

## ИДЕНТИФИКАЦИЈА ПАРОДОНТОПАТОГЕНИХ МИКРООРГАНИЗАМА РСР ТЕХНИКОМ

Радован МИЛИЋЕВИЋ<sup>1</sup>, Гаврило БРАЈОВИЋ<sup>2</sup>, Наташа НИКОЛИЋ-ЈАКОБА<sup>3</sup>,  
Бранка ПОПОВИЋ<sup>4</sup>, Душан ПАВЛИЦА<sup>5</sup>, Војислав ЛЕКОВИЋ<sup>3</sup>, Јелена МИЛАШИН<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Дечја клиника, Клинички центар Ниш, Ниш;

<sup>2</sup>Институт за физиологију, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд;

<sup>3</sup>Клиника за пародонтологију и оралну медицину, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд;

<sup>4</sup>Институт за хуману генетику, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд;

<sup>5</sup>Институт за микробиологију, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд

### КРАТАК САДРЖАЈ

**Увод** Епидемиолошки подаци из читавог света указују на велику распрострањеност гингивитиса и пародонтопатије, обољења потпорног апарата зуба. У етиопатогенези обољења пародонцијума кључну улогу играју различити родови Грам-негативних бактерија, понајвише стриктних анаероба.

**Циљ рада** Циљ рада је био да се испита постојање генома главних пародонтопатогених микроорганизама – *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* и *Prevotella intermedia* – у различитим узорцима пореклом из усне дупље пацијената с клинички дијагностикованом пародонтопатијом.

**Метод рада** Као биолошки материјал у којем је доказивано постојање ДНК микроорганизама коришћени су зубни плак, ткиво запаљене гингиве и пљувачка. За откривање бактеријског генома примењена је мултиплекс техника реакције ланчаног умножавања (енгл. *polymerase chain reaction – PCR*), односно симултана амплификација гена две различите бактерије.

**Резултати** С мањом или већом учесталашћу, у свим испитаним узорцима утврђено је постојање пародонтопатогених микроорганизама. У зубном плаку особа оболелих од пародонтопатије најчешћи је био геном врсте *Treponema denticola*. У ткиву пародонцијума откривено је у највећем проценту постојање генома врста *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola*, што је одлика хроничног облика пародонтопатије, а у пљувачки испитаника доминирале су *Treponema denticola* и *Eikenella corrodens*. Најмање укупно постојање бактерија је запажено у пљувачки.

**Закључак** Примењени метод *PCR* има велику осетљивост и специфичност. Брзо и прецизно откривање микроорганизама је веома важно за правовремено дијагностиковање инфекције, а самим тим и за превенцију и лечење пародонтопатије. У свакодневној клиничкој пракси оптималан биолошки материјал за доказивање пародонтопатогена код особа оболелих од пародонтопатије је зубни плак, који се сматра поузданим показатељем заступљености појединих бактерија у оболелом пародонцијуму.

**Кључне речи:** зубни плак; пљувачка; пародонцијум; пародонтопатогени микроорганизми; *PCR*

### УВОД

Епидемиолошки подаци из читавог света указују на велику распрострањеност гингивитиса и пародонтопатије, обољења потпорног апарата зуба. Сматра се да су ово, поред каријеса, најчешћа обољења код људи, јер се дијагностикују код већине одраслих особа, али и код једне трећине деце. Запаљењска обољења пародонцијума главни су узрок губитка зуба после четрдесет пете године [1].

Зубни плак, чији најзначајнији део чине микроорганизми, главни је етиолошки фактор настанка обољења потпорног апарата зуба [1]. Патогена активност бактерија зубног плака, отпорност организма домаћина и системски и локални фактори ризика доприносе настанку и развоју обољења пародонцијума [2].

У здравом пародонцијуму највише је Грам-позитивних микроорганизама, док током развоја пародонтопатије доминацију преузимају Грам-негативне, претежно стриктно анаеробне врсте, мада могу да се јаве и тзв. факултативни анаероби [3, 4]. Посебно се својим пародонтопатогеним потенцијалом истичу

следеће бактерије: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* и *Eikenella corrodens*. Свака од ових врста располаже великим бројем фактора вируленције (делови ћелијске грађе, агресивни ензими, егзотоксини и ендотоксини), помоћу којих доприноси настанку и развоју обољења потпорног апарата зуба. Приликом поремећаја хомеостазе пародонтног ткива ове врсте испољавају свој патогени потенцијал, изазивајући обољење. Бактерије и њихови производи стимулишу запаљење, што доводи до повишеног ослобађања проинфламаторних медијатора, као што су цитокини и простагландини, који делују штетно на пародонтно ткиво [5, 6].

### ЦИЉ РАДА

Циљ рада је био да се применом технике *PCR* (енгл. *polymerase chain reaction – реакција ланчаног умножавања*) препознају најчешће пародонтопатогене бактерије (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*,

ТАБЕЛА 1. Секвенце прајмера за откривање микроорганизама, специфичне температуре хибридизације и дужина очекиваних ампликона.  
TABLE 1. Sequences of specific primers used for PCR, annealing temperatures and size of expected PCR products.

Микроорганизам Microorganism	Секвенце прајмера Sequences of specific primers	Специфична температура хибридизације Annealing temperatures	Дужина очекиваних ампликона Size of expected PCR products
<i>P. gingivalis</i>	CAA TAC TCG TAT CGC CCG TTA TTC	55°C	400 bp
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	CAC TTA AAG GTC CGC CTA CGT GC	55°C	600 bp
<i>T. forsythia</i>	GTA GAG CTT ACA CTA TAT CGC AAA CTC CTA	53°C	840 bp
<i>P. intermedia</i>	GTT GCG TGC ACT CAA GTC CGC C	53°C	660 bp
<i>E. corrodens</i>	CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA G CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C	55°C	800 bp
<i>T. denticola</i>	TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	60°C	316 bp

ТАБЕЛА 2. Температурни профил PCR.  
TABLE 2. Cycling profiles for PCR reactions.

Почетна денатурација Initial denaturation	35 циклуса (три корака) / 35 cycles (three steps)			Крајња елонгација Final extension
	Денатурација Denaturation	Хибридизација Annealing	Елонгација Extension	
3 min. 95°C	1 min. 94°C	1 min. 55-60°C	1-1.30 min. 72°C	7 min. 72°C

*T. denticola*, *T. forsythia*, *P. intermedia*) и утврди њихова заступљеност у различитим узорцима материјала прикупљеним од пацијената с клинички дијагностикованом пародонтопатијом.

## МЕТОД РАДА

У истраживање је укључено 90 пацијената са дијагнозом пародонтопатије који су лечени у Клиници за пародонтологију и оралну медицину Стоматолошког факултета Универзитета у Београду. Као извор материјала за анализу коришћени су узорци зубног плака (од 35 пацијената), запаљеног ткива гингиве (од 25 пацијената) и нестимулисана пљувачке (од 30 пацијената). Зубни плак прикупљан током уклањања зубног каменца и ткиво гингиве узето после хируршке интервенције стављани су у стерилне епендорф-епрувете уз додавање 50-100  $\mu$ l стерилне дејонизоване воде. Нестимулисана пљувачка (1-2 ml) такође је прикупљана у стерилне епрувете и затим центрифугирана при брзини од 3.000 обртаја у минути. Изолација евентуално присутне бактеријске ДНК вршена је третирањем узорка протеиназом К на температури од 56°C током 30 минута, након чега је следила инактивација ензима загревањем узорка на температури од 94°C током 15 минута. Тако припремљени материјал чуван је на 20°C до PCR анализе.

Узорци зубног плака и ткива гингиве су испитани на постојање микроорганизама *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *E. corrodens* и *T. denticola*, док су у узорцима пљувачке последње бактерије изостављене. За примену PCR технике коришћене су познате секвенце прајмера. Мултиплекс PCR техника, која омогућава симултану амплификацију различитих генских секвенци уз коришћење неколико парова прајмера, употребљена је за откривање *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans*.

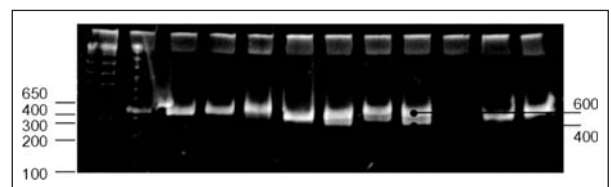
Овом техником одређен је и пар бактерија *P. intermedia* и *T. forsythia*. Стандардном техником PCR, која подразумева коришћење једног пара прајмера, идентификоване су у засебним реакцијама *E. corrodens* и *T. denticola*. Секвенце свих прајмера и дужине очекиваних ампликона приказане су у табели 1.

PCR је рађена у запремини од 25  $\mu$ l, а реакциона смеша је била следећег садржаја: стерилна вода, PCR пуфер, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTP, 5  $\mu$ M прајмери, 0,1 U Taq полимеразе, 4  $\mu$ l узорка с претпостављеном бактеријском ДНК. Температурни профил извођења PCR приказан је у табели 2.

Производи PCR анализирани су електрофорезом на 8% полиакриламидном гелу у једном TBE пуферу, при константном напону струје од 200 V током 60 минута. За визуелизацију амплификованих фрагмената ДНК, гел је бојен етидијум-бромидом и осветљен УВ трансилуминатором.

## РЕЗУЛТАТИ

Постојање електрофоретских трака очекиване дужине на гелу означавало је позитиван налаз (Слика 1). Процент позитивних узорка на једну бактерију или више њих био је: 94,1% (33 пацијента од 35) у групи зубних плакова, 64% (16 од 25 пацијената) у групи гингивног ткива и 53,3% (16 од 30 пацијената) у гру-



СЛИКА 1. Полиакриламидни гел са тракама које одговарају *P. gingivalis* (400 bp) и *A. actinomycetemcomitans* (600 bp).  
FIGURE 1. Polyacrilamide gel with bands corresponding to *P. gingivalis* (400 bp) and *A. actinomycetemcomitans* (600 bp).

ТАБЕЛА 3. Заступљеност различитих сојева бактерија у биолошком материјалу.  
TABLE 3. Distribution of different types of bacteria in biological materials.

Врста бактерије Bacterial species	Зубни плак Dental plaque (N=35)	Ткиво пародонцијума Periodontal tissue (N=25)	Пљувачка Saliva (N=30)
<i>P. gingivalis</i>	28.5%	12%	3.3%
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	22.7%	12%	6.7%
<i>E. corrodens</i>	31.4%	4%	36.7%
<i>T. denticola</i>	77.1%	28%	40%
<i>T. forsythia</i>	37.1%	32%	-
<i>P. intermedia</i>	31.4%	12%	-

ТАБЕЛА 4. Број испитаника „позитивних“ на различите бактерије.  
TABLE 4. Number of positive patients in relation to different types of bacteria.

Број испитаника Number of patients	Зубни плак Dental plaque (N=35)	Ткиво пародонцијума Periodontal tissue (N=25)	Пљувачка Saliva (N=30)
Укупан број „позитивних“ Total number of positive	33 (94.1%)	16 (64%)	16 (53.3%)
„Позитивни“ на једну бактерију Positive for one bacteria	13 (37.1%)	9 (36%)	8 (26.7%)
„Позитивни“ на две бактерије Positive for two bacteria	7 (20%)	5 (20%)	7 (23.3%)
„Позитивни“ на три бактерије Positive for three bacteria	8 (22.8%)	2 (8%)	1 (3.3%)
„Позитивни“ на четири бактерије Positive for four bacteria	5 (14.2%)	-	-

пи узорака пљувачке. У зубном плаку доминирала је *T. denticola* (77%), у ткиву гингиве, поред *T. denticola* (28%), у релативно високом проценту откривена је и *T. forsythia* (32%), док су у пљувачки најчешће биле *T. denticola* (40%) и *E. corrodens* (36,7%). Резултати по типовима испитиваних бактерија и коришћеног биолошког материјала приказани су у табели 3. Упоредни преглед заступљености пародонтопатогена у све три врсте материјала узетог од пацијената с пародонтопатијама дат је у табели 4.

## ДИСКУСИЈА

Ово истраживање је први покушај анализе заступљености различитих сојева пародонтопатогених микроорганизама код особа оболелих од пародонтопатије у нашој популацији применом метода PCR. Без обзира на то што је дуго година познато који су микроорганизми најчешће одговорни за настанак обољења потпорног апарата зуба, њихова учесталост може да показује географске, етничке и расне варијације, као и промене зависне од начина одржавања оралне хигијене, специфичности животних навика исхране, конзумирања алкохола и дувана и др.

У анализираном материјалу *T. denticola* је била најчешћа бактерија, која је откривена у чак 77% узорака зубног плака који су прикупљени од пацијената с клинички дијагностикованом пародонтопатијом. Ови резултати су у складу с подацима из литературе за различите делове света. Тако су, на пример, Такеуши (*Takeuchi*) и сарадници [7] открили *T. denticola* у зубном плаку више од 70% испитаника оболелих од пародонтопатије у јапанској популацији. Слично томе, у радовима Сикеире Млађег (*Siqueira Jr*) и Рокаса (*Rocas*) [8] ове оралне спи-

рохете су код запаљењских обољења пародонтних ткива у бразилској популацији изоловане у 78% случајева.

У 28% узорака ткива пародонцијума испитаника нашег истраживања такође је откривена *T. denticola*, што се објашњава чињеницом да геном ове врсте, захваљујући стварању протеаза, може инфицирати ћелије меких ткива гингивног сулкуса, односно пародонтног џепа [9]. Питерс (*Peters*) и сарадници [10] су доказали да оралне трепонеме могу директно продрићи у ћелије епитела гингивног сулкуса, гингивног џепа, односно пародонтног џепа, а не само да се налазе у биофилму на површини зуба. Треба поменути да су нека истраживања обављена последњих година у свету показала да не постоји директна корелација између квантитативне заступљености врсте *T. denticola* и степена изражености клиничких симптома, али је поуздано доказано њено учешће у настанку и развоју обољења пародонтног ткива [11].

Код скоро једне трећине (28,5%) узорака зубног плака у нашем истраживању доказан је геном врсте *P. gingivalis*. Овај налаз је у складу с резултатима студија које су се бавиле овом проблематиком и које указују на значајно учешће ове врсте у етиопатогенези пародонтопатија [12]. Постојање генома врсте *A. actinomycetemcomitans*, етиолошког узрочника локализоване јувенилне пародонтопатије и учесника у развоју пародонтопатије код одраслих особа, забележено је у 22,8% узорака зубног плака; ови налази су такође у складу с резултатима студија других аутора [13, 14]. Испитивања особа с клинички здравим пародонцијумом показала су да је постојање ове врсте у узорцима зубног плака незнатно (око 2%) [15].

За разлику од зубног плака, у узорцима ткива запаљене гингиве доказано је мање присуство врста *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans* (12%). Ово се мо-

же објаснити чињеницом да је овде реч о врстама које немају изражену особину инвазивности, односно способности размножавања у ткивима. У узорцима пљувачке геном врста *P. gingivalis* и *A. actinomycetemcomitans* забележен је у врло малом проценту, што се може тумачити спирајућим ефектом пљувачке и заступљеношћу супстанци с антимикробним деловањем у њој. Резултати који су у сагласности с нашим налазима добијени су и у истраживању Онишија (*Ohnishi*) [16]. Истраживања која су обављена у свету углавном су показала малу учесталост ових врста код особа с клинички здравим пародонтним ткивом [7].

У зубном плаку особа укључених у наше истраживање геном *E. corrodens* доказан је у 31,4% случајева, док је његов позитиван налаз у ткиву пародонцијума био свега 4%. У истраживању Мулалија (*Mullally*) и сарадника [13] ова Грам-негативна бактерија је изолована код 42,2% одраслих особа оболелих од пародонтопатије. Иначе, она припада групи пародонтопатогена с израженим степеном вируленције, а откривена је и у екстраоралним инфекцијама, као што је ендокардитис.

Однедавно се сматра да врста *T. forsythia* такође има значајну улогу у настанку и развоју обољења пародонцијума [8]. И овде је у питању Грам-негативни, стриктно анаеробни бацил, који постоји у зрелом зубном плаку и дубоким пародонтним џеповима. У ткиву гингиве и зубном плаку испитаника нашег истраживања геном *T. forsythia* је забележен у високом проценту, што говори у прилог чињеници да је ова врста снабдевена великим бројем различитих фактора вируленције који јој дају изразити пародонтопатогени потенцијал [17, 18]. Осим *T. forsythia*, и геном врсте *P. intermedia* показује релативно високу учесталост у испитиваним узорцима. Неки аутори сматрају да ове две врсте делују синергистички [13].

У сва три испитивана биолошка материјала утврђено је значајно постојање пародонтопатогених микроорганизама, а забележене учесталости појединих бактерија се уклапају у релативно широке опсеге фреквенција које нуди светска литература. Доказивање постојања пародонтопатогених микроорганизама у пародонтним ткивима доприноси прецизнијој дијагнози, одређивању терапије и прогнози даљег тока обољења пародонцијума. Лечење пародонтопатије је значајно и у превенцији неких системских болести, посебно обољења кардиоваскуларног система. Поједине врсте пародонтопатогених микроорганизама доведене су у директну везу с атеросклерозом, а њихово присуство доказано је у атероматозном плаку крвних судова. За откривање бактерија могуће је користити технику *PCR* јер је она, у односу на стандардне микробиолошке анализе, веома осетљива, специфична и брза.

## ЗАКЉУЧАК

Са становишта примене резултата *PCR* анализе оралне микрофлоре у клиничкој пракси, зубни плак

је најпоузданији показатељ заступљености појединих бактерија у оболелом пародонцијуму. Овај метод се може применити у епидемиолошким студијама, дијагностиковању, надзору и искорењивању пародонтопатогених микроорганизама.

## ЗАХВАЛНИЦА

Овај рад финансиран је средствима пројекта број 1454042 Министарства за науку и заштиту животне средине Републике Србије.

## ЛИТЕРАТУРА

- Đajić D, Đukanović D, Stanić S, Kovačević K. Bolesti usta, parodontologija, atlas. Beograd: Elit Medica; 2001.
- Samaranayake LP. Essential Microbiology for Dentistry. Philadelphia: Elsevier Ltd.; 2002.
- Beikler T, Schnitzer S, Abdeen G, Ehmke B, Eisenacher M, Flemmig TF. Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. J Periodontol 2006; 77(8):1323-32.
- Rudney JD, Chen R, Pan Y. Endpoint quantitative PCR assays for *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobaculum actinomycetemcomitans*. J Periodontol Res 2003; 38:465-70.
- Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. Oral Microbiol and Immunol 2004; 19:71-6.
- Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. Oral Microbiol and Immunol 2003; 18:285-92.
- Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y, Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. J Periodontol 2001; 72(10):1354-63.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN. *Bacteroides forsythus* in primary endodontic infections as detected by nested PCR. J Endod 2003; 29:390-3.
- Okuda K, Ishihara K, Nakagawa T, Hirayama A, Inayama Y, Okuda K. Detection of *Treponema denticola* in atherosclerotic lesion. J Clin Microbiol 2001; 39:1114-7.
- Peters S, Valdez M, Rivere R, Thomas DD. Adherence to and penetration through endothelial cells by oral treponemes. Oral Microbiol Immunol 1999; 14:379-3.
- Jung IY, Choi BK, Kum KY, et al. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. J Endod 2000; 26:599-4.
- Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by Polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. Oral Microbiol Immunol 2005(5); 20:289-95.
- Mullally BH, Dace B, Shelburne CE, Wolff LF, Coulter WA. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. J Periodontol Res 2000; 35(4):232-41.
- Taylor-Robinson D, Aduse-Opoku J, Sayed P, Slaney J.M, Thomas BJ, Curtis MA. Oro-dental bacteria in various atherosclerotic arteries. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21:755-7.
- Malheiros Vde J, Avila Campos MJ. Detection of pathogens from periodontal lesions. Rev Saude Publica 2004; 38(5):723-8.
- Ohnishi M. Quantitative analysis of periodontal pathogens in aggressive periodontitis patients in Japanese population. Kokubyo Gakkai Zasshi 2006; 73:70-8.
- Feng XH, Zhang L, Meng HX, Xu L, Chen ZB, Shi D. Prevalence of putative periodontal microorganisms in Chinese patients with aggressive periodontitis. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi 2006(6); 41:344-7.
- Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. J Clin Periodontol 2001; 28:576-82.

## IDENTIFICATION OF PERIODONTOPATHOGEN MICROORGANISMS BY PCR TECHNIQUE

Radovan MILIĆEVIĆ<sup>1</sup>, Gavriilo BRAJOVIĆ<sup>2</sup>, Nataša NIKOLIĆ-JAKOBA<sup>3</sup>,  
Branka POPOVIĆ<sup>4</sup>, Dušan PAVLICA<sup>5</sup>, Vojislav LEKOVIĆ<sup>3</sup>, Jelena MILAŠIN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Childrens' Hospital, Clinical Centre of Niš, Niš;

<sup>2</sup>Department of Physiology, School of Dentistry, University of Belgrade, Belgrade;

<sup>3</sup>Department of Periodontology and Oral Medicine, School of Dentistry, University of Belgrade, Belgrade;

<sup>4</sup>Department of Human Genetics, School of Dentistry, University of Belgrade, Belgrade;

<sup>5</sup>Department of Microbiology, School of Dentistry, University of Belgrade, Belgrade

**INTRODUCTION** Periodontitis is an inflammatory disease of the supporting tissues of teeth and is a major cause of tooth loss in adults. The onset and progression of periodontal disease is attributed to the presence of elevated levels of a consortium of pathogenic bacteria. Gram negative bacteria, mainly strict anaerobes, play the major role.

**OBJECTIVE** The present study aimed to assess the presence of the main types of microorganisms involved in the aetiopathogenesis of periodontal disease: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* and *Prevotella intermedia* in different samples collected from the oral cavity of 90 patients diagnosed with periodontitis.

**METHOD** Bacterial DNA detection was performed in diverse biological materials, namely in dental plaque, gingival tissue and saliva, by means of multiplex PCR, a technique that allows simultaneous identification of two different bacterial genomes.

**RESULTS** In the dental plaque of the periodontitis patients, *Treponema denticola* dominated. In the gingival tissue, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* were the microbiota most

frequently detected, whilst in saliva *Treponema denticola* and *Eikenella corrodens* were found with the highest percentage.

**CONCLUSION** The identification of microorganisms by multiplex PCR is specific and sensitive. Rapid and precise assessment of different types of periodontopathogens is extremely important for early detection of the infection and consequently for the prevention and treatment of periodontal disease. In everyday clinical practice, for routine bacterial evaluation in patients with periodontal disease, the dental plaque is the most suitable biological material, because it is the richest in periodontal bacteria.

**Key words:** dental plaque; saliva; periodontal tissue; periodontopathogens; PCR

Jelena MILAŠIN  
Stomatološki fakultet  
Univerzitet u Beogradu  
Dr Subotića 8, 11000 Beograd  
Tel.: 011 2644 943  
E-mail: jelena\_milasin@yahoo.com