve indledes almindeligvis ved mikroskopisk at undersøge et Gram-præparat for, hvilke grupper af mikroorganismer, især bakteriegrupper, som prøven indeholder, før man beslutter sig til at gå videre med dyrkning, idet valg af dyrkningssubstrater er bestemt af de indledende mikroskopiske fund. En mikroskopisk undersøgelse kan i visse situationer stå alene, fx ved gærsvampediagnostik.

Dyrkning

På grundlag af indledende mikroskopiske fund udsås fortyndinger af prøven på forskellige faste substrater, fx blodagarplader og selektive substrater. På blodagarplader, evt. beriget med særlige vækstfaktorer, kan de fleste af de dyrkbare bakterier, som findes i prøven, dyrkes. Berigede blodagarplader, som inkuberes anae-

robt i en uge ved 37° C, er ofte anbefalelsesværdige for prøver fra mundhulen, idet mange af bakterierne i mundhulen er ernæringsmæssigt kræsnе og anaerobe. Anaerob inkubering af selektive substrater anvendes for hurtigt at kunne påvise specifikke bakterier i prøven, som man er særligt interesseret i. Et selektivt substrat indeholder eksempelvis farvestoffer og/eller antibiotika, som undertrykker vækst af andre bakterier i prøven end den specifikke bakterieart, som man er interesseret i at bestemme. At supplere de berigede substrater med de selektive substrater giver mulighed for at give klinikeren et hurtigt foreløbigt svar, som oftest inden for en uge. Identifikation af mikroorganismer på grundlag af berigede substrater, hvorpå mange bakterier vokser, kræver et langt større rendyrknings- og identifikationsarbejde, som kan tage op til tre uger i modsætning til identifikation på grundlag af selektive substrater. Til gengæld er mikrobiologisk udredning ud fra berigede substrater langt mere fuldkommen, end hvis bare få selektive substrater er blevet anvendt.

Identifikation af bakterier kræver, at der efter den indledende dyrkning på faste substrater er opnået renkulturer af hver bakterieart i prøven. At kulturen er ren, altså består af millioner af identiske celler, verificeres lysmikroskopisk. Identifikationen baserer sig herefter på kolonimorfologien på det faste substrat samt almindeligvis på en lang række sideordnede biokemiske test, fx sukkerfermentering, enzymprofiler og metaboliske slutprodukter. Er man interesseret i særlige subtyper af en bakterieart, kan dette fx udføres ved biotypning ved undersøgelse vha. et mere finmasket biokemisk system, serologisk typning ved påvisning af særlige antigene overfladestrukturer eller genetisk typning ved karakterisering af det mikrobielle genom på forskellig vis.

Antibiotikumfølsomhedsundersøgelser

Følsomhedstest kan udføres som primære antibiotiske test på den tilsendte mikrobiologiske prøve, som for mundhuleprøver normalt indeholder en blandingsmikroflora, eller som sekundære

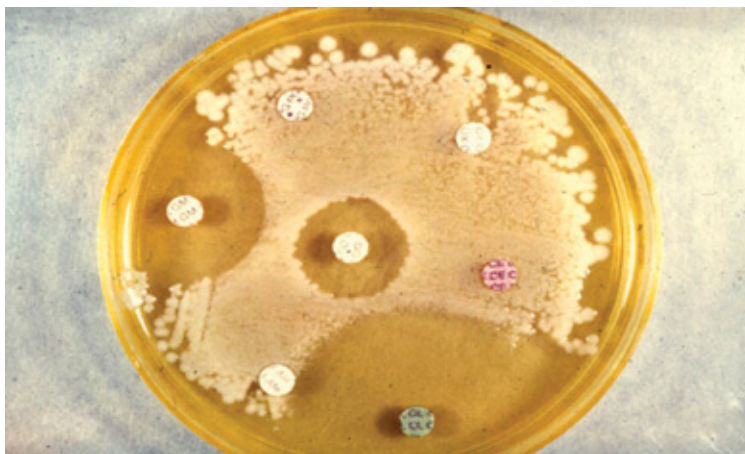
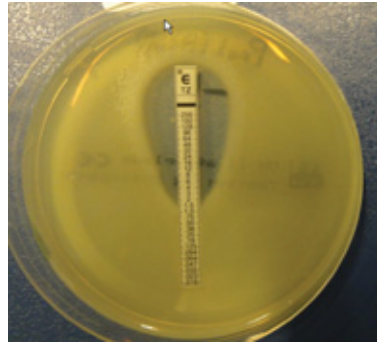


Fig. 2. Antibiotisk følsomhedsbestemmelse. Hæmningszoner omkring discs imprægneret med antibiotikum måles i mm og er udtryk for forskellige grader af følsomhed.

antibiotiske test på de efter dyrkning opnåede renkulturer. I klinisk odontologi er disc-diffusionstest de almindeligt anvendte. Prøven og fortyndinger af denne udsås på hele overfladen af berigede blodagarplader, hvorefter der anbringes discs imprægneret med forskellige antibiotika. Efter passende tids inkubering anaerobt ved 37 °C aflæses væksthæmning som zoner omkring disc'ene, der måles i mm (Fig. 2). Ved en primær antibiotisk test kan flere zoner fremkomme, idet der ofte er tale om en blandingskultur, ligesom der kan forekomme enkeltkolonier i den inderste hæmningszone. Et sådant følsomhedsresultat er foreløbigt, men svar kan afgives hurtigt; en sekundær antibiotisk test, som udføres på renkulturer af de enkelte bakterier, er som omtalt langt mere tidskrævende, men mere klart aflæselig.

Disc-diffusionstest angiver ikke den præcise koncentration af antibiotikum, som er i stand til at hæmme mikrofloraen/bakteriearterne i en prøve; dette bestemmes ved mere komplicerede metoder, hvor der kan opnås oplysning om den mindste hæmmende eller baktericide koncentration af antibiotikum (MIC eller MBC).

Fig. 3. *E-test. Disc-diffusion til direkte aflæsning af MIC-værdi.*



Sådanne kvantitative oplysninger er af værdi for dosering af antibiotikum. Dette anvendes dog ikke normalt i klinisk odontologi, hvor dosering af antibiotikum hviler på resultater af mange klinisk-mikrobiologiske undersøgelser, hvor forskellige doseringer har været undersøgt og sammenholdt med de mikrobiologiske ændringer i den subgingivale plæk. Der er dog nu en kommercielt tilgængelig simpel disc-diffusionsmetode, den såkaldte E-test, som giver mulighed for aflæsning af MIC-værdi (Fig. 3).

Molekylærbiologiske undersøgelser

Disse metoder omfatter påvisning af mikroorganismer vha. genprober. De metoder, som anvendes i forbindelse med klinisk odontologi, omfatter dels PCR-teknikker (polymerase chain reaction), dels hybridiseringsteknikker. Proberne kan være mærkede enkeltstrengede kortere nukleinsyresekvenser af mikroorganismers genomer eller bestå af hele genomet.

Den oprindelige PCR-metode bestod i at påvise en mikroorganisme, hvor måske meget få var til stede i prøven, ved amplificering af den nukleinsyresekvens, som på genomet var afgrænset af korte prober. Senere er en kvantitativ PCR-teknik udviklet - den såkaldte real-time PCR.

Hybridiseringsteknikker med fulde genomprober kan bestemme mange mikroorganismer samtidigt. De er særligt velegnede til prøver fra mundhulen. Med de tidlige metoder kunne der bestem-

mes op til 40 bakteriearter samtidigt (8). Subtyper af bakteriearter kan metoden dog ikke klare. Seneste udvikling er HOMIM (human oral microbe identification microarray) metoden, som kan bestemme op til 300 bakteriearter samtidigt vha. en 16S ribosomal RNA-baseret teknologi. Den anvendes dog foreløbigt kun til forskningsmæssige formål (9).

Mundhulesygdomme

Diagnostikken kan som omtalt have forskellige formål: hjælp til valg af behandling, identifikation af individer med risiko for sygdomsudvikling, kontrol af behandling, prognosevurdering og vurdering af patientens Kooperation i forbindelse med behandling. Hvad førstnævnte angår, består den mikrobiologiske diagnostik først og fremmest i antibiotikumfølsomhedsbestemmelser; hvad de sidste fire nævnte punkter angår, er det især identifikation af sygdomsfremkaldende mikroorganismer og til disse tilknyttede mulige virulensfaktorer eller identifikation af forhold, der har betydning for værtens reaktion mod mikroorganismene, som har interesse. Forudsætningen for at kunne anvende mikroorganismer eller værtsfaktorer er, 1) at disse har en dokumenteret stærk association til sygdomsudvikling, 2) at man råder over målemetoder, som er tilstrækkeligt følsomme og specifikke, samt 3) at disse metoder er let anvendelige i en klinisk sammenhæng.

Caries

Mutansstreptokokker og laktobaciller er de to bakteriegrupper, som man først og fremmest har associeret til cariesaktivitet. Undersøgelser har vist, at mutansstreptokokker især er forøget i plak over "white spot"-læsioner og ved fissurcaries. Der findes dog også undersøgelser, hvor mutansstreptokokker ikke kunne påvises ved hurtigt forløbende caries, ligesom der findes studier, hvor et stort antal mutansstreptokokker kunne påvises uden tilstedeværende

emaljecaries. Dette betyder, at der ikke er evidens for at anvende mutansstreptokokker som cariesaktivitetstest og dermed for at identificere risikoindivider. Forklaring på dette forhold er, at der er mange flere bakterier end mutansstreptokokker, som forekommer i forbindelse med cariesudvikling, samt at mutansgruppen består af mange bakteriearter (10). Ligeledes har man forsøgt at anvende laktobaciller som mål for cariesaktivitet. Undersøgelser har dog vist, at antallet af laktobaciller er relateret til indtagelse af sukker og således en følgebakterie, når der er ubehandlet caries. Der er derfor heller ikke evidens for at anvende laktobaciller til at identificere individer med risiko for udvikling af caries.

Derimod er det muligt hos individer med meget caries med forekomst af mutansstreptokokker og laktobaciller at kontrollere effekten af cariesbehandlingen ved at kunne måle reduktionen/eliminationen af disse bakterier i saliva efter behandling samt om denne effekt er varig. Dette kan anvendes over for patienten pædagogisk i forbindelse med instruktion i mundhygiejne og kostvejledning. Der findes kommercielle testsystemer til måling af mutansstreptokokker og laktobaciller i saliva, som kan anvendes chair-side. Disse test anvender tilgængelige selektive substrater for de to bakteriegrupper. Det selektive substrat til mutansstreptokokker er MSB-agar, som er Mitis-Salivarius-agar, som anvendes til orale streptokokker med tilsætning af bacitracin, som hæmmer vækst af orale streptokokker med undtagelse af mutansstreptokokker. Det selektive substrat til laktobaciller er Rogosa SL-agar, som har et lavt pH på 5,4, hvilket betyder hæmning af vækst af andre bakterier end laktobaciller i salivaprøver.

Aggressiv marginal parodontitis

Det er især de aggressive former for marginal parodontitis, som har tiltrukket sig interesse i forbindelse med mikrobiologisk diagnostik af marginal parodontitis, idet individer med risiko for at udvikle disse former er vigtige at kunne identificere tidligt, og behandlingsresultaterne af konventionel behandling er ofte dårlige.

De bakteriearter, som har interesse i forbindelse med identifikation af risikoindivider, tilhører det røde og det orange plakkompleks samt *A. actinomycetemcomitans*. Det er således en meget kompliceret mikroflora, som er på tale, og dette bliver ikke mindre kompliceret af, at der nu også ved molekylærbiologiske teknikker er påvist mange andre bakteriearter ved aggressiv marginal parodontitis. De forskellige bakteriearter forekommer ofte i små andele af plakfloraen.

Ved prøvetagningen af subgingival plak er der en stor risiko for kontamination fra supragingival plak og saliva. Det er derfor vigtigt ved sådanne mikrobiologiske prøver først at tørlægge prøvetagningsområdet og dernæst omhyggeligt at fjerne al supragingival plak. Herefter tages prøven enten med en gracil curette eller med flere paperpoints, som anbringes i pochen i 15-30 sek. efter hinanden. Prøven anbringes i en anaerob transportvæske, som ikke understøtter vækst af bakterierne i prøven. Prøven transporteres herefter hurtigst muligt til laboratoriet.

Der findes dyrkningsmetoder til identifikation af nogle af de vigtige parodontale patogener i den subgingivale plak. *Porphyromonas*- og *Prevotella*-arter lader sig forholdsvis let identificere efter dyrkning på berigede blodagarplader, hvor kolonierne er sortpigmenterede, og for *Fusobacterium nucleatum* og *A. actinomycetemcomitans* er der udviklet selektive substrater, hvor disse arter efter at være vokset frem fremtræder med meget karakteristiske kolonimormologier.

Endvidere er der udviklet kits, som er baseret på molekylærbiologiske metoder, hvor op til 15 parodontale patogener kan bestemmes, bl.a. *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans* og *T. denticola* (11,12). Et longitudinelt studie med anvendelse af kvantitativ real-time PCR har vist potentialet til identifikation af risikopatienter ved forekomst af *P. gingivalis* og *T. denticola*. En anden PCR-baseret undersøgelse har vist, at bakteriearter tilhørende det røde kompleks sammen med salivære metalloproteinaser kan blive af værdi som prædiktorer i vurdering af sygdomsaktivitet (13). De omtalte undersøgelser er lo-

vende, men vedr. tilgængelige kommercielle kits foreligger der endnu ikke evidens for deres anvendelighed. En aktuel undersøgelse vedr. rutineanalyse af mikrofloraen i subgingival plak fra råder denne mulighed med baggrund i de mange ikke-dyrkbare og ukendte bakterier associeret til marginal parodontitis (14). En ulempe ved de molekylærbiologiske metoder er, at antibiotikumfølsomhedsbestemmelser ikke er mulig.

I forbindelse med evt. anvendelse af antibiotikum som supplement til konventionel parodontal behandling, hvor denne ikke lykkes, har mikrobiologisk diagnostik i form af antibiotikumfølsomhedsbestemmelser en anvendelse, som udføres på oral-mikrobiologiske laboratorier. En nylig opgørelse for 79 patienter på Tandlægeskolen i København, hvor der var blevet udført følsomhedsbestemmelse, viste eksempelvis, som resultat af analysen for 33 patienter, at der var god effekt af amoxicillin + clavulansyre som supplement til konventionel behandling (15).

Identifikation af mulige parodontale patogener, hvor sådanne er konstateret forekommende ved tilfælde af aggressiv parodontitis, kan være til hjælp i monitoreringen af effekten af behandling. Eksempelvis kan reduktion/elimination af *A. actinomycetemcomitans* ved juvenil parodontitis være vejledende i forbindelse med yderligere behandling og intervaller for opfølgende kontrol.

Apikal parodontitis

Endodontiske infektioner er polymikrobielle ligesom for caries og marginal parodontitis. I den inficerede nekrotiske pulpa, dentinkanalerne i den cirkumpulpale dentin og i apikale læsioner forekommer såvel bakterier, som er associeret til caries som til marginal parodontitis. Der er således dominans af Gram-positive fakultative bakterier og anaerobe Gram-negative bakterier. Mikrofloraen er dog ikke så kompleks som for marginal parodontitis, og der er også, som tidligere nævnt, påvist en del ikke-dyrkbare bakterier. Der er ikke påvist specifikke endodontiske patogener i rodkanaler med nekrotisk pulpa og i den apikale læsion. Ved akutte infektioner er der

dog observeret persistens af fx *E. faecalis*. Grundlaget for mikrobiologisk diagnostik i forbindelse med apikal parodontitis er således tvivlsomt, selvom man for år tilbage rutinemæssigt anvendte dette. I enkelttilfælde, hvor der er persisterende infektion med sekretion fra rodkanalen, kan mikrobiologisk diagnostik komme på tale.

Her er prøvetagningsteknikken helt afgørende, idet arbejdsfeltet skal være isoleret fra mundhulen ved kofferdamanlæg afvasket med et antisepticum, og prøvetagningen skal gennemføres med aseptisk teknik. Prøven udtages med 2-3 paperpoints, som placeres i ca. ½ min. i den fugtede rodkanal. Det er vigtigt, at den er fugtet for at få eventuelle bakterier fra dentinkanaler med i prøven. Som for subgingivale plakprøver overføres paperpoints til en anaerob transportvæske, og i laboratoriet gennemføres dyrknings- og identifikationsundersøgelser på tilsvarende vis som ved plakprøver ved marginal parodontitis. Følsomhedsbestemmelser kan udføres over for forskellige antiseptika og antibiotika.

Da rodkanaler kan være bøjede og meget smalle pga. sekundær dentindannelse, kan det være vanskeligt at nå bakterierne ved prøvetagningen. Dette betyder, at man risikerer et falsk negativt resultat. Ligeledes er der altid risiko for et falsk positivt resultat, da muligheden for kontamination under prøvetagning er forholdsvis stor. På baggrund af dette samt ovenstående anvendes mikrobiologisk diagnostik ikke længere rutinemæssigt ved apikal parodontitis.

Andre følgesygdomme

I dette afsnit vil følgende følgeinfektioner til caries og marginal parodontitis blive kort omtalt: abscesser, osteomyelitis og aktinomykose.

Abscesser

Dentoalveolære abscesser er lokaliserede infektiøse tilstande, sædvanligvis med forudgående apikal eller marginal parodontitis. Abscesser kan udvikle sig til flegmoner, som er diffuse sup-

purative infektioner i bindevævet med risiko for betydelig spredning langs fascier. Disse infektioner er også polymikrobielle med dominans af dyrkbare, anaerobe Gram-negative bakterier og fakultative Gram-positive bakterier. Herudover er der forekomst af ikke dyrkbare bakterier. Da der ved disse tilstande kan være påvirket almentilstand med feber, kan antibiotikumbehandling være påkrævet.

Ved prøvetagning til mikrobiologisk diagnostik skal man igen være meget opmærksom på muligheden for kontamination. Området tørlægges, og slimhinden skylles med vand og aftørres herefter grundigt med steril gaze. Pus udtages ved aspiration med steril kanyle og overføres til en anaerob transportvæske. Prøven transporteres hurtigst muligt til laboratoriet. De dyrkningsbaserede mikrobiologiske analyser med vægt på antibiotikumfølsomhedsbestemmelser gennemføres som allerede beskrevet for marginal parodontitis. Som vigtigt supplement hertil er der udviklet en hurtig molekylærbiologisk metode til påvisning af penicillinresistente gener i pusmaterialet, idet flere bakteriearter i blandingsfloraen kan være β -laktamasedannere.

Osteomyelitis

Osteomyelitis kan udvikles som følge af en apikal parodontitis og efter en tandekstraktion. I sådanne tilfælde er der tale om blandingsinfektioner, hvor bakterier, som findes ved apikal og marginal parodontitis, ofte forekommer. Sygdommen kan også være specifik og hidrøre fra andre infektioner, hvor der er udviklet en bakteriemie med *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* eller *Haemophilus influenzae*.

Behandling af osteomyelitis er en hospitalsopgave. Den mikrobiologiske prøve kan være en knoglebiopsi eller en blodprøve. Håndtering af prøven og mikrobiologiske dyrknings- og identifikationsundersøgelser samt antibiotikumfølsomhedsbestemmelse gennemføres som allerede tidligere omtalt.

Aktinomykose

Den cervikofaciale form for aktinomykose udvikles som følge af infektioner i mundhulen, traumer eller ekstraktioner. *Actinomyces*-arter er årsag til sygdommen; hyppigt findes den anaerobe *Actinomyces israelii* med *A. actinomycetemcomitans* som ledsagebakterie. Andre bakteriarter kan forekomme.

Behandling af sygdommen er en hospitalsopgave, og den mikrobiologiske diagnose stilles på grundlag af en pusprøve.

Infektioner i oral mucosa

Infektioner i mundslimhinden opstår oftest hos ældre og/eller svækkede individer, som fx er i immunsuppressiv behandling eller i stråle-/kemoterapi. Infektionen er ofte specifik; de almindeligste bakterielle fund er *Candida*-arter, *S. aureus*, *S. pyogenes*, enterokokker og forskellige tarmbakterier (1).

Den mikrobiologiske diagnose opnås ved at tage en podning med fx en fugtet vatpodepind fra læsionen og overføre prøven til et transportmedium. Ofte anvendes Stuarts Transport Medium, som er et halvflydende, ikke-nærende medium. Den mikrobiologiske diagnostik gennemføres med mikroskopiske og dyrkningsmæssige metoder som tidligere beskrevet.

Oral candidose

Langt hovedparten af infektioner i mundslimhinden skyldes forskellige *Candida*-arter, hvoraf *Candida albicans* er den hyppigste. Andre *Candida*-arter, som kan forårsage orale candidose er *C. tropicalis* og *C. dubliniensis*, som ligner *C. albicans* ganske meget. De tre nævnte arter er de mest virulente blandt *Candida*-arterne. Andre mindre virulente arter er blandt andre *C. glabrata*, *C. krusei* og *C. parapsilosis*. De forskellige *Candida*-arter kan findes ved ovenfor nævnte patientgrupper, men også ved protesestomatitis samt ved infektioner i forbindelse med maligne slimhindeforandringer.

Den almindeligste mikrobiologiske diagnostiske metode ved oral candidose er mikroskopi af et PAS-farvet eller Gram-farvet

udstrygningspræparat af et skrab eller en biopsi af den læderede mundslimhinde. *Candidacellerne* er 4-6 μm store, ovoide, mørkerøde (PAS-) eller blålige (Gram-) celler, evt. med forekomst af hyfer eller pseudohyfer. Ved biopsi kan hyferne evt. ses at være vævsinvaderende. Ønsker man en specifik artsdiagnose og/eller følsomhedsbestemmelse over for antimykotica, må en dyrkningsundersøgelse af prøvematerialet gennemføres. Der findes flere egnede substrater hertil. I klinikken er det hyppigst anvendte det selektive Nickersons agar. En artsdiagnose kan stilles på grundlag af en række sideordnede vækstkarakteristika, fx forekomst af pseudohyfer og sporetyper samt sukkerstofsifte for en række mono-, di- og trisakkarider. En artsdiagnose kan dog også stilles vha. molekylærbiologiske metoder, som er ved at vinde indpas i gærsvampediagnostikken, men dette udelukker så følsomhedsbestemmelse.

LITTERATUR

1. Dahlén G. Microbiological diagnosis in oral diseases. *Acta Odontol Scand* 2006;64;164-8.
2. Kongsrad J. Parodontitis epidemiologi. *Tandlægebladet* 2011;115;640-4.
3. Burt BA, Bælum V, Fejerskov O. The epidemiology of dental caries. I: Fejerskov O, Kidd E, eds. *Dental caries. The disease and its clinical management*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008.
4. Larsen T, Fiehn N-E. Mundhulens mikroflora ved marginal parodontitis. *Tandlægebladet* 2011;115;652-60.
5. Marsh PD, Martin MV. *Oral microbiology*. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2009.
6. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25:134-44.
7. Samaranayake L. *Essential microbiology for dentistry*. 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier; 2006.

8. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 1994;17: 788-92.
9. Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD et al. Comparisons of subgingival profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. *J Periodontol* 2009;80:1421-32.
10. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008;46:1407-17.
11. Dahlén G, Leonhardt A. A new checkerboard panel for testing bacterial markers in periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:6-11.
12. Cosgarea R, Bäumer A, Pretzl B, Zehaczek S, Kim TS. Comparison of two different microbiological test kits for detection of periodontal pathogens. *Acta Odontol Scand* 2010;68:115-21.
13. Ramseier CA, Kinney JS, Herr AE, Braun T, Sugai JV, Shelburne CA et al. Identification of pathogen and host-response markers correlated with periodontal disease. *J Periodontol* 2009;80:436-46.
14. Fernandez y Mostajo M, Zaura E, Crielaard W, Beertsen W. Does routine analysis of subgingival microbiota in periodontitis contribute to patient benefit? *Eur J Oral Sci* 2011;119:259-64.
15. Havemose-Poulsen A. Behandling af aggressiv marginal parodontitis. *Tandlægebladet* 2011;115:734-41.