

Identificatie van bacteriën door middel van DNA-probes*

Samenvatting. Daar men overtuigd is van de microbiële specificiteit van parodontale infecties, is het essentieel een microbiële diagnostische test voorhanden te hebben bij het opstellen van een behandelingsplan. Via de DNA-probe kan men de pathogene bacteriën identificeren en kwantificeren. Deze test maakt gebruik van de DNA-probe-technologie voor het herkennen van unieke segmenten van de volgende bacteriën: *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Wollinella recta*, *Fusobacterium nucleatum* en de spirocheet, *Treponema denticola*.

VANDERFAEILLIE A. Identificatie van bacteriën door middel van DNA-probes. Ned Tijdschr Tandheelkd 1992; 99: 341-2.

A. Vanderfaeillie, LTH

Uit de Eenheid Parodontologie, School voor Tandheelkunde, Mondziekten en Kaakchirurgie, Faculteit Geneeskunde te Leuven, België.

Trefwoorden: **Microbiologie – Parodontologie**

Datum van acceptatie: 21 december 1991.

*Dit artikel is een bewerking van een voordracht gehouden door Prof. H. Eysen tijdens de bijeenkomst van de Nederlandse Vereniging voor Biologie van de Mond d.d. 12 oktober 1990.

Adres: A. Vanderfaeillie, Parodontologie, Capucijnenvoer 7, 3000 Leuven, België.

1 Inleiding

In de parodontologie zijn er verschillende diagnostische tests voorhanden zoals: de kweek, immunologische tests gebaseerd op een antigeen-anti-lichaamreactie, donkerveld- of fasencontrastmicroscopie en, ten slotte, de DNA-probe. Opsporen van bacteriën met de klassieke methoden is vaak een tijdrovend proces. Ook zijn de resultaten sterk afhankelijk van de manier van plaquename, transport en aard van de media. De DNA-probe zou een snelle en gevoelige test zijn.

2 De DNA-probe

Laten we eerst de principes bekijken die ten grondslag liggen aan de DNA-probe analyse. DNA of deoxyribonucleïnezuur vormt de genetische code. Het is de drager van de erfelijke kenmerken die in een individu, een dier, een plant of een bacterie

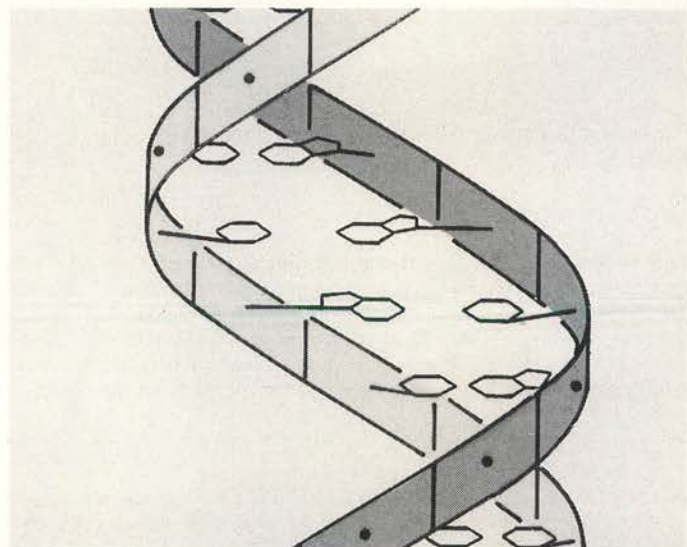
aanwezig zijn. Vroeg in de jaren vijftig vonden Watson en Crick dat de DNA-molecule een dubbele helix is (afb. 1). Dit zijn twee lange om elkaar gewonden nucleotidestangen die bestaan uit een wisselende opeenvolging van vier bouwstenen of deoxyribonucleotiden, namelijk:

- Deoxythymidine.
- Deoxycytidine.
- Deoxyadenine.
- Deoxyguanine.

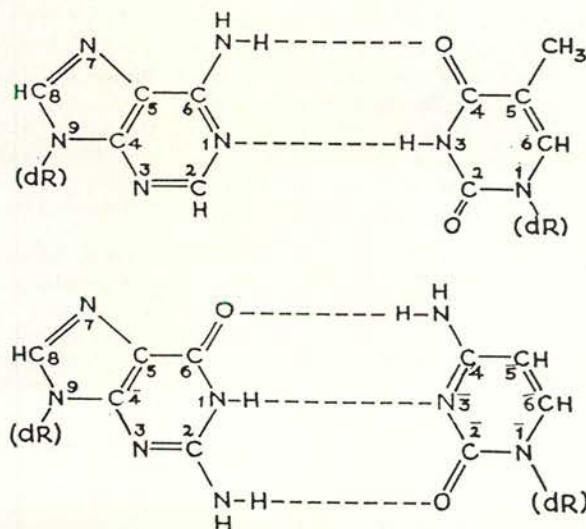
Belangrijk is dat deze nucleotidebasen complementair zijn met de tegenoverliggende base op de andere streng zodat waterstofbruggen gevormd worden en we een binding krijgen tussen de twee strengen (afb. 2). Zo is thymidine complementair met adenine en is cytosine complementair met guanine. De enkelvoudige strengen zullen dientengevolge slechts een dubbele helix vormen of hybridiseren indien de sequentie van de basen complementair is met deze op de andere streng. Wanneer de

dubbele streng gesplitst of gedenuatureerd wordt, dan scheiden deze baseparen zich en ontstaan twee aan elkaar gelijke enkelvoudige strengen.

De sequentie van nucleïnezuuren op de DNA-ketens van verschillende doch nauwverwante bacteriën kan zeer gelijkend zijn. Toch heeft elke bacterie in haar genoom een of meer nucleotide sequenties die uniek zijn voor haar soort. Op dit principe is de DNA-probe gebaseerd. Om een probe te ontwikkelen wordt uit het DNA een voor die bepaalde bacteriesoort kenmerkend fragment geïsoleerd. Dit deeltje wordt ingebouwd in een vector, bijvoorbeeld een plasmide (= het klonen van het gen). Deze gewijzigde vector wordt opnieuw in zijn gastheer cel gebracht, bijvoorbeeld in *E. Coli*, en zal zich met de gastheer cel vermenigvuldigen. Aldus verkrijgt men via cloning een grote hoeveelheid van dat ene representatieve fragmentje DNA. Wanneer men dit fragmentje opnieuw isoleert en denatureert, ontstaat de enkelstrengige probe.



Afb. 1. De DNA-molecule is een dubbele helix. Dit zijn twee lange om elkaar gewonden nucleotidestangen.



Afb. 2. Een binding tussen beide strengen wordt verkregen via waterstofbruggen. Thymidine is steeds complementair met adenine; cytosine is complementair met guanine.

3 De toepassing

Een plaquemonster dat de te onderzoeken micro-organismen bevat moet eerst een behandeling ondergaan voordat het met de probe kan reageren. De cellen ondergaan lysis door het gebruik van enzymen, detergenten of alkali om het DNA van de niet-DNA-componenten te scheiden. Het DNA wordt op die manier geïsoleerd uit de cellen in zijn dubbelstrengige vorm.

Door het preparaat op te warmen bij 95° C wordt het DNA gedenuatureerd tot enkelvoudige stengen zodat men ermee kan bepalen in hoeverre ze de beschikbare probes binden, dat wil zeggen er dubbelstrengige DNA mee vormen. Daartoe wordt het te onderzoeken DNA, hetzij in oplossing hetzij gebonden aan een vaste drager (bijv. een filtermembraan of glazen pareltjes), in contact gebracht met de probe. Na voldoende reactietijd (voor een korte probe van 20 à 40 baseparen is dit 30 min. voor lange probes kan dit tot 60 min. oplopen) verkrijgt men de maximale hybridisatie. De reactievoorwaarden, zoals temperatuur, PH, zoutconcentratie, enz. worden dusdanig gekozen dat alleen sterk complementaire (in dit geval de representatieve) fragmenten hybridiseren. Bij goede complementariteit bedraagt de binding meestal meer dan 90% en worden stabiele complexen gevormd die zonder veel verlies kunnen worden gewassen en gezuiverd; minder complementaire complexen dissociëren hierbij en worden samen met niet gebonden proberesten weggewassen.

Bij dit alles rijzen wel enkele problemen. De minuscule kleine stukjes DNA van de probe zijn niet te detecteren tenzij ze op een of andere manier gemerkt worden, in de meeste gevallen met radioactief fosfor (P32) of met een enzym dat een meetbare kleurreactie ontwikkelt na het toevoegen van het substraat. De gebonden radioactiviteit of de intensiteit van de kleurreactie geven een aanduiding over de hoeveelheid bacteriën in het plaquemonster. Een tweede moeilijkheid is dat het op te sporen DNA soms in zo geringe hoeveelheid aanwezig is dat het zelfs aan de detectiemogelijkheid van deze toch zeer gevoelige test dreigt te ontsnappen. Desnoods kan men het afgenomen DNA 'vermenigvuldigen' alvorens de DNA-probe eraan toe te voegen. Men kan dit bereiken door middel van de PCR of Polymerase Chain Reaction.

4 De 'Polymerase Chain Reaction' (PCR)

In de PCR brengt men het geëxtraheerd bacterieel DNA na denaturatie (enkelstrengig maken) en toevoegen van de nodige 'primers' in contact met een mengsel van deoxyribonucleotiden plus DNA-polymerase. Dit laatste maakt dan een aantal

nieuwe kopieën aan van de reeds aanwezige DNA-fragmenten. Men verkrijgt aldus meer testmateriaal waarbij dan de DNA-probe gevoegd kan worden.

Praktisch gezien gaat men als volgt te werk. Men maakt eerst de tand supragingivaal plaquevrij en men absorbeert het speeksel met een wattenrolletje. Vervolgens neemt men een monster van de tandplaque door middel van een papieren kegeltje dat men gedurende tien seconden in de pocket laat, waarna het in een plastic tube hermetisch wordt afgesloten en naar het laboratorium wordt opgezonden.

Commercieel zijn er in de parodontologie probes voorhanden onder de naam van DMDx-test. Zo zijn er probes ontwikkeld voor zeven bacteriën, namelijk:

- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
- *Bacteroides intermedius*
- *Bacteroides gingivalis*
- *Eikenella corrodens*
- *Wollinella recta*
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Treponema denticola*.

5 Voor- en nadelen van de toepassing van de DNA-probe

Tot besluit kunnen we de voor- en nadelen van de DNA-probe analyse bekijken. De voordelen zijn:

- De procedure van het nemen van plaquemonsters is eenvoudig.
- De DNA-probe vereist geen levende bacteriën, dit in tegenstelling tot de andere technieken. De plaquemonsters kunnen drie maanden worden bewaard.
- Uit de studie van Savitt et al blijkt dat de DNA-probe een veel gevoeliger test is dan kweken.¹ Zij vonden dat bij eenzelfde plaquemonster pathogenen ontdekt werden via de DNA-probe terwijl deze niet ontdekt werden met kweken. Ook bleek er een correlatie te bestaan tussen

de met de DNA-probe ontdekte bacteriën en de klinische symptomen.

De nadelen zijn:

- Er kan slechts een beperkt aantal soorten bacteriën ontdekt worden met de DNA-probe-analyse. Zo blijkt uit het artikel van Baer en Iacono, dat Socransky de DNA-probe een misleidende test vindt en dat hij het betreurt dat deze test de goedkeuring heeft gekregen van de ADA.² Driehonderd soorten bacteriën kunnen de oorzaak zijn van parodontitis. Het is dus niet zo dat wanneer de DNA-probe analyse negatief is, er misschien toch geen infectieus proces aan de gang is.
- In een plaquemonster moeten minstens 1000 bacteriën aanwezig zijn voordat de test positief scoort. Bij minder dan 1000 bacteriën kan de PCR een uitweg bieden.
- Baer en Iacono beweren tevens dat de resultaten beïnvloed worden door de hoeveelheid plaque. Indien er zeer veel plaque is, is het mogelijk dat de pathogene bacteriën gedilueerd worden door de niet-pathogene bacteriën. De pathogenen worden wel eens gemist indien er weinig plaque is of indien de plaque op de verkeerde plaats genomen wordt.
- DNA-probe-analyse is momenteel zeer kostbaar. Voor het onderzoek van een plaquemonster wordt 40 dollar gevraagd.

6 Conclusie

Als algemeen besluit kunnen we stellen dat de DNA-probe-analyse niet de volmaakte diagnostische test is. Ideaal zou zijn de verschillende testen te combineren om tot een betrouwbaar resultaat te komen. Maar financieel en praktisch zal dat niet haalbaar blijken te zijn.

Summary

IDENTIFICATION OF MICRO-ORGANISMS IN PERIODONTAL DISEASES: THE USE OF DNA-PROBES

Key words: Periodontology – Oral microbiology

Since the microbial specificity of periodontal diseases is well established, having a valid microbial diagnostic test is essential for a correct and a coherent treatment planning. DNA probe will be used to identify and quantify the oral pathogens, most commonly associated with periodontitis. This test utilizes innovative DNA probe technology to identify unique segments of DNA in each of the following bacteria: *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Wollinella recta*, *Fusobacterium nucleatum* and the spirochete, *Treponema denticola*.

Literatuur

¹SLAVITT ED, STRZEMPKO MN, VACCARO KK, PEROS WJ, FRENCH CK. Comparison of cultural methods and DNA probe analysis for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. *J. Periodontol* 1988; 59: 431-8.

²BAER PN, IACONO VJ. The DMDx test for periodontitis: a misnomer. *J Pedodontics* 1989; 13: 68-9.