Analiza promjena mikrobiote usne šupljine bolesnika prije i nakon transplantacije bubrega

Levarda Hudolin, Katarina

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:012329

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository

1. UVOD

1. UVOD

U uvodu će biti riječi o osnovnim pojmovima koji su predmet ove disertacije.

Dijalizom se liječe bolesnici s terminalnom bubrežnom insuficijencijom (TBI), međutim velika većina bolesnika koji su na dijalizi želi transplantaciju bubrega, jer ona predstavlja najbolju metodu liječenja TBI. Prva uspješna transplantacija bubrega napravljena je prije više od 70 godina u Bostonu u Sjedinjenim Američkim Državama i od tada broj transplantacija u svijetu raste. Za uspjeh transplantacije vrlo je važna imunosupresivna terapija (terapija koja sprječava odbacivanje transplantiranog bubrega), međutim ona ima i određenih negativnih posljedica po organizam. Naime, imunosupresivna terapija smanjuje otpornost organizma prema mikroorganizmima, te povećava vjerojatnost infekcija, ali i nekih drugih bolesti.

Mikroorganizmi su jedan od najvažnijih uzročnika morbiditeta i mortaliteta, kako opće populacije tako i bolesnika koji su na dijalizi, odnosno bolesnika koji su imali transplantaciju bubrega. Usna šupljina sadrži velik broj različitih mikroorganizama, od kojih neki čine njezinu normalnu mikrobiotu i bezopasni su, drugi mogu uzrokovati bolesti pod određenim okolnostima, a neki su dokazani patogeni, ne samo za usnu šupljinu nego i za organizam u cjelini.

U ovom radu istražili smo mikroorganizme u usnoj šupljini kod bolesnika s TBI, odnosno kod bolesnika koji su imali transplantaciju bubrega. Za identifikaciju mikroorganizama koristili smo matricom potpomognutu ionizaciju laserskom desorpcijom s vremenskim proletom i masenim spektrometrom, engl. „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry“ (MALDI-TOF MS). Radi se o vrlo preciznoj i relativno neselektivnoj metodi kojom se može identificirati veliki broj različitih mikroorganizama koje je prethodno potrebno kultivirati na krutoj podlozi.

Usporedili smo naše rezultate (izolate) s oralnom higijenom, oralnim zdravljem i oralnim statusom, kao i s imunosupresivnom terapijom, antibioticima i šećernom bolesti. Pokazali smo da se mikroorganizmi u ustima mijenjaju nakon transplantacije bubrega. Naime broj pojedinih vrsta mikroorganizama raste, a nekih opada, ali nismo našli statistički značajnu povezanost između mikroorganizama i oralne higijene te oralnog statusa kao i vrste imunosupresivne terapije, upotrebe antibiotika i šećerne bolesti. U raspravi smo usporedili naše rezultate s do sada objavljenim rezultatima u literaturi, kao i naveli njihova objašnjenja u korelaciji s rezultatima drugih istraživača. Na kraju smo zaključili da naši rezultati predstavljaju novi

doprinos poznavanju mikrobiološkog sastava usne šupljine kao takve, a posebno kod bolesnika s TBI, odnosno s transplantiranim bubregom, što je za njih vrlo važno.

1.1. Dijaliza i transplantacija bubrega

1.1.1. Dijaliza

Kolff je 1944. godine, otkrićem uređaja za hemodijalizu (HD) postavio osnovu za liječenje bolesnika s TBI.[1] Zbog tehničkih ograničenja, ova metoda nije ušla u široku primjenu sve do 1966. godine kada su Cimino i Brescia napravili prvi odgovarajući pristup za hemodijalizu, odnosno kada su napravili arteriovensku fistulu (AVF).[2] Danas je AVF najčešći i najbolji pristup za hemodijalizu, mada se HD može provoditi i korištenjem graftova, odnosno centralnih venskih katetera (Tesio® i Hickman®). AVF se najčešće radi na distalnom, odnosno proksimalnom dijelu podlaktice nedominantne ruke (slika 1). Sam zahvat se izvodi u lokalnoj anesteziji, preko dnevne bolnice i traje oko 1 sat.



Slika 1. Arteriovenska fistula na proksimalnom dijelu podlaktice (Arhiva, Klinika za urologiju, KBC Zagreb).

Pored svojih prednosti AVF ima i određene nedostatke. Naime kod značajnog broja bolesnika (i do 50%), AVF se ili ne može napraviti ili se napravi, ali se ne razvije dovoljno (ne maturira).[3] Stenoza i tromboza AVF-a kao i krvarenje, ali i infekcija, odnosno aneurizme AVF-a su također komplikacije ove metode.[4, 5]

Peritonejska dijaliza je druga najčešća metoda dijalize kod bolesnika s TBI. Kod ove metode bolesnicima se u trbušnu šupljinu postavlja kateter za dijalizu najčešće laparoskopskim, iako se može postaviti i otvorenim operativnim zahvatom te se onda bolesnici preko njega dijaliziraju (slika 2). Kontinuirana ambulantna peritonejska dijaliza (CAPD) se provodi tako da bolesnici

vrećicu s tekućinom za dijalizu (dijalizatom) postavljaju najčešće na stalak iznad razine trbušne šupljine, zatim im dijalizat pod djelovanjem gravitacije ulazi u trbušnu šupljinu u određenom volumenu te u određenom vremenu, uz određeni broj ciklusa tijekom dana. Pored CAPD-a, postoji još i automatizirana peritonejska dijaliza (APD) koja se provodi pomoću uređaja tijekom noći te samim time preko dana ostavlja bolesnicima više slobodnog vremena.[6]



Slika 2. Kateter za CAPD (Arhiva, Klinika za urologiju, KBC Zagreb).

1.1.2. Darivanje bubrega

Darivatelj bubrega može biti živa srodna ili nesrodna osoba, odnosno moždano mrtva osoba (kadaverični donor). Većina bubrega koji se danas transplantiraju u našoj zemlji su bubrezi od kadaveričnih donora (tako da se daljnji tekst uglavnom odnosi na ove donore, odnosno ove transplantacije), mada se u nekim zemljama kao što su Sjedinjene Američke Države, udio živih srodnih i nesrodnih darivatelja penje i do 1/3 od ukupnog broja darivatelja organa.[7]

Organi se od kadaveričnog donora mogu uzeti ukoliko je darivatelj za života potpisao pristanak za doniranje organa ili ukoliko isti takav pristanak potpiše obitelj nakon njegove smrti. Postoje u načelu dva različita modela zakonske regulative doniranja organa. Prvi je onaj kod kojeg se osoba za života mora izjasniti da želi donirati organe, a drugi je onaj koji se naziva model pretpostavljenog pristanka. U modelu pretpostavljenog pristanka smatra se da svaka osoba može biti darivatelj organa, osim ukoliko se za života tome protivila, samim time zemlje koje imaju ovaj model imaju i veći broj darivatelja, odnosno veći broj transplantacija. U Republici Hrvatskoj koristi se drugi model, mada se u praksi uvijek traži i pristanak obitelji, te ukoliko se isti ne dobije, odustaje se od uzimanja organa za transplantaciju.[8, 9]

1.1.3. Priprema bolesnika za transplantaciju bubrega

Obrada bolesnika za transplantaciju je zapravo multidisciplinarna, naime bolesnici moraju napraviti niz propisanih i standardiziranih specijalističkih pregleda i pretraga prije nego što se ustanovi jesu li sposobni za transplantaciju bubrega. Specijalisti različitih grana medicine (nefrolozi, urolozi, anesteziolozi, otorinolaringolozi, doktori dentalne medicine, psihijatri, imunolozi, ginekolozi, ali po potrebi i drugi) moraju pregledati bolesnika, a bolesnici moraju napraviti i niz laboratorijskih i slikovnih pretraga prije transplantacije bubrega. Ukoliko se ustanovi da je bolesnik sposoban za transplantaciju, on se stavlja na listu za transplantaciju bubrega. Kada se pojavi odgovarajući bubreg, obavještavaju se nacionalni i bolnički transplantacijski koordinatori koji onda obavještavaju nadležnog liječnika obiteljske medicine te službujuće liječnike (nefrologa i urologa) u bolnici, nakon čega se bolesnika poziva na transplantaciju bubrega.[10]

1.1.4. Transplantacija bubrega

Transplantacija bubrega je najbolja metoda liječenja završnog stadija kronične bubrežne bolesti (TBI). Prvu uspješnu transplantaciju bubrega s jednog brata blizanca na drugog napravili su J. E. Murray i J. H. Harrison 1954. godine u Bostonu u Sjedinjenim Američkim Državama.[11] Njihovom uspjehu prethodilo je više od pola stoljeća eksperimentalnog rada na životinjama, ali i na ljudima. Nakon što je savladana kirurška tehnika, značajan napredak transplantacije omogućilo je uvođenje imunosupresivne terapije, najprije otkrićem azatioprina, a nakon toga i ciklosporina. Daljnji napredak omogućen je upotrebom otopina za čuvanje, odnosno perfuziju bubrega, otkrićem humanih leukocitnih antigena (HLA), antilimfocitnog seruma, odnosno upotrebom monoklonskih protutijela s ciljem sprječavanja odbacivanja transplantiranog bubrega.[12]

Prva uspješna transplantacija bubrega u Republici Hrvatskoj napravljena je 1971. godine u Rijeci.[13] U Kliničkom bolničkom centru (KBC) Zagreb, prva uspješna transplantacija napravljena je 1973. godine. Od tada je program transplantacije bubrega značajno napredovao, posebno nakon 2007. godine kada je Republika Hrvatska ušla u Eurotransplant. Eurotransplant je organizacija osnovana s ciljem postizanja bolje tkivne podudarnosti između darivatelja i primatelja bubrega, te samim time i boljih rezultata transplantacije. Danas se u Eurotransplantu nalazi osam zemalja: Austrija, Belgija, Hrvatska, Njemačka, Mađarska, Luksemburg, Nizozemska i Slovenija.[14]

Sam proces transplantacije bubrega započinje anamnezom, pregledom i provjerom medicinske dokumentacije bolesnika te ponavljanjem laboratorijskih pretraga i nalaza koji su nužni za procjenu stanja bolesnika, odnosno za samu transplantaciju. Također se provjerava medicinska dokumentacija doniranog bubrega. Nakon toga, ukoliko je sve u redu, odnosno ukoliko je bolesnik spreman za transplantaciju, slijedi detaljni pregled darovanog organa (slika 3). Bolesnika se uspava i započinje se sa transplantacijom bubrega.



Slika 3. Ispreparirani bubreg spreman za transplantaciju (Arhiva, Klinika za urologiju, KBC Zagreb).

Lučnom incizijom razdvoje se koža, potkožje i mišićni slojevi, te se pristupi ekstraperitonealno u ilijačnu fosu. Slijedi prepariranje krvnih žila (arterije i vene ilijake) uz pažljivo podvezivanje okolnog tkiva. Prvo se radi venska anastomoza između vene bubrega i vanjske ilijačne vene, a nakon toga i arterijska anastomoza između arterije bubrega i vanjske ilijačne arterije (rjeđe unutarnje ilijačne arterije) (slika 4) i na kraju anastomoza između mokraćovoda i mokraćnog mjehura.



Slika 4. Šivanje arterijske anastomoze između arterije bubrega i vanjske ilijačne arterije primatelja (Arhiva, Klinika za urologiju, KBC Zagreb).

1.1.5. Imunosupresija

Neposredno prije, tijekom, odnosno nakon transplantacije bolesnici dobivaju imunosupresivnu terapiju. Uvođenjem ciklosporina u terapiju prije više od 30 godina značajno se smanjila učestalost akutnog odbacivanja transplantiranog bubrega, ali i poboljšalo njegovo preživljenje. Rezultati transplantacije bubrega dodatno su se poboljšali uvođenjem novijih imunosupresiva kao što su takrolimus i mikofenolna kiselina u devedesetim godinama prošlog stoljeća.[15] U načelu se danas koriste tri vrste imunosupresivnih lijekova, prvo kalcineurinski inhibitori (ciklosporin ili takrolimus), drugo, antipurinski lijekovi (mofetilmikofenolat ili mikofenolna kiselina u obliku natrijevog mikofenolata) i treće-kortikosteroidi (prednizon). Imunosupresivnu terapiju bolesnici koriste cijelo vrijeme dok imaju transplantirani bubreg. Ukoliko se nakon transplantacije javi odbacivanje presatka, imunosupresivna terapija se može promijeniti, odnosno korigirati. Imunosupresivna terapija s jedne strane sprječava odbacivanje transplantiranog bubrega, ali s druge strane izlaže bolesnike određenim rizicima, odnosno predisponira ih za različita stanja i bolesti. Ova stanja, odnosno bolesti mogu biti ograničene samo na usnu šupljinu, ali isto tako mogu se javiti u cijelom organizmu. Pokazano je naime, da imunosuprimirani bolesnici s transplantiranim bubregom imaju visoki rizik od oralnih bolesti, ali i da je taj rizik veći kod bolesnika koji su u imunosupresiji koristili ciklosporin u odnosu na bolesnike koji su koristili takrolimus.[16] Prevalencija prekomjernog rasta gingive kod transplantiranih bolesnika iznosi od 8 do 100% za ciklosporin i od 0 do 30% za takrolimus.[17, 18] Ciklosporin dovodi do nekoliko međusobno povezanih promjena u ustima koje uzrokuju prekomjerni rast gingive kao što su: proliferacija fibroblasta, inhibicija gena za kolagenazu, povećana sekrecija interleukina 6, povećana sinteza kolagena i glikozaminoglikana.[19] U načelu je za prekomjerni rast gingive potrebno minimalno 3 mjeseca terapije ciklosporinom.[20] Važno je napomenuti da pravilna oralna higijena može smanjiti učestalost prekomjernog gingivalnog rasta.[21] Pored hiperplazije gingive i druge oralne promjene kao što su oralna kandidijaza, vlasasta leukoplakija i obloženi jezik se češće javljaju kod imunosuprimiranih bolesnika. Kod transplantiranih bolesnika se, iako rijetko, mogu javiti i neke maligne oralne bolesti kao što je oralna forma Kaposijevog sarkoma.[22]

1.1.6. Antibiotici

Otkriće i primjena antimikrobnih lijekova predstavljaju veliki civilizacijski zaokret, spriječili su veliki broj smrtnih ishoda, transformirali medicinsku praksu i omogućili uspješnu kontrolu nekih zaraznih bolesti.

Učinak antibiotika u liječenju infekcija putem kontrole rasta i eradikacije bakterijskih patogena imao je povijesni utjecaj na kvalitetu života i zdravlje ljudi koji nije moguće do kraja sagledati ni naglasiti. Međutim, upotreba antibiotika dovela je i do pojave mikroorganizama koji su na njih rezistentni, odnosno multirezistentni. Smatra se da je tome u značajnoj mjeri doprinijela vrlo raširena, često nekritična, nepotrebna i prolongirana primjena antibiotika te upotreba izvan smjernica.

Liječnici i doktori dentalne medicine koji sudjeluju u propisivanju antimikrobnih lijekova moraju biti svjesni svoje uloge i potrebe za savjesnom i racionalnom primjenom antimikrobnih lijekova. Procijenjeno je da je u 2015. godini više od 50 000 smrti izazvano multirezistentnim patogenima u Europi i u Sjedinjenim Američkim Državama. Projekcije su da će se ta brojka popeti na 10 milijuna smrti godišnje do 2050. godine.[23]

Brojni pokazatelji nastanka i razvoja rezistencije pokazuju koliko je potrebno racionalno, ciljano i štedljivo primjenjivati antimikrobne lijekove. Uz razvoj rezistencije, upotreba antibiotika značajno narušava ekologiju humanog mikrobioma. Naime, djeluje na skupine mikroorganizama, stanica, gena te metabolita iz bakterija, eukariontа i virusa koji nastanjuju ljudsko tijelo. Disbioza mikrobioma može utjecati negativno na njegovu sposobnost da obavlja vitalne funkcije kao što su opskrba nutrijentima, produkcija vitamina i zaštita od patogena.[24]

Treba izbjegavati nekritičnu primjenu antibiotika u liječenju oralnih bolesti, nastojeći sačuvati potrebnu raznovrsnost unutar mikrobiote i izbjegavajući razvoj antimikrobne rezistencije. U kontroli karijesa, uz topikalnu primjenu fluorida, potrebno je reducirati količinu i učestalost konzumacije saharoze i kiselih napitaka (čak i ako su bez šećera), izbjegavajući na taj način zakiseljavanje u usnoj šupljini.

Antibiotici se gotovo rutinski koriste tijekom i nakon transplantacije bubrega. Uzimaju se zbog prevencije, odnosno liječenja infekcije. Ukoliko kod darivatelja bubrega postoji velika vjerojatnost infekcije zbog dugog boravka u Jedinici intenzivnog liječenja, onda primatelj, odnosno njegov bubreg nastavljaju primati isti antibiotik i nakon transplantacije. Primatelj rutinski prima antibiotik nakon transplantacije u sklopu prevencije infekcije, odnosno

perioperativnih i postoperativnih komplikacija. Nakon otpuštanja iz bolnice primatelji bubrega također uzimaju antibiotike do 6 mjeseci nakon transplantacije s ciljem prevencije oportunističkih infekcija.

Sigurno da ovakvo dugotrajno uzimanje antibiotika djeluje ne samo na uzročnike infekcije, nego i na druge mikroorganizme koje bolesnici imaju u svom organizmu, pa tako i u svojim ustima. Koncentracija većine antibiotika u slini nije velika, međutim ona je ipak dovoljna da bi djelovala na različite bakterije u usnoj šupljini u prvom redu na streptokoke.[25] Pokazano je također da upotreba nekih antibiotika u prvom redu amoksicilina, ali i eritromicina i tetraciklina, može povećati broj i/ili omjer bakterija u ustima koje su rezistentne na ove antibiotike.[26]

Amoksicilin, se kao penicilinski antibiotik širokog spektra, često koristi, pogotovo kod pedijatrijske populacije, ali i u stomatologiji za liječenje, odnosno za profilaksu prilikom stomatoloških zahvata. Upotreba amoksicilina smanjuje broj mikroorganizama koji su na njega osjetljivi, te povećava broj mikroorganizama koji su rezistentni, ali dovodi i do povećane rezistencije oralne mikrobiote na neke druge antibiotike kao što je eritromicin.[27]

Pokazano je također da kombinacije različitih antibiotika kroz duže vremensko razdoblje, vrlo brzo nakon početka uzimanja uzrokuju opsežne promjene probavne mikrobiote od smanjenja raznolikosti, preko povećanja streptokoka i laktobacila, do ranog gubitka anaerobnih bakterija. Za oporavak ove mikrobiote često je potrebno duže vremensko razdoblje (od više mjeseci pa i godina), te u velikom broju slučajeva i nakon ovog razdoblja postoje promjene mikrobiote koje se bitno razlikuju od stanja prije početka uzimanja antibiotika. Sve ovo ukazuje na vrlo važnu ulogu antibiotika u sastavu oralne mikrobiote.[28]

1.1.7. Šećerna bolest

Šećerna bolest je danas veliki zdravstveni problem, naime smatra se da samo u Sjedinjenim Američkim Državama ima više od 24 miliona bolesnika sa šećernom bolesti te da troškovi njihovog liječenja iznose više od 174 milijarde dolara.[29] Također se smatra da će se broj bolesnika sa šećernom bolesti u svijetu povećavati, između ostalog i zbog povećanog broja pretilih osoba. Šećerna bolest nastaje zbog nedostatka, odnosno nedovoljnog djelovanja inzulina, što uzrokuje hiperglikemiju koja ima brojne posljedice na cijeli organizam pa tako i na usnu šupljinu. Pokazano je da bolesnici sa šećernom bolesti imaju povećan rizik od različitih oralnih bolesti kao što su parodontne bolesti i karijes, ali i da imaju hiposalivaciju, odnosno suhoću usta (kserostomiju), kao i određene promjene osjeta okusa.[30-33]

U studijama u kojima je analiziran sastav oralne mikrobiote i mikrobiom, korištenjem različitih tehnika pokazano je da bolesnici sa šećernom bolesti imaju veći broj izolata streptokoka i laktobacila nego zdrava populacija te da postoji povezanost između ovih mikroorganizama i karijesa.[34-36] Također je pokazano da postoje značajne razlike u subgingivalnim mikroorganizmima između bolesnika sa šećernom bolesti i onih koji nisu imali šećernu bolest, naime kod bolesnika sa šećernom bolesti izoliran je veći postotak sljedećih rodova: *Aggregatibacter, Gemella, Eikenella, Selenomonas, Actinomyces, Capnocytophaga, Fusobacterium, Veillonella i Streptococcus*, ali i niži postotak rodova: *Porphyromonas, Filifactor, Eubacterium, Synergistetes i Treponema* u usporedbi se nedijabetičarima.[37] Sve ovo ukazuje na važnu ulogu, odnosno interakciju između šećerne bolesti i oralne mikrobiote koja je pokazana i na životinjskim modelima. Naime, postojanje šećerne bolesti je povećalo patogeni potencijal oralnih mikroorganizama potičući upalne procese, osteoklastogenezu i gubitak parodontalne kosti te uz to vezano ispadanje zuba, odnosno različite bolesti usne šupljine.[38]

Bolesnici s TBI, odnosno bolesnici na HD ali i na peritonejskoj dijalizi, kao i bolesnici s transplantiranim bubregom imaju povećanu vjerojatnost nastanka šećerne bolesti u usporedbi s općom populacijom.[39] Šećerna bolest koja se javlja nakon transplantacije bubrega naziva se post-transplantacijska šećerna bolest, a povezuje se s imunosupresijom, odnosno upotrebom kortikosterioda, ali i takrolimusa i ciklosporina. Pokazano je da upotreba takrolimusa značajno povećava vjerojatnost post-transplantacijske šećerne bolesti u odnosu na ciklosporin, ali i da zamjena terapije takrolimusa ciklosporinom, dovodi do značajno poboljšanja metabolizam glukoze.[40]

1.2. Oralno zdravlje i oralna flora/mikrobiota

1.2.1. Definicija i koncept

Oralno zdravlje je osnovna komponenta zdravlja i dobrobiti pojedinca. Ogroman broj ljudi ima jednu ili više oralnih bolesti i to najčešće u kroničnoj formi. Karijes prati ljude od ranog djetinjstva do kasne starosti. Karijes se smatra najčešćom kroničnom bolesti u djetinjstvu, koja se javlja pet puta češće nego astma i sedam puta češće nego alergijski rinitis.[41] Karijesu su izloženi i ljudi srednje, odnosno starije životne dobi. Štoviše, prevalencija karijesa povećava se s godinama života i danas se smatra da oko 35% globalne populacije ima karijes. S druge strane, bolesti parodonta ima oko 11% globalne populacije i one se uglavnom javljaju u odrasloj i starijoj životnoj dobi.[42] Kada se ovome dodaju još neke druge bolesti usne šupljine, uključujući i maligne, vidljivo je da gotovo polovina stanovništva ima narušeno oralno zdravlje. Zbog toga oralne bolesti imaju vrlo važnu ulogu u kvaliteti života i zdravlju pojedinca.

1.2.2. Povezanost oralnog zdravlja i oralne mikrobiote sa zdravljem organizma

Tijekom humane evolucije, naše okruženje je kontinuirano oblikovalo sastav našeg mikrobioma. Najvjerojatnije su na njegov sastav imali utjecaj svi ključni događaji u evoluciji od otkrića vatre, uzgoja poljoprivrednih kultura, industrijske revolucije, primjena rafiniranih šećera u prehrani, kao i uvođenje antimikrobnih lijekova u medicini, ali i u drugim djelatnostima, kao što su veterina, poljoprivreda i slično.[43]

Ljudski organizam je u sve većoj mjeri izložen djelovanju teških metala, dezinficijensa, biocida i antibiotika koji imaju potencijal za eradikaciju ili oštećivanje mnogih mikroorganizama uz pozitivnu selekciju mikroorganizama koji nose rezistentne determinante.

Neke bakterije usne šupljine genetički su evoluirale svoj metabolizam pod utjecajem promjena u prehrani. Primjerice, *Streptococcus mutans* se uspješno prilagodio razvivši obranu protiv povećanog oksidativnog stresa i rezistenciju na kisele nusprodukte svog novog, učinkovitog metabolizma ugljikohidrata i na taj način ostvario prednost u kompeticiji s ostalim oralnim bakterijskim vrstama. To je dovelo do njegove povećane prevalencije u usnoj šupljini, zajedno s drugim vrstama koje toleriraju kisele spojeve.

Praksa higijene usne šupljine mijenja se prema kraju 19. stoljeća u razvijenom dijelu svijeta, uglavnom pod utjecajem knjige Willoughbyja Millera „Microorganisms of the human mouth“

iz 1890. godine, koja je promovirala pranje zubi i korištenje četkice te zubnog konca.[44] Sve navedeno je utjecalo na promjene u sastavu oralnog mikrobioma.

Usna šupljina sadrži veliki broj različitih mikroorganizama, uglavnom bakterija, ali i gljiva, virusa te protozoa.[45] Zapravo se radi o kompleksnom sustavu koji se konstantno mijenja tijekom života ovisno o brojnim faktorima. Od velikog broja mikroorganizama koji se nalaze u usnoj šupljini najčešće su izolirani streptokoki, stafilokoki, gram-negativni koki (*Neisseriacae* i *Veillonellacae*), laktobacili, spirohete, korinebakterije, ali i *Streptococcus pneumoniae* i *Enterococcus faecalis*. Većina ovih mikroorganizama je zapravo ili bezopasna ili se povezuje s određenim bolestima usne šupljine, odnosno s karijesom. Međutim, neki od njih su oportunistički patogeni koji u određenim uvjetima mogu uzrokovati različite bolesti i izvan usne šupljine, bilo kao izravni uzrok bolesti ili kao stimulatori upalnog odgovora organizma koji isto tako kao i sam mikroorganizam može dovesti do različitih kardiovaskularnih, respiratornih, ali i nekih drugih bolesti.[46, 47] Zbog toga je važno znati koji su sve mikroorganizmi prisutni u usnoj šupljini kako u zdravoj, tako i u bolesnoj populaciji, ali i kod bolesnika koji imaju TBI, odnosno koji su na dijalizi, ili su imali transplantaciju bubrega.

Postoji izravna veza između oralnog i općeg zdravlja. Loša oralna higijena i bolesti parodonta su rizični faktor za nastanak nekih respiratornih bolesti (pneumonije, kronične opstruktivne bolesti pluća), kao i lošeg ishoda liječenja šećerne bolesti.[48-50] Pokazano je također, da oralne bolesti ne djeluju negativno samo na opće zdravlje nego i na niz psihosocijalnih komponenti kao što su: samopoštovanje, socijalna izolacija, izostajanje s posla i iz škole te smanjena produktivnost na poslu.[51] Oralne bolesti ne predstavljaju samo zdravstveni nego i financijski problem. Smatra se da se između 5 do 10% ukupnih sredstava za liječenje potroši na liječenje oralnih bolesti, te da je karijes četvrta najskuplja bolest na svijetu.[52]

Važno je napomenuti da se veliki broj oralnih bolesti zapravo može prevenirati brigom o oralnom zdravlju. Redovitim održavanjem oralne higijene, odnosno redovitim pranjem zuba, kontrolama liječnika dentalne medicine, kao i izbjegavanjem pretjeranog uzimanja šećera i alkohola te nepušenjem, značajno se može smanjiti rizik od nastanka oralnih bolesti, odnosno sačuvati oralno zdravlje.

1.2.3. Oralno zdravlje kod bolesnika na dijalizi i s transplantiranim bubregom

Terminalna bubrežna insuficijencija predstavlja kroničnu bolest, odnosno kronično stanje i kao takva izlaže bolesnika povišenom riziku različitih oralnih bolesti. Pokazano je da bolesnici s kroničnom bubrežnom bolesti imaju povišeni rizik od sklerozacije pulpne komore,[53] nepravilnosti zubne cakline,[54] kserostomije,[55] te preuranjenog gubitka zuba,[56] ali i povećanu učestalost zubnog kamenca i bolesti parodonta, u usporedbi s općom populacijom.[57, 58]

Naime, općenito bolesnici s kroničnim bolestima, pa tako i bolesnici s TBI, vode manje računa o svom oralnom zdravlju, imaju lošiju oralnu higijenu te rjeđe posjećuju svoje liječnike dentalne medicine.[59,60] Pored toga često postoji preklapanje između kroničnih bolesti i siromaštva te uz siromaštvo vezanu pothranjenost i različite upalne bolesti,[61,62] što sve u konačnici rezultira lošijim oralnim zdravljem kod bolesnika s TBI.[63] Također je pokazano da su bolesti parodonta, odnosno odontogene upale značajan uzrok generaliziranih upala kod bolesnika s TBI te su njihova prevencija, odnosno liječenje prije, ali i tijekom dijalize, kao i nakon transplantacije vrlo važni.[64,65] Bolesnici s TBI zahtijevaju i posebnu pažnju, odnosno skrb prilikom stomatoloških zahvata, posebno ukoliko su radi o intervencijama na sluznici koje mogu dovesti do bakterijemije. Većina bakterijemija koja nastaju kod stomatoloških zahvata su zapravo prolazne i velika većina mikroorganizama se brzo eliminira iz cirkulacije djelovanjem imunološkog sustava, međutim ukoliko imunološki sustav nije dovoljno djelotvoran, mikroorganizmi se mogu zadržati duže vremena u cirkulaciji i samim time povećati vjerojatnost kolonizacije ostatka organizma.

Nije samo kronična bubrežna bolest važan faktor rizika za lošije oralno zdravlje ovih bolesnika, nego i dijaliza kao takva ima svojih posljedica na oralno zdravlje. Bolesnici koji su na HD imaju veću vjerojatnost krvarenje prilikom stomatoloških zahvata zbog upotrebe lijekova protiv zgrušavanja krvi,[64,66] dok su bolesnici na peritonejskoj dijalizi skloni pothranjenosti i samim time izloženi brojnim negativnim posljedicama vezanim uz pothranjenost, između ostalog i oralnim bolestima.[67] Također je pokazano da je prisutnost bolesti parodonta povezana s razvojem pneumonije, odnosno da su bolesti parodonta neovisni prognostički faktor za smrtnost od pneumonije u bolesnika koji su na HD.[68]

Do sada su istraživani brojni različiti faktori koji bi mogli djelovati na zdravlje, odnosno na morbiditet i mortalitet bolesnika s transplantiranim bubregom. U svom radu Zwiech i suradnici su pokazali da je zanemarivanje oralnog zdravlja povezano s povećanim rizikom kliničkih komplikacija u prvoj godini nakon transplantacije bubrega.[69] Također je pokazano da neki

imunosupresivi imaju ulogu u učestaloj pojavi upale parodonta kod bolesnika s transplantiranim bubregom,[70] ali i da imunosupresivna terapija povećava vjerojatnost nekih benignih kao i malignih lezija u ustima.[22]

1.2.4. Dosadašnja istraživanja

Bolesnici s transplantiranim bubregom uzimaju imunosupresivnu i antimikrobnu terapiju sa ciljem prevencije odbacivanja, odnosno infekcija. Međutim, ne može se s velikom sigurnošću predvidjeti koji mikroorganizmi i u kojim okolnostima će uzrokovati infekcije kod transplantiranih bolesnika te kakvu točnu ulogu u tome imaju imunosupresivna i antimikrobna terapija. Imunosupresivna terapija djeluje na cijeli organizam te samim time djeluje i na usnu šupljinu, odnosno na oralnu mikrobiotu.[71]

U literaturi, istraživanjima i stručnim radovima se koriste pojmovi mikrobiote i mikrobioma, ovisno o načinu istraživanja, studijama i preferencijama istraživača te je važno razjasniti razlike.

Mikrobiota je pojam koji se odnosi na cijelu populaciju mikroorganizama koje koloniziraju određeno mjesto i uključuje ne samo bakterije već i druge mikroorganizme kao što su gljive, arheje, virusi i protozoe[71].

Mikrobiom je širi pojam koji se koristi za skupni sastav gena svih mikroorganizama, dakle podaci koji se koriste u svrhu dopune podataka o mikrobiomu, a dobivaju se najčešće sekvencioniranjem nove generacije. Sekvencioniranjem nove generacije moguće je u relativno kratkom vremenu i temeljem novog koncepta sekvencioniranja, dobiti velike količine sekvenci koje pripadaju određenim vrstama mikroorganizama, međutim neke od njih nije moguće kultivirati, a kultivacija je neophodna kako bi se karakteristike bakterija mogle proučavati na adekvatan način.[72]

Pojam “disbioza” predstavlja disreguliranu (promijenjenu) mikrobiotu, odnosno mikrobiotu promijenjenog sastava.

U tijelu postoji više vrsta mikrobiota: oralna mikrobiota, respiratorna mikrobiota, probavna mikrobiota, mikrobiota na površini tijela, mikrobiota u rodnici, mikrobiota u mokraćnom mjehuru, odnosno mokraći i druge mikrobiote. Mikroorganizme koji se nalaze u usnoj šupljini u literaturi se različito naziva, primjerice oralna mikroflora, oralna mikrobiota ili oralni mikrobiom.

Dosadašnja istraživanja mikrobiota i mikrobioma, odnosno oralnih zajednica i pojedinačnih mikroorganizama su bila limitirana istraživačkom tehnikom, naime koristile su se metode kultivacije kojima se uspijevalo izolirati relativno mali broj mikroorganizama, a i nakon uspješne izolacije, identifikacija je, osobito za anaerobne bakterije, prilično tehnički ograničena, osim u slučaju korištenja metoda kao što je plinska kromatografija, koja najčešće nije dostupna u kliničkim laboratorijima.[72,73] Korištenjem modernih molekularnih metoda kao što su sekvencioniranje 16S ribosomske ribonukleinske kiseline (rRNA) i sekvencioniranje cjelovitog genoma, omogućena je identifikacija gena koji pripadaju velikom broju mikroorganizama, značajno većem u usporedbi s ranije korištenim metodama.[43] U našem istraživanju nismo bili u mogućnosti koristiti metode sekvencioniranja nove generacije, zbog financijskih i tehničkih ograničenja, ali smo bili u mogućnosti primijeniti, u času provođenja studije, revolucionarnu tehnologiju MALDI-TOF MS, koja je u novije vrijeme donijela veliki doprinos preciznosti identifikacije bakterija i gljiva.

Sastav ljudskog mikrobioma u različitim organskim sustavima pokazuje velike razlike i izuzetno se razlikuje od čovjeka do čovjeka. Smatra se da svaka osoba ima svoj, osobit i poseban sastav mikrobioma koji se može nazvati jedinstvenom značajkom „mikrobiomskim otiskom prsta“.[74,75]

Oralni mikrobiom čini skupina gena od više stotina do nekoliko tisuća različitih mikroorganizama, od kojih veliki broj još nije kultiviran. Različiti ljudi imaju različite mikrobiome, a razlike u sastavu probavnog mikrobioma mogu biti od 80 do čak 90 %.[76] Ne postoje razlike samo u vrsti i broju mikroorganizama, nego i u njihovoj lokalizaciji u samoj usnoj šupljini, zastupljenosti ovisno o godinama bolesnika, ali i oralnom zdravlju, odnosno različitim bolestima kako usne šupljine, tako i organizma u cjelini kao i o vrsti lijekova koje bolesnici uzimaju.[77] Zbog toga smo u ovom istraživanju uspoređivali uzorke istih bolesnika prije i nakon transplantacije bubrega te na taj način izbjegli značajne interindividualne razlike između bolesnika.

U našem radu smo istražili mikroorganizme u usnoj šupljini kod bolesnika s TBI, odnosno s transplantiranim bubregom korištenjem MALDI-TOF MS što do sada nije rađeno, odnosno do sada ne postoji na PubMed-u ovakav rad.

1.2.5. MALDI-TOF MS

Mikroorganizmi se identificiraju i klasificiraju na osnovi njihovih karakteristika, od morfoloških, preko numerički i kemotaksonomijskih, do genotipskih i filogenetskih. Važno je da je sama metoda identifikacije mikroorganizama pouzdana, brza, jednostavna, široko dostupna i cjenovno prihvatljiva. Danas je u dijagnostičko-kliničkoj mikrobiologiji naglasak na molekularnim metodama koje su pogodne jer su DNA, odnosno RNA prisutne kod svih bakterija. Genom svake jedinke je individualan te je moguća identifikacija jednog ili više lokusa, a molekularne metode su osjetljive i specifične te se mogu raditi izravno iz uzoraka (krv, sputum), komercijalno su dostupne i odobrila ih je Agencija za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration (FDA)).[78] Danas se najčešće koriste različite primjene metode lančane reakcije polimeraze (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR), a vrlo su zastupljene i metode sekvencioniranja dijelova genoma kao i cjelogenomsko sekvencioniranje. Sekvencioniranja, osobito sekvencioniranja nove generacije (engl. Next Generation Sequencing (NGS)) koriste se u sve većoj mjeri i daju nove informacije o mikroorganizmima u ljudskom tijelu. NGS metode nisu dostupne svim istraživačima, uglavnom zbog cijene samih uređaja, odnosno materijala koji se koriste. Pored svojih prednosti ove metode imaju i neka ograničenja kao što su složenost analize i interpretacije velike količine informacija koje se dobiju na taj način.

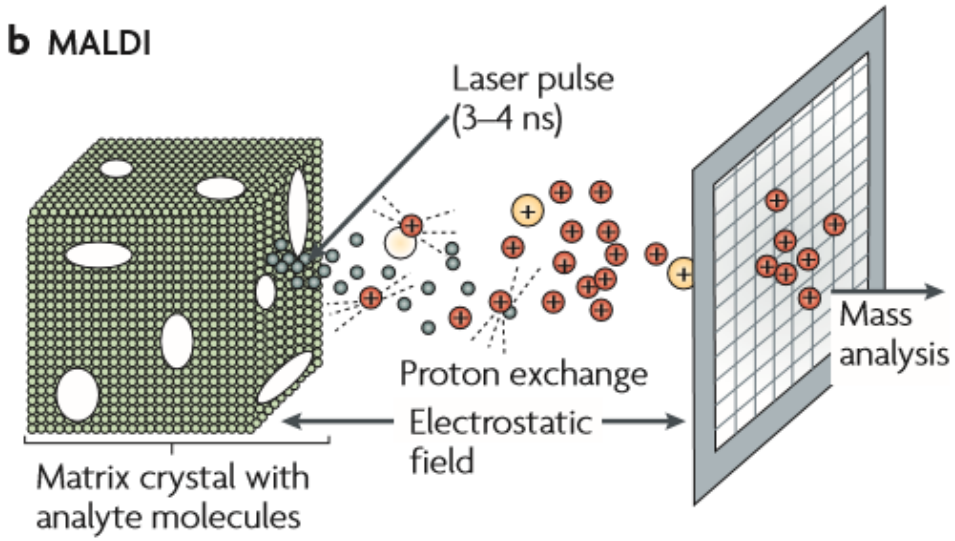
U mnogim istraživanjima se stoga koriste druge metode molekularne mikrobiologije i kultivacije nakon kojih se primjenjuje identifikacija konvencionalnim metodama ili korištenjem MALDI-TOF MS tehnologije. MALDI-TOF MS je brza, točna i cjenovno prihvatljiva metoda identifikacije i karakterizacije mikroorganizama. Metoda se zasniva na karakterističnoj spektrometriji masa za određeni mikroorganizam.[79] Sama detekcija na bazi masene spektrometrije je kao metoda dugo prisutna, međutim prvi puta su 1975. godine Anhalt i Fenselau pokazali da bi se ova metoda mogla koristiti i u mikrobiologiji.[80] Napretkom tehnologije i uvođenjem novih metoda omogućena je analiza sve većih i većih dijelova mikroorganizama, preko lipida i proteina sve do cijele bakterijske stanice, ali i drugih mikroorganizama kao što su gljive, pljesni i virusi.[81,82]

Sam uređaj za MALDI-TOF se sastoji od tri funkcionalne jedinice: 1) izvor iona za ionizaciju i transfer molekula uzorka u plinovitu fazu, 2) analizator koji na osnovi omjera masa-naboj razdvaja molekule iz plinovite faze i 3) detektora koji ih prepoznaje i uspoređuje s uzorcima iz baze.

Uzorak koji sadrži mikroorganizme u maloj se količine nanese na za to predviđeno mjesto (kružić na MALDI pločici), nakon sušenja na zraku dodaje se matriks, što dovodi do kristalizacije mješavine uzorka i matriksa. Sastav matriksa ovisi o vrsti molekula/uzoraka koji će se analizirati i vrsti lasera koji će se koristiti, ali u načelu se radi o kratkolančanim kiselinama. U identifikaciji većine uobičajenih vrsta bakterija, nije potrebno prethodno tretirati uzorak, jer samim kontaktom bakterija i vode, organskog otapala ili kiseline iz matriksa dolazi do njihove lize.

Kristalizirani uzorak se izlaže energiji lasera te dolazi do desorpcije, vaporizacije i ionizacije, odnosno prelaska u plinovitu fazu, nakon čega slijedi elektrostatičko ubrzavanje, prolazak kroz cijev s vakuumom, gdje se vrijeme potrebno do dolaska do detektora, odnosno do detektiranja definira kao vrijeme leta, (engl. time of flight (TOF)) te ovisi o masi i naboju uzorka. Male molekule, odnosno ioni putuju brže od velikih te dolazi do njihovog razdvajanja i detektiranja (slika 5).[83]

Prije samog započinjanja analize, definira se projekt, što predstavlja naziv koji stroj daje skupini analiza koje se sukcesivno odvijaju na istoj pločici, a rezultati dobivaju zajedno na istom ispisu, analit se postavi u za to predviđenu komoru, odabere se baza podataka, analiza započinje te se nakon nekoliko desetaka sekundi, dobivaju rezultati na ekranu monitora.[78]



Slika 5. Prikaz MALDI-TOF MS metode. Preuzeto iz Sauer S i Kliem M. Mass spectrometry tools for classification and identification of bacteria. Nat Rev Microbiolo. 2010;8:74-82.

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA

2. SVRHA ISTRAŽIVANJA

Svrha ovog istraživanja je bila izrada mikrobiološkog profila usne šupljine prije i nakon transplantacije bubrega korištenjem MALDI-TOF MS te njihova usporedba kao i korelacija s drugim parametrima koji su važni za oralno i opće zdravlje bolesnika.

Hipoteza

Nakon transplantacije dolazi do promjene mikroorganizama u usnoj šupljini. Oralna higijena i oralni status bolesnika, ali i imunosupresivna terapija, antibiotici te šećerna bolest mogu promijeniti mikrobiološki sastav usne šupljine bolesnika nakon transplantacije bubrega.

Ciljevi

OPĆI CILJ: Istražiti promjene mikroorganizama u usnoj šupljini prije i nakon transplantacije bubrega.

SPECIFIČNI CILJEVI:

Istražit će se:

1. mikroorganizmi u usnoj šupljini bolesnika prije i nakon (u dva vremenska razdoblja) transplantacije bubrega

2. povezanost između oralne higijene i oralnog statusa i mikroorganizama u usnoj šupljini prije i nakon transplantacije bubrega

3. povezanost imunosupresivne terapije i mikroorganizama u usnoj šupljini prije i nakon transplantacije bubrega

4. povezanost antibiotske terapije i mikroorganizama u usnoj šupljini prije i nakon transplantacije bubrega

5. povezanost šećerne bolesti i mikroorganizama u usnoj šupljini prije i nakon transplantacije bubrega

3. ISPITANICI I METODE

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Unicentrično, longitudinalno, opservacijsko, prospektivno, primijenjeno istraživanje. Prema specifičnom ustroju radi se o presječnom istraživanju.

3.2. Mjesto i vrijeme istraživanja

Istraživanje je provedeno od 10.2013. do 12.2014. godine na Klinici za urologiju i Zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb, Kišpatićeva 12, Zagreb.

3.3. Etička načela

Za ovo istraživanje dobili smo pismenu suglasnost Etičkog povjerenstva KBC-a Zagreb u Zagrebu i Etičkog povjerenstva Stomatološkog fakulteta u Zagrebu. Svi bolesnici su bili upoznati s istraživanjem te su se suglasili s istim i potpisali informirani pristanak.

3.4. Ispitanici i uzorci

U ovo istraživanje uključeno je 50 bolesnika koji su imali transplantaciju bubrega u Klinici za urologiju KBC-a Zagreb u Zagrebu. Svi bolesnici su prije stavljanja na listu za transplantaciju bubrega prošli standardiziranu, propisanu proceduru koja se sastojala od niza specijalističkih pregleda te niza isto tako standardiziranih i propisanih laboratorijskih i slikovnih pretraga. Nakon toga bolesnicima je ustanovljeno zadovoljavajuće zdravstveno stanje te odsustvo značajne patologije koja bi bila kontraindikacija za transplantaciju bubrega. Pregledom liječnika dentalne medicine ustanovljeno im je sanirano zubalo i zadovoljavajući oralni status za transplantaciju bubrega.

Svi bolesnici koji su došli na transplantaciju bubrega su neposredno prije samog zahvata ponovno prošli standardiziranu, propisanu proceduru, odnosno pregledani su od strane nefrologa, urologa i anesteziologa te po potrebi i drugih specijalista, a također su napravili i kompletnu obradu za operaciju (laboratorijsku, uključujući i imunološku te slikovnu), odnosno transplantaciju bubrega. Ukoliko su bolesnici na osnovi anamnestičkih, kliničkih,

laboratorijskih i slikovnih metoda bili sposobni za transplantaciju, pristupilo se transplantaciji bubrega.

Nakon transplantacije bolesnici su bili hospitalizirani minimalno 7, maksimalno 34 (prosječno 14 dana) na Klinici za urologiju KBC-a Zagreb. Nakon otpuštanja iz KBC-a Zagreb, bolesnici su bili redovito kontrolirani u navedenoj ustanovi.

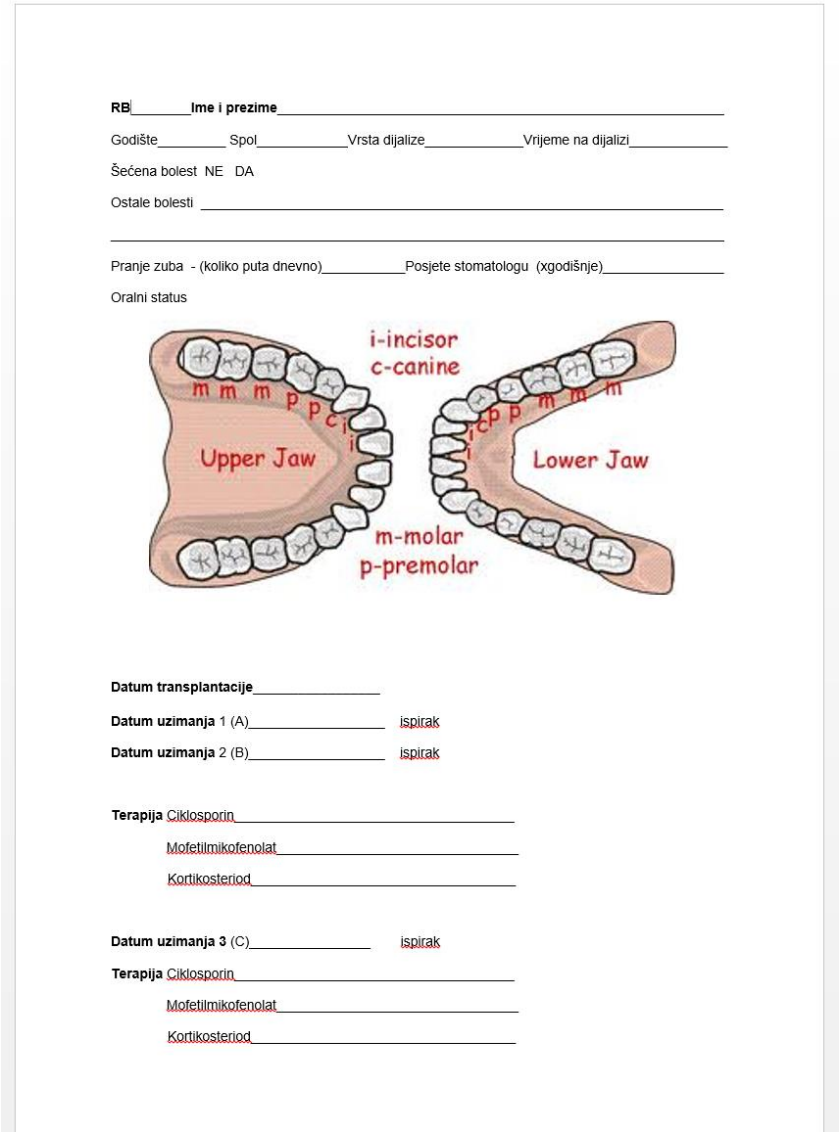
Bolesnicima su uzeti uzorci prije i nakon transplantacije bubrega te su bolesnici bili sami sebi kontrola. Bolesnicima su se uzimali uzorci brisa i ispirka usne šupljine neposredno (nekoliko sati (minimalno 6 sati nakon pranja zubi)) prije transplantacije bubrega (uzorci A), zatim od 7 do 14 dana nakon transplantacije dok su još bili na Klinici za urologiju kao rani posttransplantacijski uzorci (uzorci B) i na kraju 3 do 6 mjeseci nakon transplantacije kada bi došli na kontrolu, kao kasni posttransplantacijski uzroci (uzorci C). Prvim sterilnim štapićem s vatom obrisala se bukalna sluznica kao i bukalna i nepčana strana zuba, a drugim sterilnim štapićem obrisala im se gornja ploha jezika. U sterilnu špricu aspiriralo se 5 ml fiziološke otopine koja se ušpricala u usta, a bolesnika se zamolilo da usta ispere i nakon toga ispljune tekućinu u sterilnu posudicu. U posudicu su se nakon toga stavili i vrhovi dva štapića te se posudica zatvorila (slika 6). Uzorak se označio i transportirao u mikrobiološki laboratorij na pohranu i daljnju analizu.



Slika 6. Posudica s uzrocima.

3.5. Anketni upitnik

Za sve bolesnike ispunjen je upitnik (slika 7) koji je napravljen za ovo istraživanje u koji su upisani osnovni sociodemografski podaci, podaci o vrsti i dužini dijalize, podaci o oralnoj higijeni i zdravlju (učestalost pranja zuba, broj godišnjih posjeta liječniku dentalne medicine), odnosno oralnom statusu (broj zuba, broj zubnih ispuna, broj mostova, kruna, proteza i implantata) kao i podaci o vrsti imunosupresivne terapije, uzimanju antibiotika te šećernoj bolesti. Dio podataka dobiven je iz bolničkog informatičkog sustava (BIS-a).



RB_____**Ime i prezime**_____

Godište_____ Spol_____Vrsta dijalize_____Vrijeme na dijalizi_____

Šećena bolest NE DA

Ostale bolesti _____

_____

Pranje zuba - (koliko puta dnevno)_____Posjete stomatologu (xgodišnje)_____

Oralni status

Datum transplantacije_____

Datum uzimanja 1 (A)_____ ispirak

Datum uzimanja 2 (B)_____ ispirak

Terapija Ciklosporin_____

Mofetilmikofenolat_____

Kortikosteriod_____

Datum uzimanja 3 (C)_____ ispirak

Terapija Ciklosporin_____

Mofetilmikofenolat_____

Kortikosteriod_____

Slika 7. Anketni upitnik bolesnika.

3.6. Mikrobiološka analiza

Mikrobiološka analiza provedena je u laboratoriju Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb, Kišpatićeva 12, Zagreb.

Uzorci su nasađivani na Columbia agar i krvni agar koji se prethodno pripremljeni prema uputama objavljenim u Difco & BBL Manualu.[84] Štapići su izvađeni iz transportne posudice te se izravnim nanošenjem inokulirao uzorak na podlogu, a zatim je uzorak ispirka usne šupljine inokuliran, sterilnom kalibriranom ezom od 10 μl i 100 μl dodanih pipetom sa sterilnim nastavkom. Tako inokulirane i obilježene podloge kultivirane su u anaerobnim uvjetima na 35 °C tijekom 48 sati. Inkubacija podloga za aerobne bakterije provodila se u uvjetima atmosferskog kisika u termostatu tijekom 18-24 sati na 36-37 °C. Anaerobni uzročnici infekcija su osjetljiviji i uzgojno više zahtjevni od fakultativnih anaeroba, odnosno većine bakterija koje su patogeni kod čovjeka, stoga je za kultivaciju korištena hranjiva podloga s 5% krvi, ali i s dodatkom hemina i vitamina K kao i nekih dodatnih hranjivih tvari koje su potrebne za uzgojno zahtjevne uzročnike (Columbia agar).

Očitavanja su provedena nakon 24 i 48 sati. Očitavanja su napravljena za sva tri uzorka, a rezultati identifikacije su kombinirani u zajednički mikrobiološki profil pojedinog uzorka svakog pacijenta.

Makroskopski vidljive kolonije identificirane su, a u slučaju konfluiranja, prerastanja i nedovoljno jasne mikromorfologije pojedinih kolonija, provođena je subkultivacija na već primijenjene neselektivne podloge. Obrada je provedena prema principima dobre laboratorijske prakse i uobičajenom algoritmu obrade gram-pozitivnih, odnosno gram-negativnih bakterija (vizualna opservacija kolonije, bojenje po Gramu, mikroskopija).

Konačna identifikacija izolirane vrste provedena je automatiziranim sistemom MALDI-TOF (MALDI Biotyper®CA System, Bruket Daltonics Inc. Billerica, MA USA (slika 8)).[85]



Slika 8. MALDI Biotyper®CA System.

Priprema uzorka:

Temeljni preduvjeti:

Uvijek su se koristile samo Eppendorf tube i nastavci, prema naputku proizvođača uređaja (u protivnom može doći do oslobađanja tvari iz plastičnih nastavaka).

• Upotrebljavale su se samo kemikalije najvećeg stupnja čistoća (koje su pogodne za korištenje za MALDI ili HPLC (engl. „High Pressure Liquid Chromatography").

Priprema Matrix otopine:

• Upotrijebljen je „HCCA matrix portioned“ (HCCA=α-cijano-4-hidroksildinačična kiselina, u tubicama koje sadrže 2.5±0.3 mg matriksa)

• Standardno otapalo s 50% acetonitrila (AN), 47.5% vode (H_2O) i 2.5% tri-fluor-octene kiseline (TFA) nadalje se označava kao „OS“ (engl. Basic Organic Solvent - osnovno organsko otapalo).

• Pipetirajuća shema za 1 ml „OS“: 500 µl AN, 475 µl Aquadest, 25 µl čiste TFA.

• Dodano je 250 µl „OS“ u jednu tubu „HCCA matrix portioned“ i vorteksirano dok svi kristali matriksa nisu kompletno otopljeni.

• Pripremljeni matriks je bio pohranjen na sobnoj temperaturi zaštićen od svjetla do 2 tjedna.

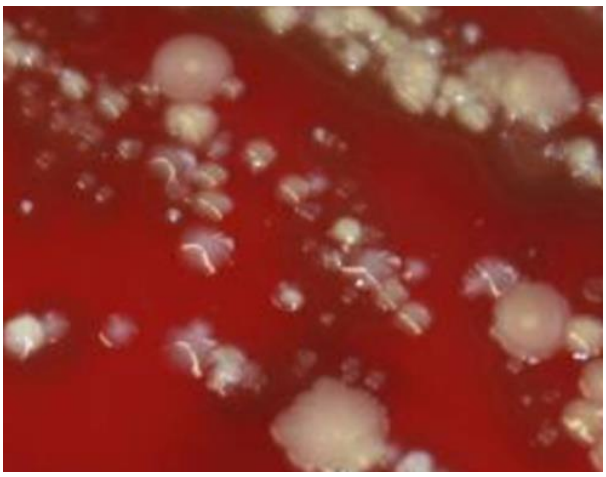
• Alternativno: saturirana otopina matriksa HCCA u „OS“.

• Uzeto je nešto HCCA kristala u Eppendorf tubu i miješano s 200 do 500 µl OS.

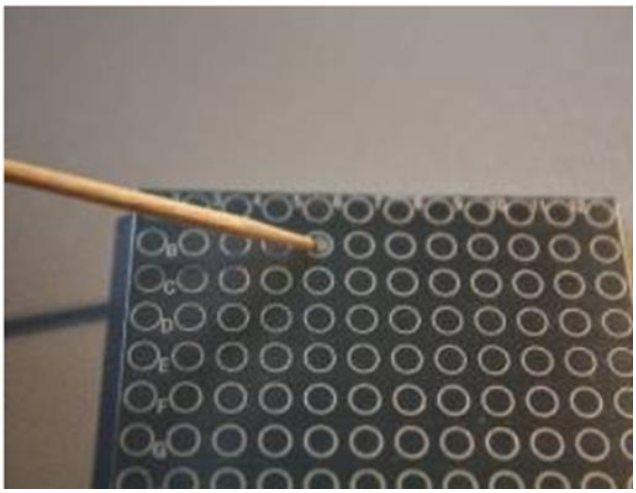
• Miješano je na vibro-mikseru nekoliko minuta na sobnoj temperaturi dok otopina nije bila zasićena.

Priprema uzorka - MALDI: Direktni transfer-priprema

• Biološki materijal (jedna kolonija mikroorganizma) (slika 9) je u tankom filmu nanesen na MALDI pločicu. Postupak se proveo primjenom vrška nastavka pipete, mikrobiološkom ezom ili čačkalicom (slika 10). U postupku transfera važno je da je kolonija izolirana i da se prenosi materijal samo jedne morfološke vrste, te je u slučaju konfluiranja provedena subkultivacija „miješanih“ kolonija na dodatne podloge.



Slika 9. Kolonije za transfer.



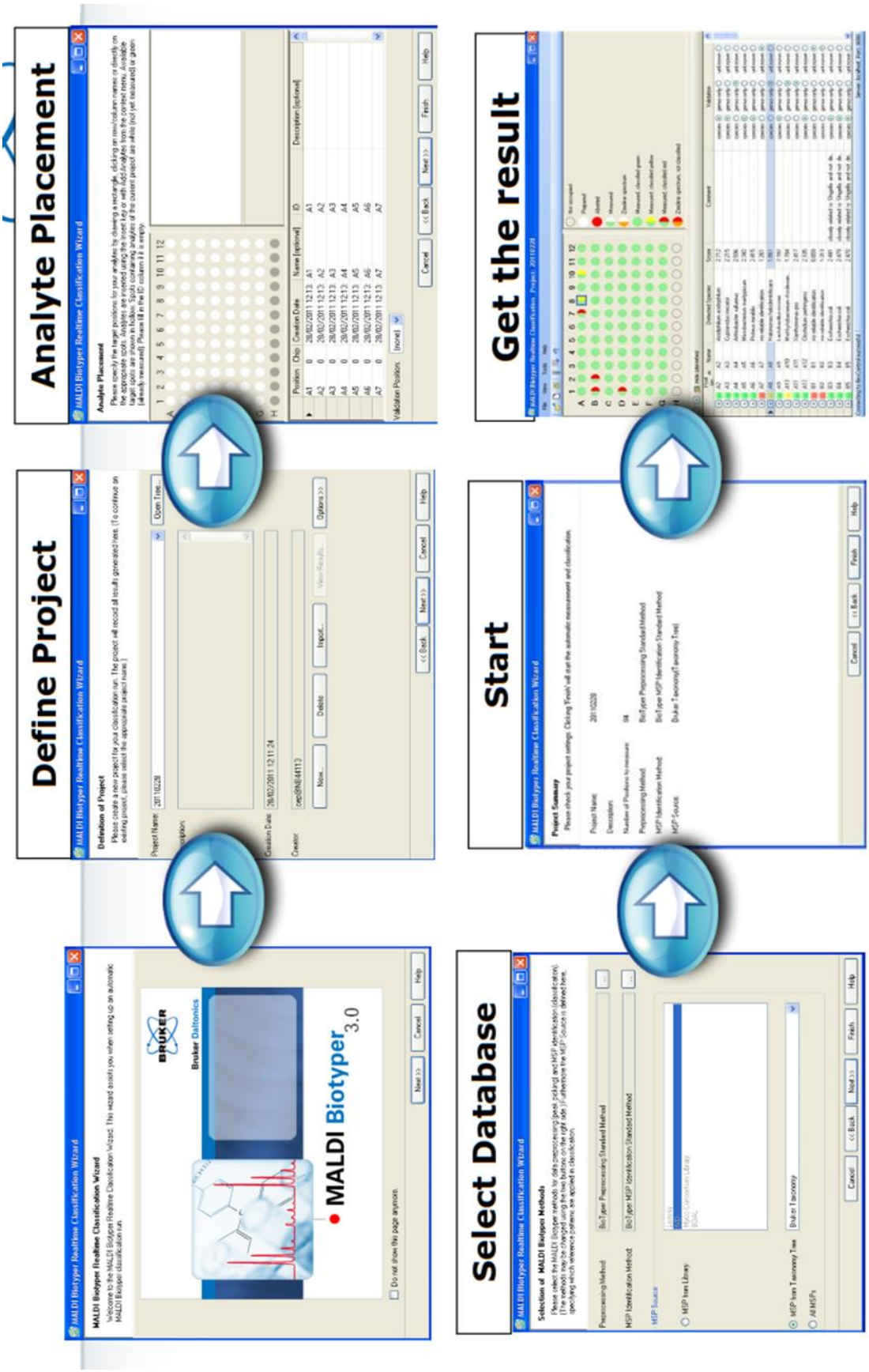
Slika 10. Nanošenje male količine mikroorganizama na kružić korištenjem čačkalice.

• Mala količina je nanesena na kružić namijenjen za nanošenje mikroorganizma. Potrebna je vrlo mala količina materijala (bolje je staviti manje mikroorganizama nego više), čak i ako je materijal tek vidljiv na pločici, dovoljno je za mjerenje. Nakon toga je uzorak ostavljen da se osuši na zraku. Prema uputi proizvođača, HCCA matriks se mora dodati unutar 30 minuta od transfera kolonije, ili se transfer mora ponoviti.

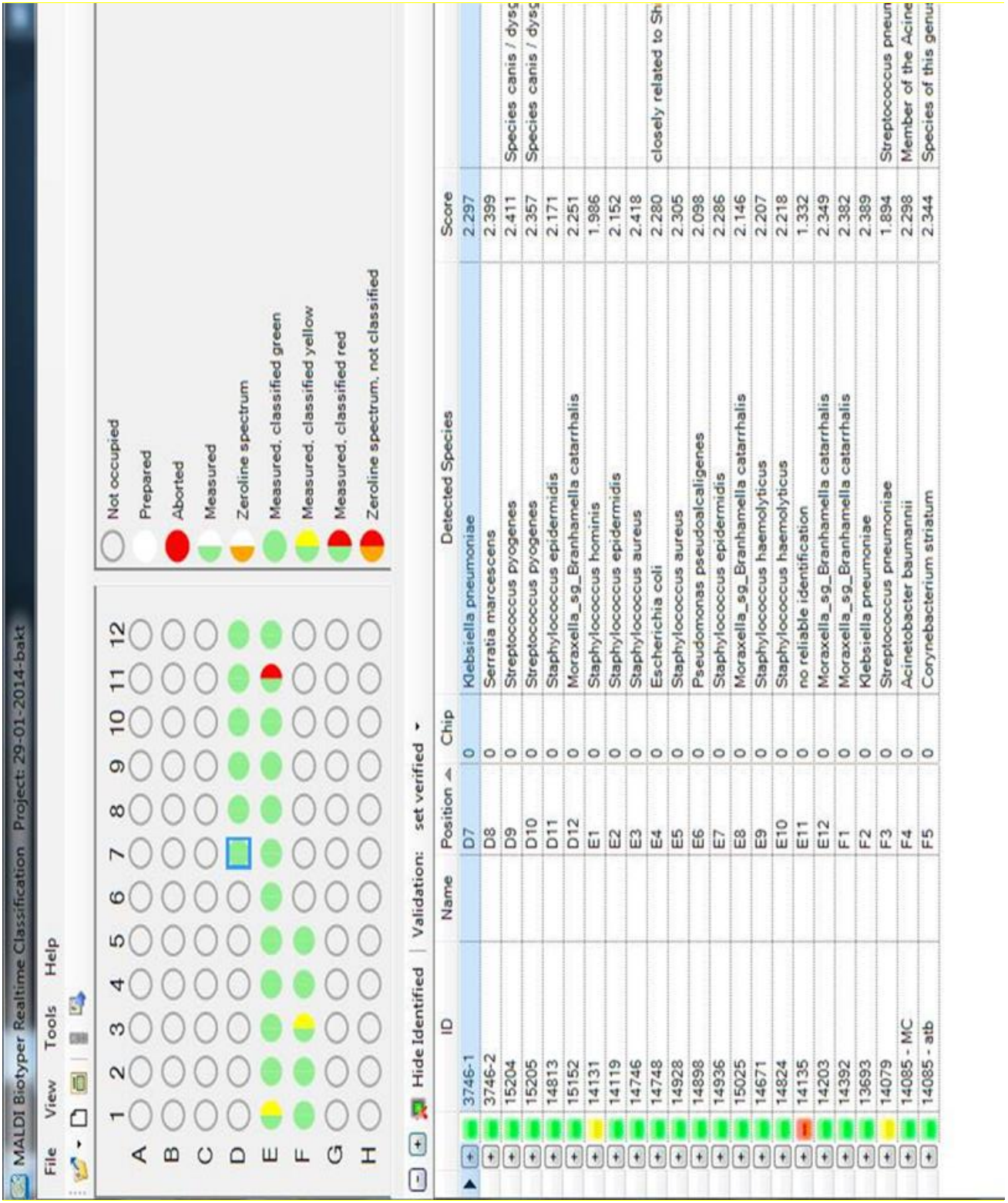
• Uzorak je prekriven s 1 µl HCCA matriksa, osušen i stavljen u analizator.

Postupak nakon stavljanja uzorka u analizator:

Definiran je projekt, što predstavlja naziv koji stroj daje skupini analiza koje se sukcesivno odvijaju na istoj pločici, a rezultati dobivaju zajedno na istom ispisu. Analit, odnosno pločica od nehrđajućeg čelika na kojoj su dodane kolonije mikroorganizama i matriks je postavljena u za to predviđenu komoru, odabrana je baza podataka i započeta analiza. Nakon nekoliko desetaka sekundi, rezultati su se pojavljivali na ekranu monitora (slike 11 i 11.1). Za analizu jednog uzorka potrebno je oko 90 sekundi.



Slika 11. Prikaz postupka analize – korištenje aplikacije za analizu mikroorganizama (MALDI Biotyper 3.0)



Slika 11.1. Prikaz rezultata MALDI-TOF: crveni kružić-analiza je prekinuta, zeleno-mjerenje učinjeno (zeleni kružić može biti klasificiran zeleno i žuto, ovisno o uspješnosti identifikacije).

Vrijednosti rezultata pouzdanosti (engl. Confidence score) veće od 2.0 smatralo se sigurnom identifikacijom, vrijednosti rezultata pouzdanosti od 1.7 do 1.99 smatralo se srednje pouzdanom identifikacijom, a vrijednosti rezultata pouzdanosti ispod 1.699 smatrale su se nepouzdanom identifikacijom te nisu uzimani u daljnju analizu (slika 12).

Range	Interpretation	Color
2.00-3.00	High Confidence Identification	Green
1.70-1.99	Low Confidence Identification	Yellow
< 1.70	No Organism Identification Possible	Red

Slika 12. Značenje boja u interpretaciji rezultata (od velike vjerojatnosti identifikacije mikroorganizama do nepouzdane identifikacije).

3.7. Statistička analiza

Određivanje potrebne veličine uzorka napravljeno je pomoću licenciranog programa STATISTICA ver. 6.1., (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Korišten je programski modul engl. Power Analysis-Sample Size Calculation.

Veličina uzorka je određena za testiranje statističke razlike između broja mikroorganizama mjerenih u tri vremenska razdoblja prije i nakon transplantacije bubrega koristeći analizu varijance (ANOVA). Veličina uzorka je određena uz pretpostavku da će se statističko testiranje provesti na razini značajnosti 95% (Alpha = 0.05), da je snaga testa 80% (Power Goal = 0.80) i da je očekivana razlika broja mikroorganizama mjerenih u tri vremenska razdoblja trećina standardnog odstupanja (RMSSE = 0.33).

Za statističku obradu podataka koristio se licencirani programski paket STATISTICA ver. 6.1., (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Za opis uzorka primijene su standardne metode deskriptivne statistike (aritmetička sredina, medijan, standardna devijacija, raspon) te frekvencijske tablice za prikaz opisnih parametara. Za testiranje statističke razlike u vrijednostima kvantitativnih varijabli između tri uzorka definiranih s tri vremenska razdoblja praćenja bolesnika koristila se analiza varijance (ANOVA). Za testiranje statističke razlike u vrijednostima kvantitativnih varijabli između skupina definiranim kategorijama opisnih parametara koristio se Studentov t-test. Za procjenu povezanosti pojedinih kvantitativnih obilježja koristila se metoda linearne regresije.

Rezultati dobiveni statističkom obradom prikazali su se grafički i numerički (tabelarno). Statističko testiranje provedeno je na razini značajnosti od 95 % ($\alpha = 0.05$).

4. REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Sudionici

4.1.1. Sociodemografska obilježja

Od ukupno 50 bolesnika koji su bili transplantirani i uključeni u ovo istraživanje, analizirani su uzorci 46 bolesnika. Kod 4 bolesnika uzorci C se nisu mogli dobiti tako da su oni isključeni iz studije. Od navedena 4 bolesnika 2 su umrla prije davanja uzorka C, jedan zbog komplikacija same transplantacije, a jedan zbog komplikacija ileusa, dok su 2 bolesnika kontrolirana u drugim centrima i nisu došli na kontrolu kod nas da bi im se mogao uzeti uzorak C. Od 46 bolesnika, bilo je 16 žena (34.8 %) i 30 muškaraca (65.2 %). Prosječna dob bolesnika je bila 54.1 godinu (od 32 do 71 godinu) (tablica 1).

Četrdeset dva (91.3 %) bolesnika su imala vaskularni pristup za dijalizu (39 bolesnika je imalo AVF, 2 bolesnika su imala Tesio® kateter, dok je 1 bolesnik imao Hickman® kateter za dijalizu), a 4 (8.7 %) bolesnika su imala kateter za peritonejsku dijalizu. Uspoređujući ove dvije skupine, broj bolesnika koji su imali kateter za peritonejsku dijalizu je bio premali da bi se mogla napraviti statistička analiza. Prosječno vrijeme koje su bolesnici proveli na dijalizi je bilo 39.3 mjeseci (od 4 do 216 mjeseci) (tablica 1). Od ukupno 46 bolesnika, 21 (45.6 %) bolesnik je bio na dijalizi ≤ 2 godine, a 25 (53.3 %) bolesnika su bili na dijalizi > 2 godine.

4.1.2. Oralni status i oralno zdravlje

Bolesnici su prali zube prosječno 1.9 puta na dan (od 1 do 3 puta). Većina bolesnika, njih 26 (56.5%) je prala zube 2 puta na dan. Godišnje su na kontrolu liječniku dentalne medicine išli prosječno 1.2 puta (od 0 do 3 puta godišnje). Prosječno su imali 18.5 zuba (od 0 do 32 zuba), prosječni broj zubnih ispuna je bio 3.6 (od 0 do 11 zubnih ispuna), prosječni broj mostova/proteza je bio 0.7 (od 0 do 4), a prosječni broj kruna je bio 0.5 (od 0 do 11), dok je prosječni broj implantata bio 0.1 (od 0 do 1). Osam bolesnika (17.4 %) nije imalo zubne ispune, dok je 38 bolesnika (82.6%) imalo jedan ili više zubnih ispuna. Analizirajući broj mostova, 25 bolesnika (54.3 %) nije imalo, a ostalih 21 bolesnik (45.6 %) je imao jedan ili više mostova/proteze. Krune nije imalo 34 bolesnika (73.9 %), dok je ostalih 12 bolesnika (26.1%) imalo jednu ili više kruna. Od 46 bolesnika, 3 (6.5 %) su imala zubni implantat, dok ostali nisu (tablica 1).

Od ukupno 46 bolesnika, 6 (13 %) je imalo šećernu bolest prije transplantacije bubrega, a 40 (87 %) bolesnika nisu imala šećernu bolest. Nakon transplantacije bubrega još su 3 (6.5 %) bolesnika dobila šećernu bolest. Za liječenje šećerne bolesti 7 (15.2 %) je koristilo inzulin, dok su 2 (4.3%) bolesnika koristila oralne antidijabetike.

Prosječno vrijeme uzimanja uzoraka B nakon transplantacije bubrega je bilo 12.4 dana (od 7 do 19 dana), dok je prosječno vrijeme uzimanja uzoraka C bilo 17.8 tjedana (od 11 do 25 tjedana) nakon transplantacije bubrega.

Tablica 1. Opći podaci i podaci o stomatološkom statusu bolesnika.

	Sr. vrijed.	Medijan	Minimum	Maksimum	Std. dev.
Godine	54.1	54	32	71	10.14
Vrijeme na dijalizi u mjesecima	39.3	25.5	4	216	39.59
Broj pranja zuba/dan	1.9	2	1	3	0.66
Broj posjeta doktoru dentalne med./godišnje	1.2	1	0	3	0.71
Broj zuba	18.5	20	0	32	9.49
Broj zubnih ispuna	3.6	3	0	11	2.79
Broj mostova/proteza	0.7	0	0	4	0.98
Broj kruna	0.5	0	0	11	1.68
Broj zubnih implantata	0.1	0	0	1	0.25

4.2. Izolirani mikroorganizmi

4.2.1. Analiza prisutnosti različitih mikroorganizama

U svim uzorcima bolesnika izolirano je 187 različitih rodova mikroorganizama, odnosno ukupno 1812 vrsta mikroorganizama (tablica 2). Od 46 bolesnika u uzorcima A ukupno je izolirano 597 vrsta mikroorganizama, prosječno 13.0 (od 6 do 19 mikroorganizama), u uzorcima B ukupno je izolirana 581 vrsta mikroorganizam, prosječno 12.6 (od 4 do 19 mikroorganizama), a u uzorcima C, također od 46 bolesnika ukupno je izolirano 634 vrste mikroorganizama, prosječno 13.8 (od 8 do 19 mikroorganizama).

Sukladno dobivenim rezultatima velikog broja vrsta mikroorganizama, a sa svrhom ispunjavanja ciljeva doktorskog rada, mikroorganizmi su svrstani u logične skupine.

Izolirane mikroorganizme smo svrstali u odgovarajuće skupine tako da smo dobili 9 skupina za svaki od uzoraka (A, B i C).

Mikroorganizmi su grupirani u skupine:

a) skupina 1: viridans-streptokoki i njima srodne bakterije

b) skupina 2: enterobakterije

c) skupina 3: gram-pozitivne fakultativno aerobne/anaerobne bakterije (koki i štapići)

d) skupina 4: gram-negativni štapići/kokobacili (aerobni i fakultativno anaerobni)

e) skupina 5: gram-negativni anaerobi-koki, kokobacili

f). skupina 6: gram-pozitivne anaerobne bakterije

g) skupine 7: kapnofilne bakterije

h) skupina 8: kvasci

i) skupina 9: plijesni

Tablica 2. U tablici su navedeni svi rodovi i vrste identificiranih mikroorganizama, abecednim redom, ukoliko identifikacija nije bila moguća do vrste, upisana je oznaka spp.

Rod	Vrsta
A	
Abiotrophia	*defectiva*
Achromobacter	*xylosoxidans*
Acinetobacter	*ursingii* *crystallopoiete* *guillouiae* *johnsonii* *lwoffii* *pittii*
Actinocorallia	*libanotica*
Actinomyces	*curvatus* *graevenitzii* *naeslundii* *odontolyticus* *oris*
Aeromonas	spp. *encheleia* *schubertii*
Aggregatibacter	*aphrophilus* *segnis*
Alloscardovia	*omnicolens*
Arthobacter	*creatinolyticus* *gangotriensis* *psychrophenolicus* *sulfurens* *tumbae*
Aspergillus	*candidus*
Atopobium	*parvulum* *rimae*

B	
Bergeyella	*zoohelcum*
Bifidobacterium	*breve* *longum*
Burkholderia	*anthina* *cepacia* *thailandensis*
C	
Candida	*albicans* *glabrata*
Campylobacter	*concisus* *curvus* *showae*
Capnocytophaga	*gingivalis* *granulosa* *sputigena* *ochracea*
Citrobacter	*braakii* *freundii*
Clostridium	*baratii* *chacivoei* *cochlearium* *haemolyticum* *innocuum* *septicum*
Comamonas	*testosteroni*
Corynebacterium	*amycolatum* *durum* *jeikeum* *striatum*
D	
Dechelobacter	*nodosus*
E	
Eikenella	*corrodens*
Empedobacter	*brevis*

Enterobacter	*cloacae*
Enterococcus	*faecalis* *faecium*
Escherichia	*coli*
Eubacterium	*yurii*
Exiguobacterium	spp.
F	
Filifactor	*villosum*
Flavobacterium	*hibernum* *hydatis* *libernum*
Fusobacterium	*canifelinum* *naviforme* *nucleatum* *periodonticum*
G	
Gemella	*haemolysans* *morbillorum* *sanguinis*
Granulicatella	*adiacens* *elegans*
H	
Haemophilus	*haemolyticus* *parahaemolyticus* *parainfluenzae*
Herbaspirillum	*huttiense*
Hydrogenophaga	*pseudoflava*
K	
Klebsiella	*oxytoca* *pneumoniae*
Kytococcus	*sedentarius*

L	
Lachnoanaerobaculum	*orale* *saburreum* *umeaense*
Lactobacillus	*brevis* *coryniformis* *fermentum* *gasseri* *gastricus* *helveticus* *mali* *paracasei* *pentosus* *rhamnosus* *sakei* *sharpeae* *vini*
Leptotrichia	spp. *trevisanii* *wadei*
M	
Megasphaera	*micronuciformis*
Micrococcus	*luteus*
Mycoplasma	*aretinini* *arginini*
N	
Neisseria	spp. *cinerea* *elongata* *flavescens* *lactamica* *macacae* *meningitidis* *mucosa* *perflava* *sicca* *Subflava*
P	
Paenibacillus	*validus*
Parvimonas	*micra*

Parascardovia	*denticolens*
Parvimonas	*micra*
Pasteurella	*pneumotropica*
Porphyromonas	*gingivalis*
Prevotella	*buccae* *denticola* *histicola* *intermedia* *maculosa* *melaninogenica* *nigrescens* *nanceiensis* *oulorum* *pallens*
Propionibacterium	*acnes*
Pseudomonas	*aeruginosas* *corrugata* *migulae* *oryzihabitans* *poal*
R	
Raoultella	*ornithinolytica*
Rhizobium	*radiobacter*
Rothia	*aeria* *dentocariosa* *mucilaginosa*
S	
Serratia	*liquefaciens* *marcescens* *parasavolinis*
Selenomonas	*infelix* *sputigena*
Solobacterium	*moorei*
Staphylococcus	*aureus*

	capitis
	epidermidis
	haemolyticus
	hominis
	pasteuri
Stenotrophomonas	*maltophilia*
Streptococcus	*anginosus*
	australis
	constellatus
	cristatus
	downei
	gordonii
	infantis
	massiliensis
	mitis
	mutans
	oralis
	parasanguinis
	penumoniae
	perioris
	salivarius
	sanguinis
	sinensis
	vestibularis
Streptomyces	*hirsutis*
T	
Thauera	*aromatica*
V	
Veillonella	*atypica*
	denticariosi
	dispar
	montpellierensis
	parvula
	rogosa

Pretransplantacijski uzorci (uzorci A)

U uzorcima A ukupno je izolirano 199 vrsta mikroorganizma iz skupine 1, prosječno 4.3 vrsta (od 2 do 8) po bolesniku, 9 vrsta mikroorganizma iz skupine 2, prosječno 0.2 vrsta (od 0 do 1) po bolesniku, 24 vrsta mikroorganizma iz skupine 3, prosječno 0.5 vrsta (od 0 do 3) po bolesniku, 154 vrsta mikroorganizma iz skupine 4, prosječno 3.3 vrsta (od 1 do 7) po bolesniku, 125 vrsta mikroorganizma iz skupine 5, prosječno 2.7 vrsta (od 0 do 8) po bolesniku, 38 vrsta mikroorganizma iz skupine 6, prosječno 0.8 vrsta (od 0 do 3) po bolesniku, 38 vrsta mikroorganizma iz skupine 7, prosječno 0.8 vrsta (od 0 do 2) po bolesniku, 9 vrsta mikroorganizma iz skupine 8, prosječno 0.2 vrsta (od 0 do 1) po bolesniku, 1 vrsta mikroorganizma je izoliran iz skupina 9. (tablica 3 i slika 13).

Rani posttransplantacijski uzorci (uzorci B)

Četrnaest (30.4 %) bolesnika je uzimalo antibiotike za liječenje infekcije (od toga je 6 bolesnika uzimalo rezervne antibiotike) u vrijeme uzimanja uzorka B, a 32 (69.4 %) bolesnika su uzimali 400 mg sulfametoksazola i 80 mg trimetoprima zbog prevencije oportunističkih infekcija svaki drugi dan. Trideset i devet (84.8 %) bolesnika je uzimalo takrolimus (Prograf®), dok je 7 (15.2 %) bolesnika uzimalo ciklosporin (Sandimmun®). Mikofenolnu kiselinu u obliku natrijevog mikofenolata (Myfortic®) je uzimalo 28 (60.9 %) bolesnika, a mofetilmikofenolat (Cellcept®) je uzimalo 18 (39.1 %) bolesnika. U vrijeme uzimanja uzoraka B, 40 bolesnika (86.9 %) nije imalo znakova respiratornog infekta, dok je 4 bolesnika (8.7 %) imalo simptome prehlade, a 2 bolesnika (4.3 %) simptome i kliničku sliku bronhitisa.

U uzorcima B je ukupno izolirano 207 vrsta mikroorganizma iz skupine 1, prosječno 4.5 vrsta (od 0 do 9) po bolesniku, 4 vrsta mikroorganizma iz skupine 2, prosječno 0.1 vrsta (od 0 do 1) po bolesniku, 44 vrsta mikroorganizma iz skupine 3, prosječno 1.0 vrsta (od 0 do 4) po bolesniku, 113 vrsta mikroorganizma iz skupine 4, prosječno 2.5 vrsta (od 0 do 5) po bolesniku, 108 vrsta mikroorganizma iz skupine 5, prosječno 2.3 vrsta (od 0 do 6) po bolesniku, 64 vrsta mikroorganizma iz skupine 6, prosječno 1.4 vrsta (od 0 do 5) po bolesniku, 35 vrsta mikroorganizma iz skupine 7, prosječno 0.8 vrsta (od 0 do 3) po bolesniku, 6 vrsta mikroorganizma iz skupine 8, prosječno 0.1 vrsta (od 0 do 1) po bolesniku, iz skupine 9 nisu izolirani mikroorganizmi u B uzorcima naših bolesnika (tablica 3 i slika 13).

Kasni posttransplantacijski uzorci (uzorci C)

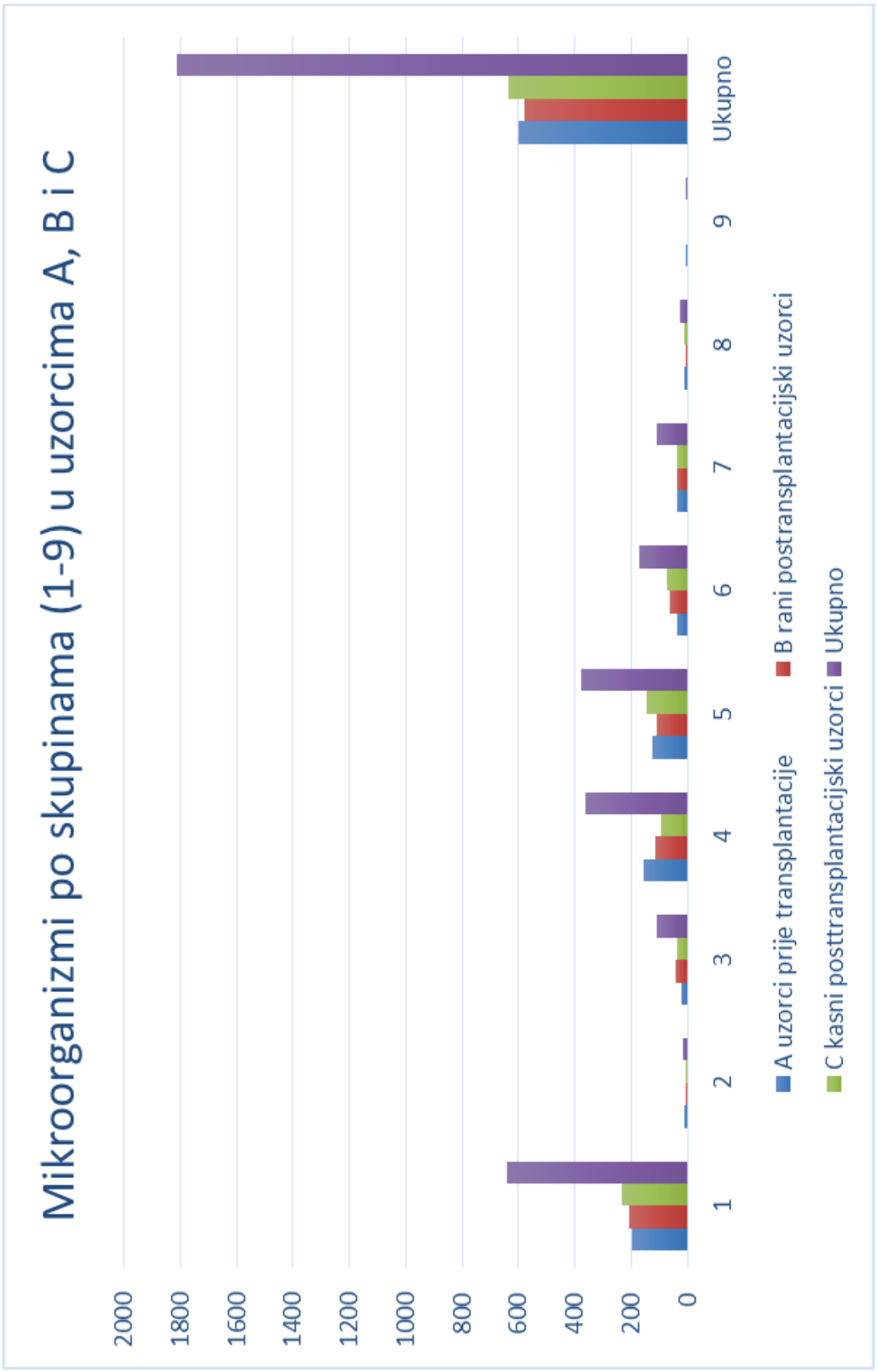
Deset (21.7 %) bolesnika je uzimalo antibiotike (od toga je 1 bolesnik uzimao rezervne antibiotike) u vrijeme uzimanja uzorka C za liječenje infekcije, a 36 (78.2 %) bolesnika je uzimalo 400 mg sulfametoksazola i 80 mg trimetoprima zbog prevencije oportunističkih infekcija svaki drugi dan. Svi su bolesnici i dalje nastavili istu imunosupresivnu terapiju kao i u vrijeme uzimanja uzoraka B. U vrijeme uzimanja uzoraka C, 39 bolesnika (84.8 %) nije imalo znakova respiratornog infekta, dok je 5 bolesnika (10.8 %) imalo simptome prehlade, 1 bolesnik (2.2 %) simptome te kliničku sliku bronhitisa dok je 1 bolesnik (2.2 %) imao kliničku i radiološku sliku upale pluća.

U uzorcima C je ukupno izolirano 233 vrsta mikroorganizma iz skupine 1, prosječno 5.1 vrsta (od 2 do 10) po bolesniku, 6 vrsta mikroorganizma iz skupine 2, prosječno 0.1 vrsta (od 0 do 1) po bolesniku, 39 vrsta mikroorganizma iz skupine 3, prosječno 0.8 vrsta (od 0 do 4) po bolesniku, 93 vrsta mikroorganizma iz skupine 4, prosječno 2.0 vrsta (od 0 do 5) po bolesniku, 147 vrsta mikroorganizma iz skupine 5, prosječno 3.2 vrsta (od 0 do 7) po bolesniku, 71 vrsta mikroorganizama iz skupine 6, prosječno 1.5 vrsta (od 0 do 4) po bolesniku, 35 vrsta mikroorganizma iz skupine 7, prosječno 0.8 vrsta (od 0 do 2) po bolesniku, 10 vrsta mikroorganizma iz skupine 8, prosječno 0.2 vrsta (od 0 do 1) po bolesniku, dok iz skupine 9 nisu izolirani mikroorganizmi u C uzorcima naših bolesnika (tablica 3 i slika 13).

Tablica 3. Mikrobiološki podaci bolesnika, pojedinačni, prosječni i ukupni broj vrsta identificiranih mikroorganizama po skupinama od 1 do 9 u uzorcima A (prije transplantacije bubrega), B (rani posttransplantacijski uzorci) i C (kasni posttransplantacijski uzorci).

Skupina	**uzorci**	**od – do**	**prosječno**	**ukupno**	**p***
1. viridans-streptokoki i njima srodne bakterije	A	2-8	4.3	199	0,594
	B	0-9	4.5	207	0,025
	C	2-10	5.1	233	0,085
	ukupno			**639**	
2. enterobakterije	A	0-1	0.2	9	0,134
	B	0-1	0.1	4	0,367
	C	0-1	0.1	6	0,547
	ukupno			**19**	
3. gram-pozitivne fakultativno aerobne/anaerobne bakterije (koki i štapići)	A	0-3	0.5	24	0,049
	B	0-4	1	44	0,139
	C	0-4	0.8	39	0,621
	ukupno			**106**	
4. gram-negativni štapići/kokobacili (aerobni i fakultativno anaerobni)	A	1-7	3.3	154	0,004
	B	0-5	2.5	113	0,00003
	C	0-5	2	93	0,159
	ukupno			**360**	
5. gram-negativni anaerobi-koki, kokobacili	A	0-8	2.7	125	0,288
	B	0-6	2.3	108	0,170
	C	0-7	3.2	147	0,016
	ukupno			**380**	
6. gram-pozitivne anaerobne bakterije	A	0-3	0.8	38	0,006
	B	0-5	1.4	64	0,001
	C	0-4	1.5	71	0,457
	ukupno			**173**	
7. kapnofilne bakterije	A	0-2	0.8	38	0,698
	B	0-3	0.8	35	0,698
	C	0-2	0.8	35	1,000
	ukupno			**108**	
8. kvasci	A	0-1	0.2	9	0,421
	B	0-1	0.1	6	0,788
	C	0-1	0.2	10	0,284
	ukupno			**25**	
9. plijesni	A	1		1	/
	B	0		0	/
	C	0		0	/
	ukupno			**1**	
ukupno				**1812**	

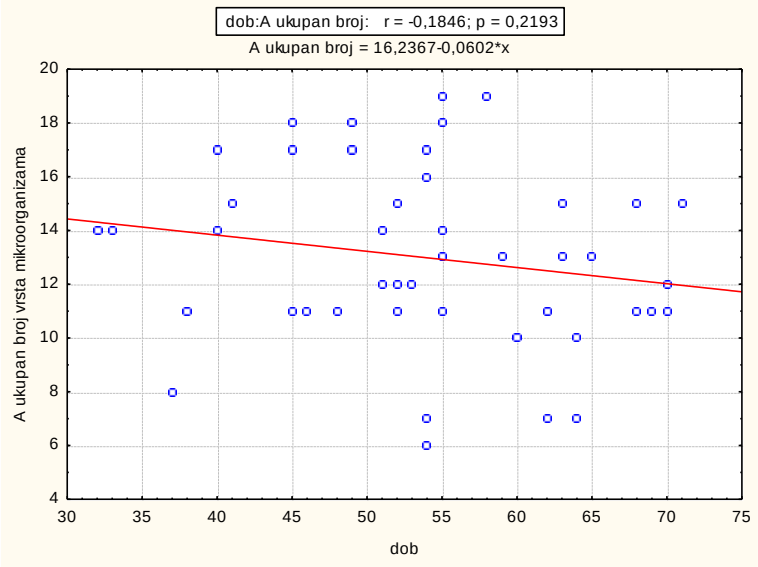
*p vrijednosti: A vs B, A vs C, B vs C



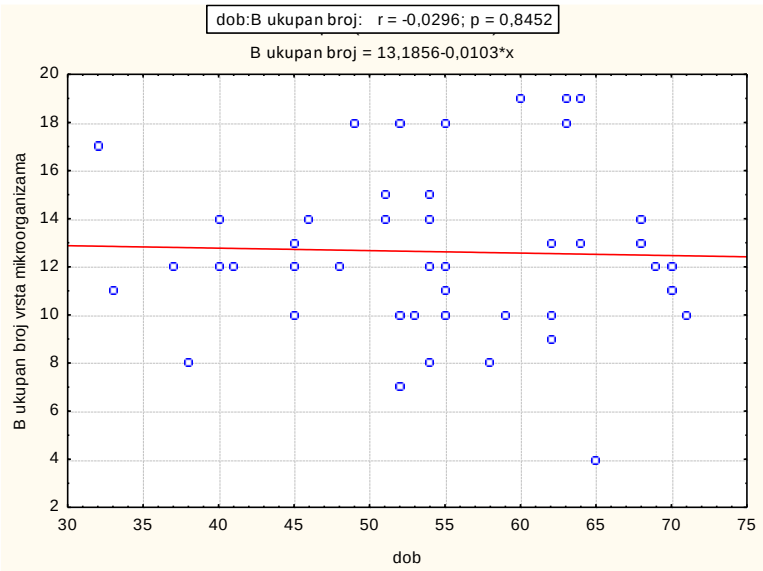
Slika 13. Mikrobiološki podaci bolesnika, ukupni broj vrsta identificiranih mikroorganizma po skupinama od 1 do 9 u uzorcima A, B i C.

4.2.2. Analiza mikroorganizama s obzirom na dob ispitanika

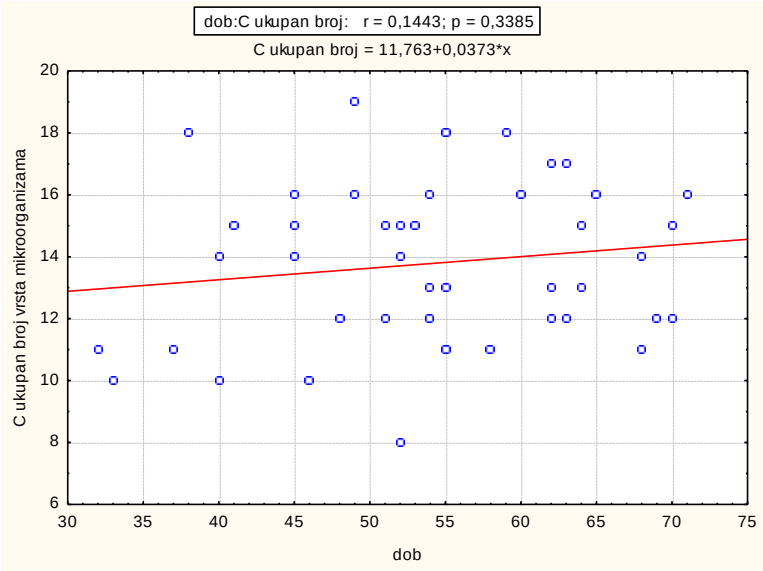
Kada smo analizirali broj vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima A, B i C s obzirom na dob ispitanika, nismo našli statistički značajne razlike (p = 0.2, p = 0.8, p = 0.3) (slike 14.1, 14.2, 14.3)



Slika 14.1. Prikaz ukupnog broja vrsta identificiranih mikroorganizama iz uzoraka A i dobi bolesnika.



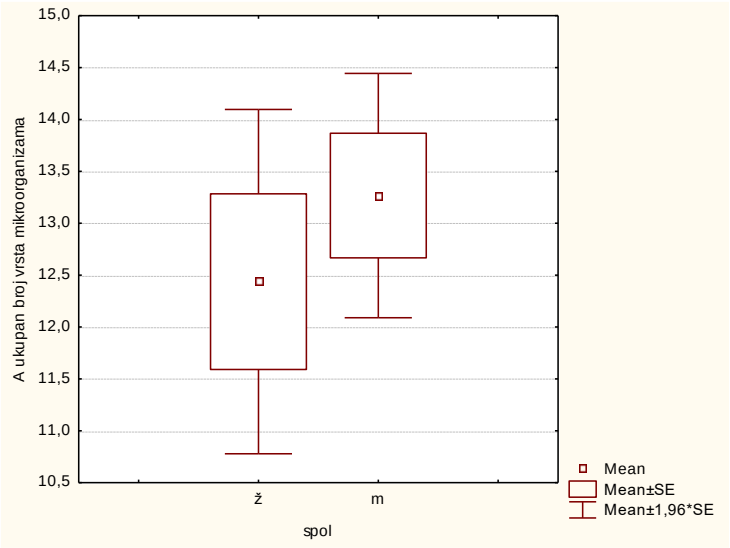
Slika 14.2. Prikaz ukupnog broja vrsta identificiranih mikroorganizama iz uzoraka B i dobi bolesnika.



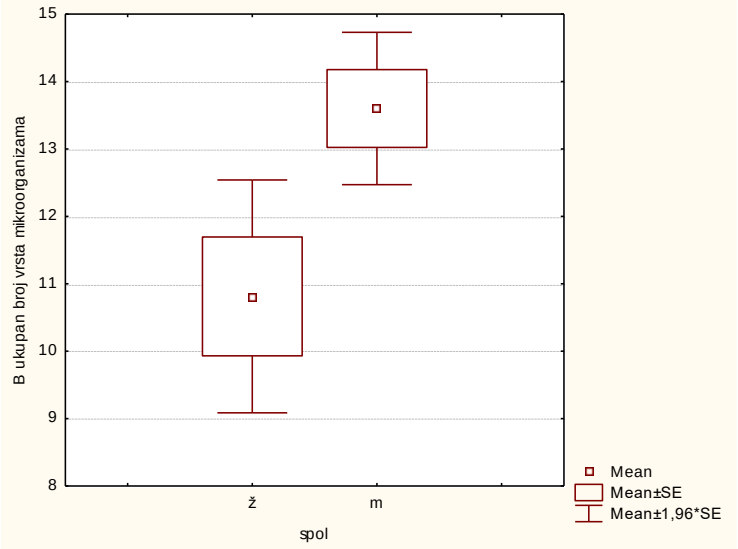
Slika 14.3. Prikaz ukupnog broja vrsta identificiranih mikroorganizama iz uzoraka C i dobi bolesnika.

4.2.3. Analiza mikroorganizama s obzirom na spol ispitanika

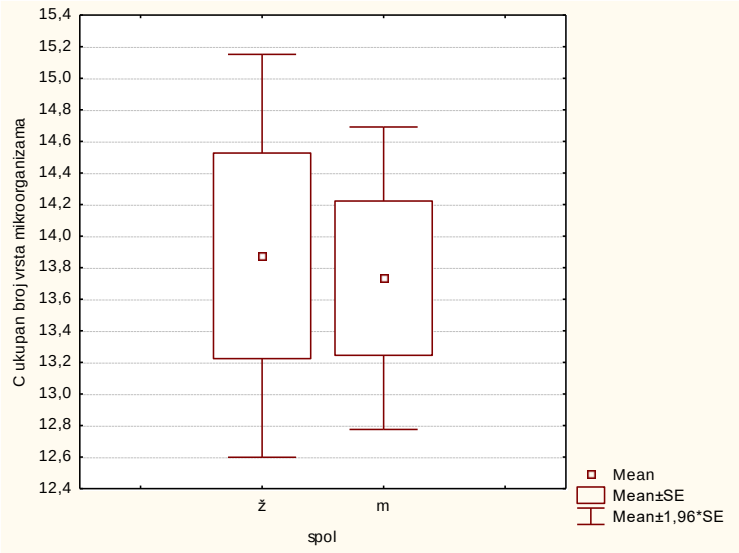
Kada smo analizirali broj vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima A, B i C s obzirom na spol ispitanika, u uzorcima B smo našli statistički značajnu razliku (p = 0.009), dok za uzorke A i C nismo našli statistički značajnu razliku (p = 0.42 i p = 0.86) (slike 15.1, 15.2 i 15.3).



Slika 15.1. Prikaz ukupnog broja vrsta identificiranih mikroorganizama iz uzoraka A i spola ispitanika.



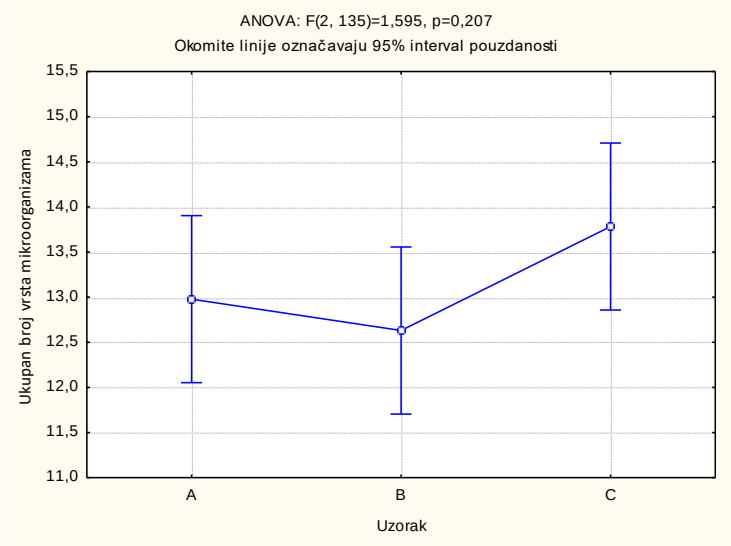
Slika 15.2. Prikaz ukupnog broja vrsta identificiranih mikroorganizama iz uzoraka B i spola ispitanika.



Slika 15.3. Prikaz ukupnog broja vrsta identificiranih mikroorganizama iz uzoraka C i spola ispitanika.

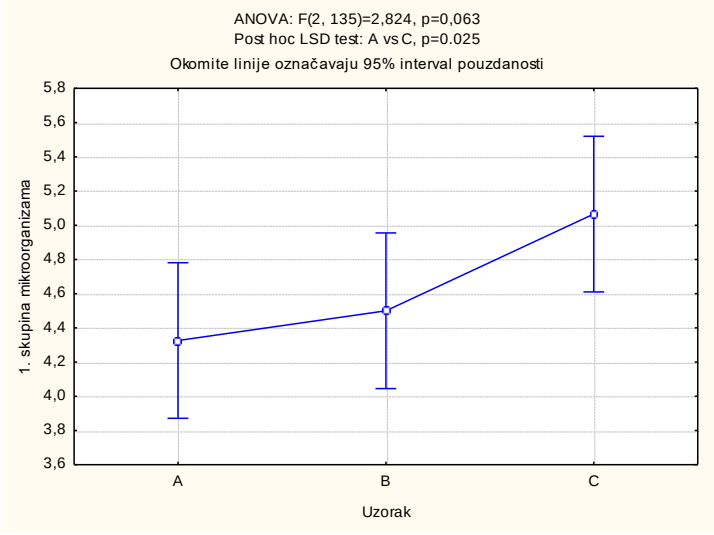
4.2.4. Analiza mikroorganizama po skupinama A, B i C.

Kada smo analizirali prosječni broj vrsta identificiranih mikroorganizama u svim skupinama (A, B i C), te ih međusobno usporedili nismo našli statistički značajnu razliku između skupina ($p = 0.2$) (slika 16).



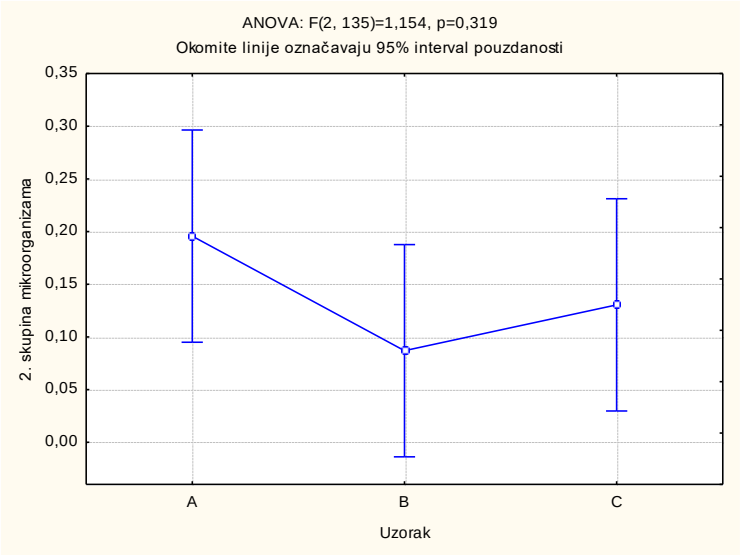
Slika 16. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama iz uzoraka A, B i C.

Međutim, kada smo analizirali razlike između uzoraka A, B i C s obzirom na vrstu mikroorganizama grupiranu po skupinama od 1 do 9, pokazano je da postoji statistički značajna razlika između uzoraka A i uzoraka C u broju vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 1 ($p < 0.05$ $p = 0.025$) (slika 17.1).



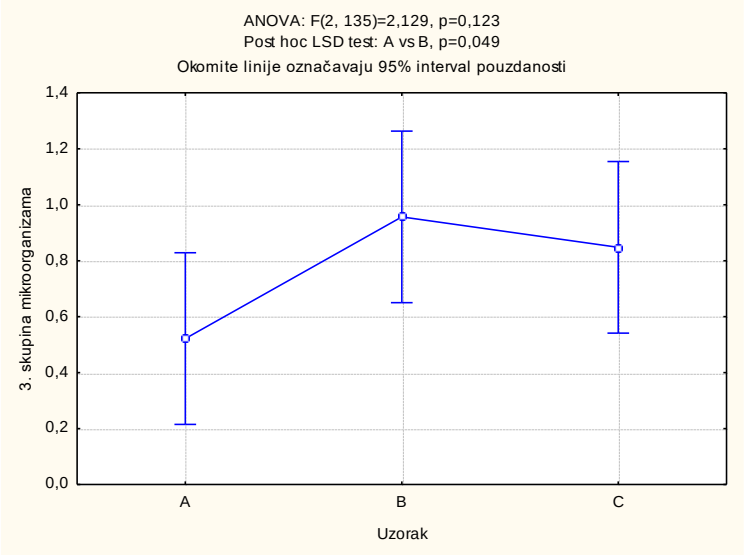
Slika 17.1. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 1 u uzorcima A, B i C.

Kada smo analizirali mikroorganizme iz skupine 2, nije nađena statistički značajna razlika između uzoraka A, B i C u broju vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 2 ($p > 0.05$ $p = 0.319$) (slika 17.2).



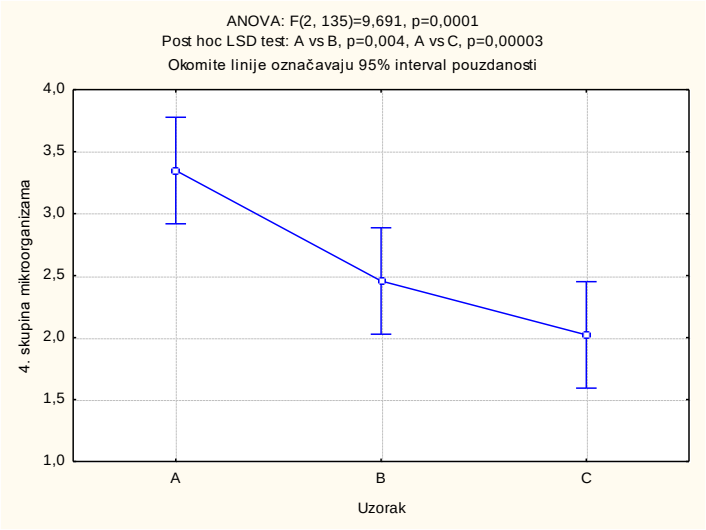
Slika 17.2. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 2 u uzorcima A, B i C.

Pokazano je također, da postoji statistički značajna razlika između uzoraka A i uzoraka B u broju vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 3 ($p < 0.05$, $p = 0.049$) (slika 17.3).



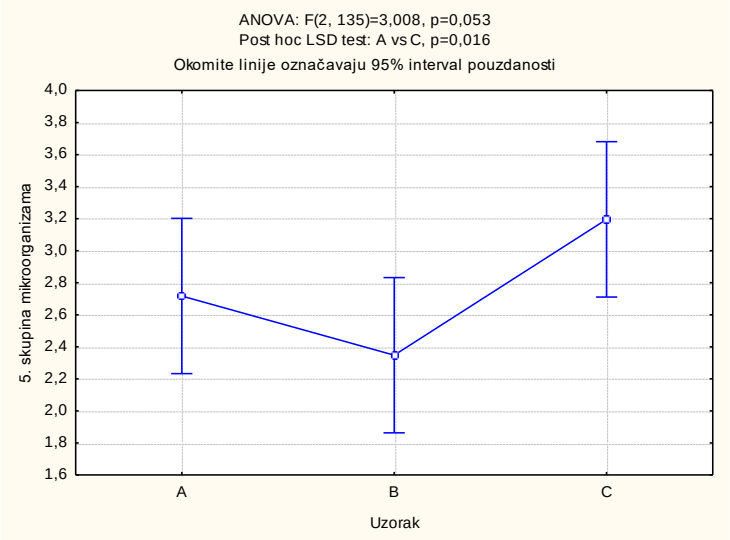
Slika 17.3. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 3 u uzorcima A, B i C.

Pokazano je i da postoji statistički značajna razlika između uzoraka A i uzoraka B ($p = 0.004$) i uzoraka A i uzoraka C ($p = 0.00003$) u broju vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 4 ($p < 0.05$) (slika 17.4).



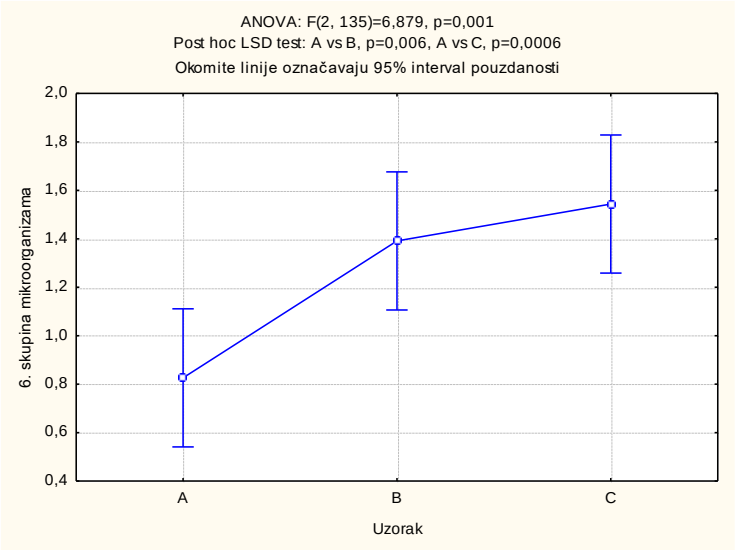
Slika 17.4. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 4 u uzorcima A, B i C.

I za mikroorganizme iz skupine 5 pokazano je da postoji statistički značajna razlika između uzoraka B i uzoraka C ($p < 0.05$, $p = 0.016$) (slika 17.5).



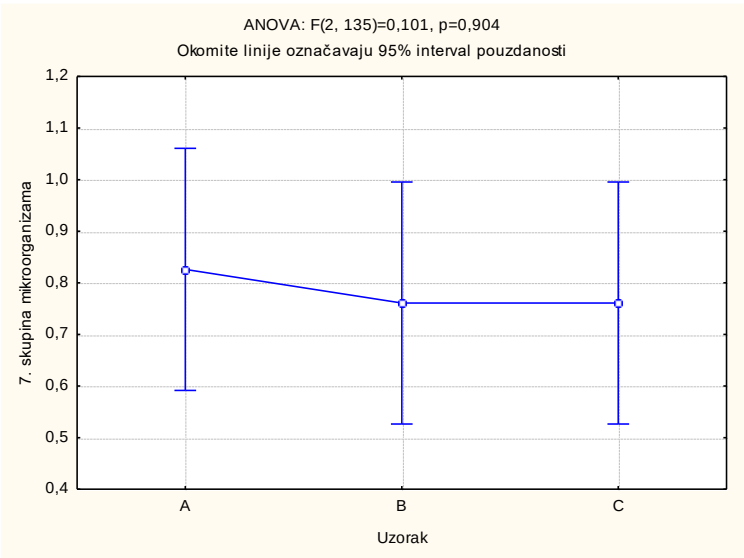
Slika 17.5. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 5 u uzorcima A, B i C.

Pokazano je također, da postoji statistički značajna razlika između uzoraka A i uzoraka B ($p = 0.006$) i uzoraka A i uzoraka C ($p = 0.0006$) u broju vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 6 ($p < 0.05$) (slika 17.6).

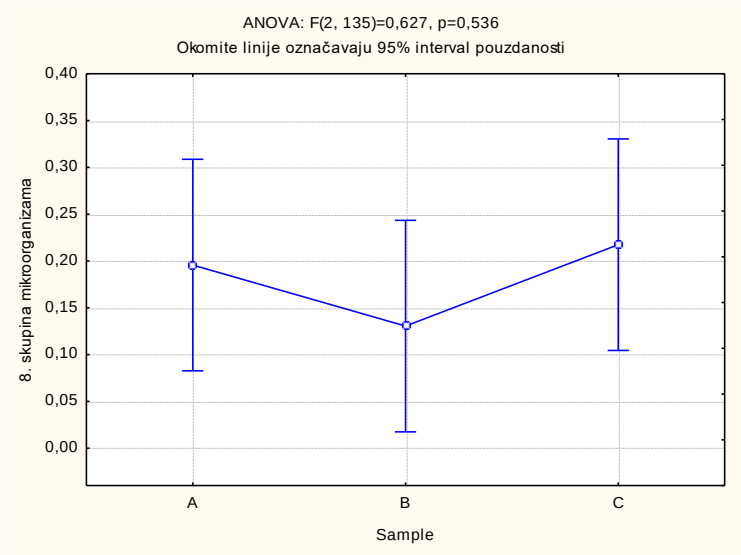


Slika 17.6. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 6 u uzorcima A, B i C.

Međutim, nije pokazna statistički značajna razlika između uzoraka A, B i C u broju vrsta identificiranih mikroorganizama za skupine 7 i 8. ($p > 0.05$, $p = 0.904$ i $p = 0.536$) (slike 17.7 i 17.8).



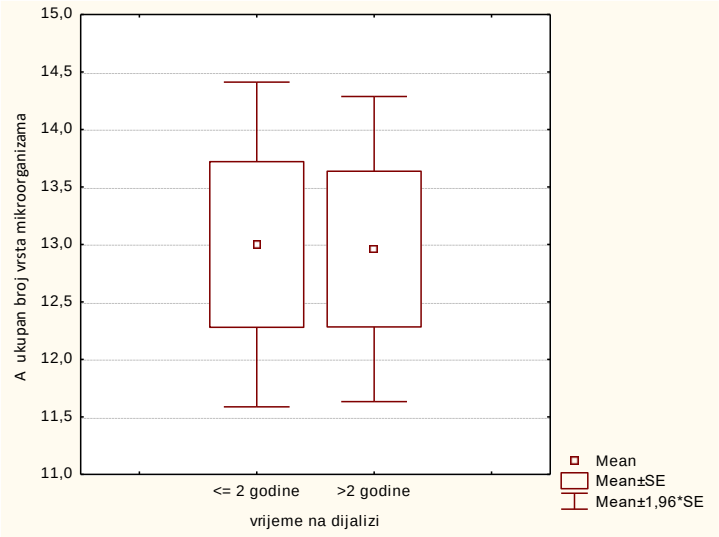
Slika 17.7. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 7 u uzorcima A, B i C.



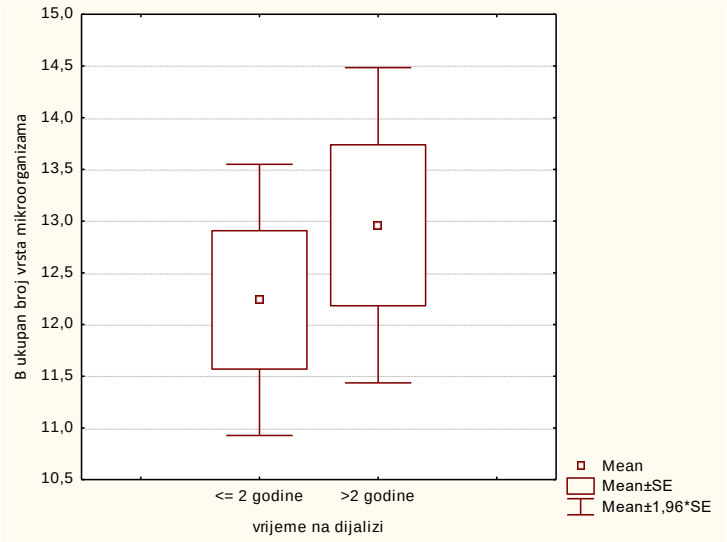
Slika 17.8. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine 8 u uzorcima A, B i C.

4.2.5. Analiza mikroorganizama i vremena provedenog na dijalizi.

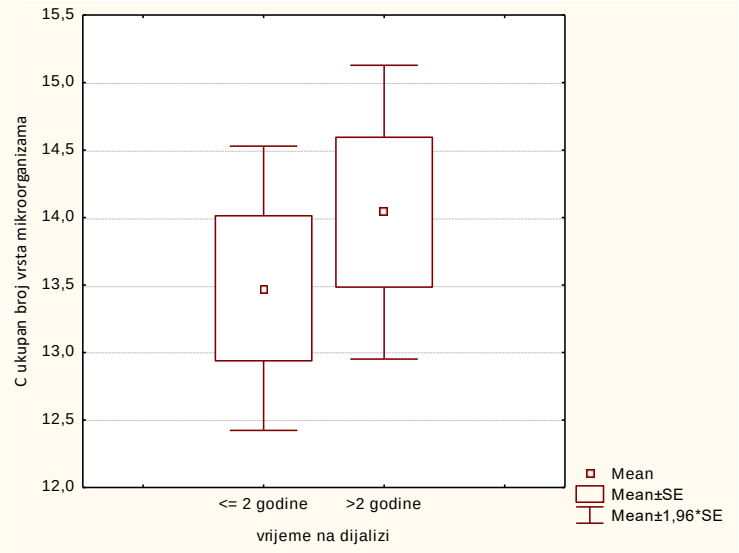
Uspoređujući vrijeme provedeno na dijalizi (≤ 2 godine, > 2 godine) te broj vrsta identificiranih mikroorganizama iz uzoraka A, B i C nije nađena statistički značajna povezanost između broja vrsta mikroorganizama kod bolesnika koji su bili na dijalizi manje ili 2 godine u odnosu na one koji su na dijalizi bili više od 2 godine ($p > 0.05$) (slike 18.1, 18.2 i 18.3).



Slika. 18.1. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine A u odnosnu na vrijeme provedeno na dijalizi (≤ 2 godine, > 2 godine).



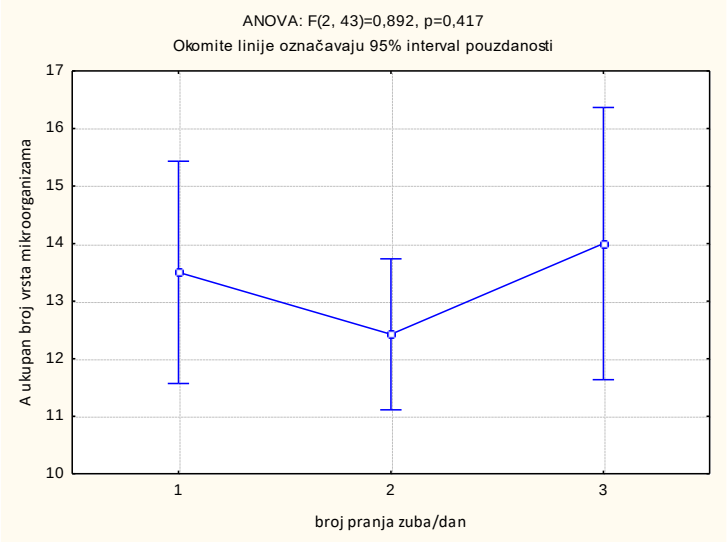
Slika 18.2. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine B u odnosnu na vrijeme provedeno na dijalizi (≤ 2 godine, > 2 godine).



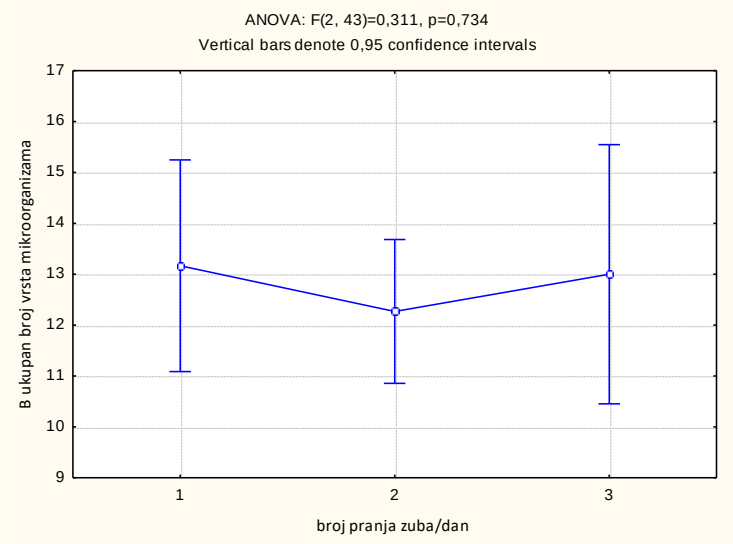
Slika 18.3 Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama skupine C u odnosnu na vrijeme provedeno na dijalizi (≤ 2 godine, > 2 godine).

4.2.3. Analiza mikroorganizama i učestalosti pranja zuba.

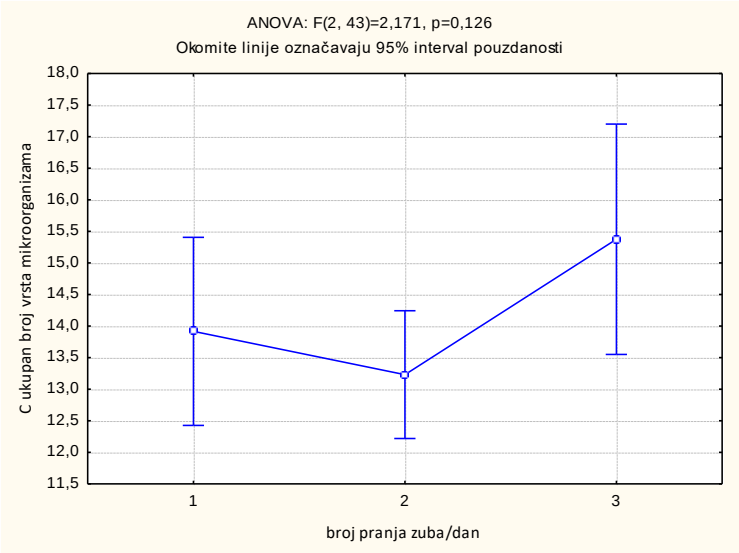
Uspoređujući učestalost pranja zuba na dan s brojem vrsta identificiranih mikroorganizama iz uzoraka A, B i C nije nađena statistički značajna povezanost između broja vrsta mikroorganizama i učestalosti pranja zuba ($p > 0.05$) (slike 19.1, 19.2 i 19.3).



Slika 19.1. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama iz skupine A i učestalosti pranja zuba na dan.



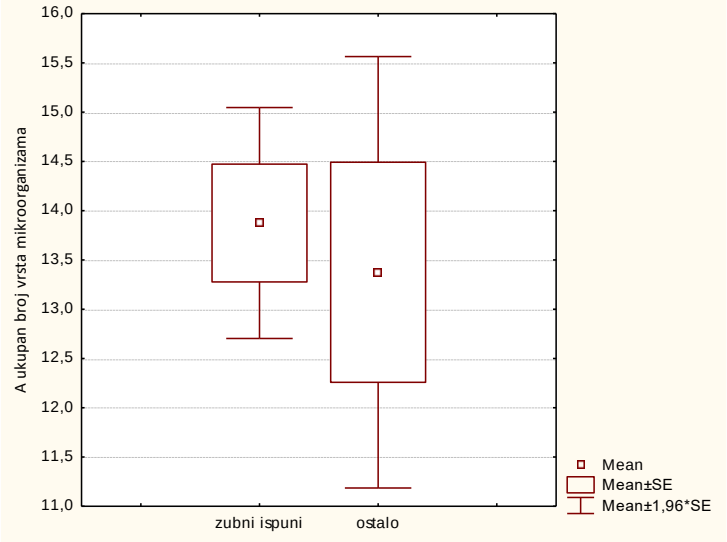
Slika 19.2. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama iz skupine B i učestalosti pranja zuba na dan.



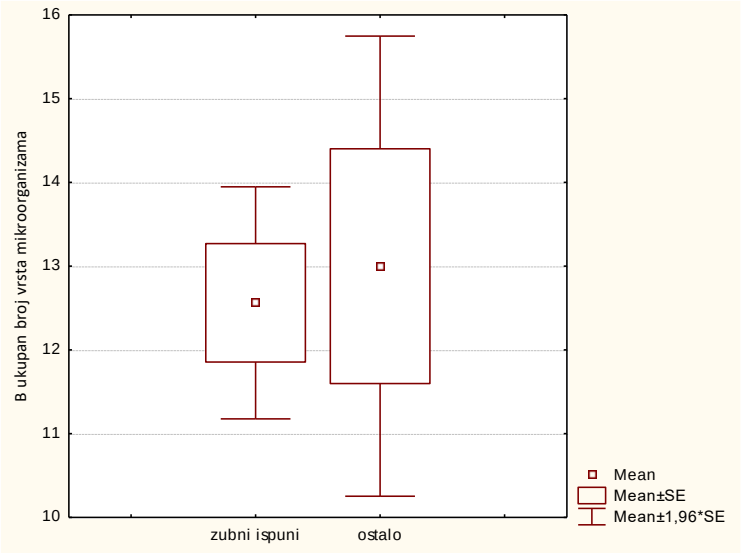
Slika 19.3. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama iz skupine C i učestalosti pranja zuba na dan.

4.2.7. Analiza mikroorganizama i stanja zubala

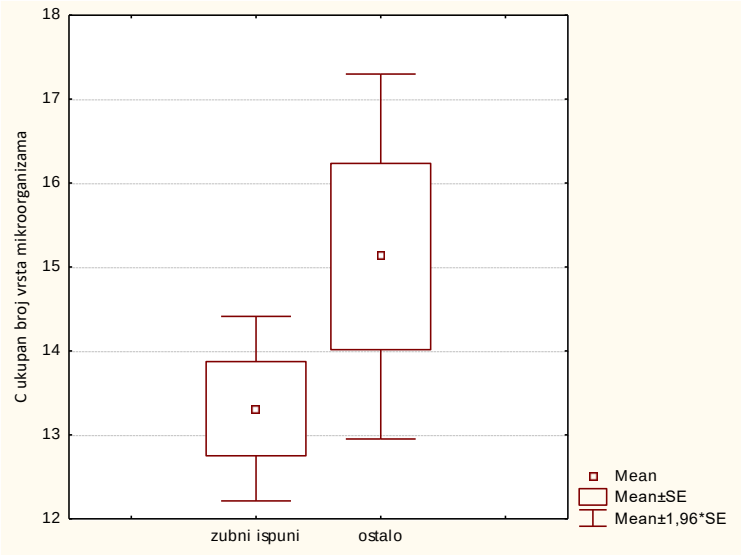
Nije nađena statistički značajna razlika između ispitanika koji su imali samo zubne ispune i ispitanika koji su imali mostove, krune, proteze i implantate u odnosu na broj vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima A, B i C ($p > 0.05$) (slike 20.1, 20.2 i 20.3).



Slika 20.1. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima A (zubni ispuni u usporedbi s mostovima, krunama, protezama i implantatima).



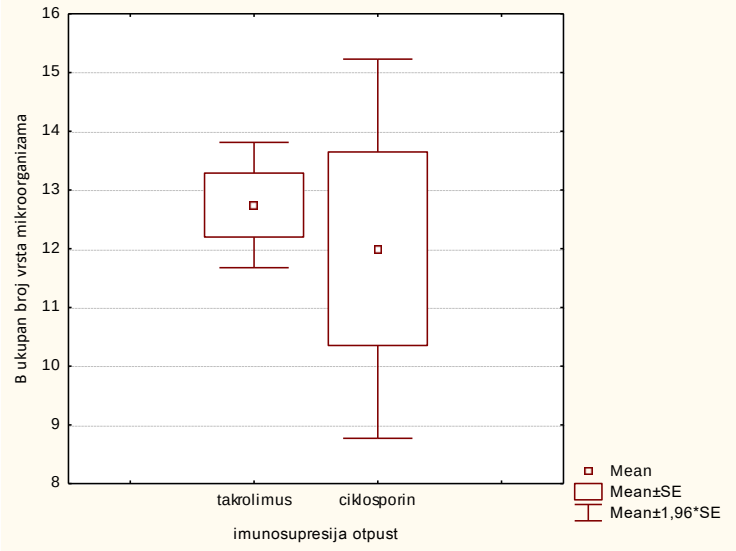
Slika 20.2. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima B (zubni ispuni u usporedbi s mostovima, krunama, protezama i implantatima).



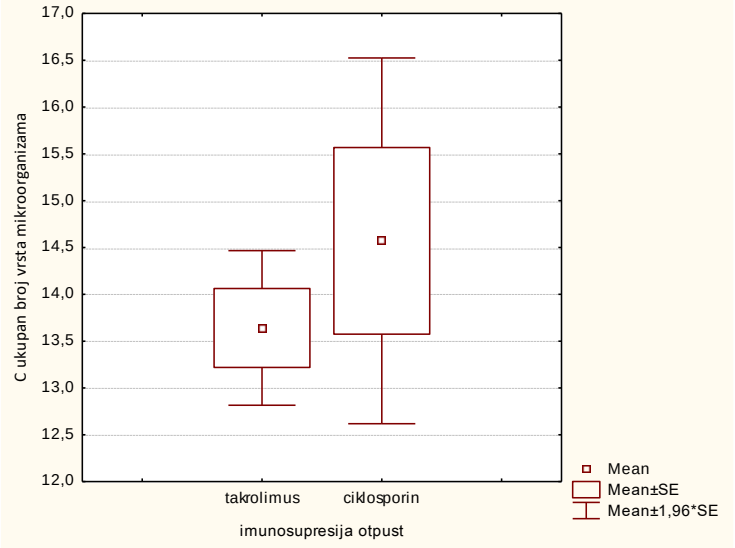
Slika 20.3. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima C (zubni ispuni u usporedbi s mostovima, krunama, protezama i implantatima).

4.2.8. Analiza mikroorganizama i imunosupresivne terapije

Nije nađena statistički značajna razlika u broju vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima B i C kod bolesnika koji su bili na imunosupresivnoj terapiji takrolimusom (Prograf®), u usporedbi s ciklosporinom (Sandimmun®) ($p = 0.61$, $p = 0.39$) (slike 21.1 i 21.2).

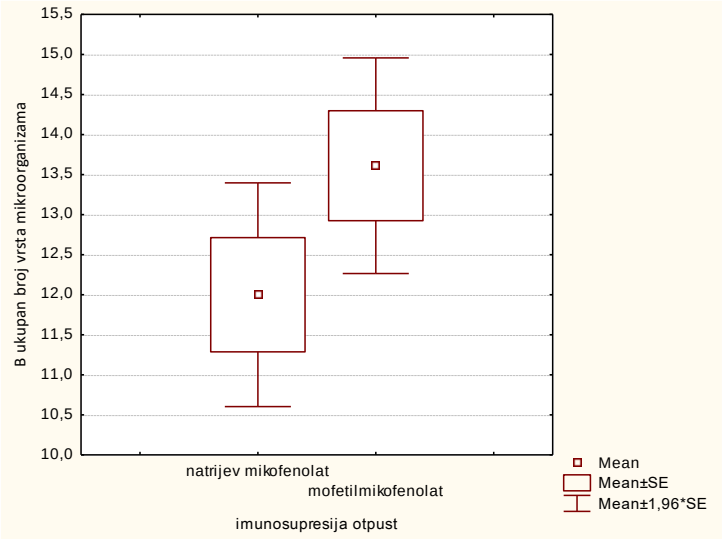


Slika 21.1. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima B (takrolimus (Prograf®) u usporedbi s ciklosporinom (Sandimmun®)).

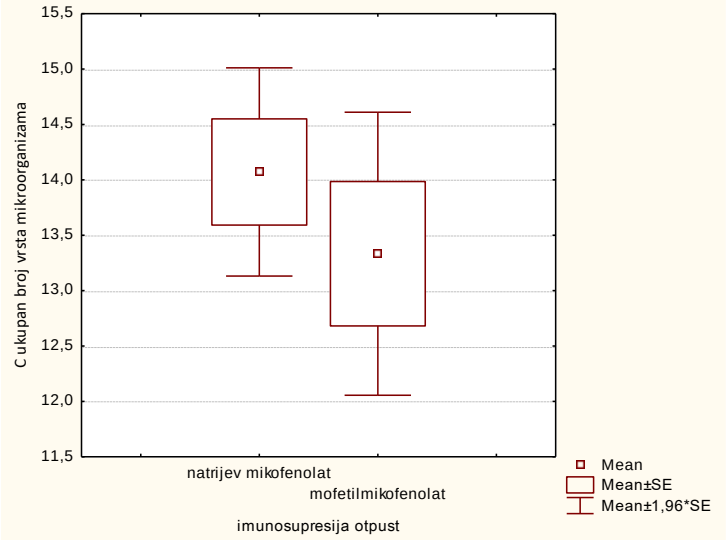


Slika 21.2. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima C (takrolimus (Prograf®) u usporedbi s ciklosporinom (Sandimmun®)).

Nije nađena statistički značajna razlika u broju vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima B i C kod bolesnika koji su bili na imunosupresivnoj terapiji mikofenolnom kiselinom u obliku natrijevog mikofenolata (Myfortic®) u usporedbi s mofetilmikofenolatom (Cellcept®) ($p = 0.13$, $p = 0.35$) (slike 21.3 i 21.4).



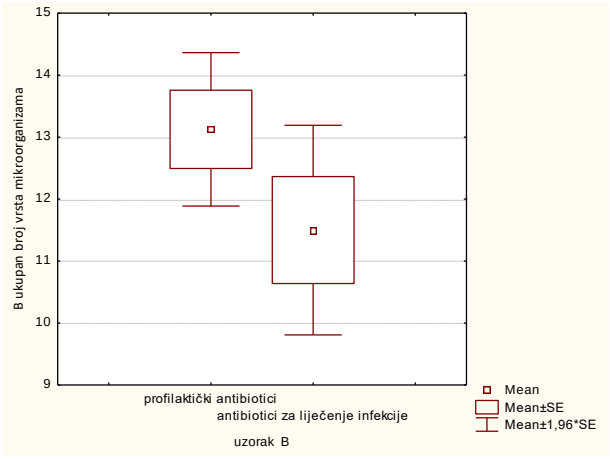
Slika 21.3. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima B (mikofenolna kiselina u obliku natrijevog mikofenolata (Myfortic®) u usporedbi s mofetilmikofenolatom (Cellcept®)).



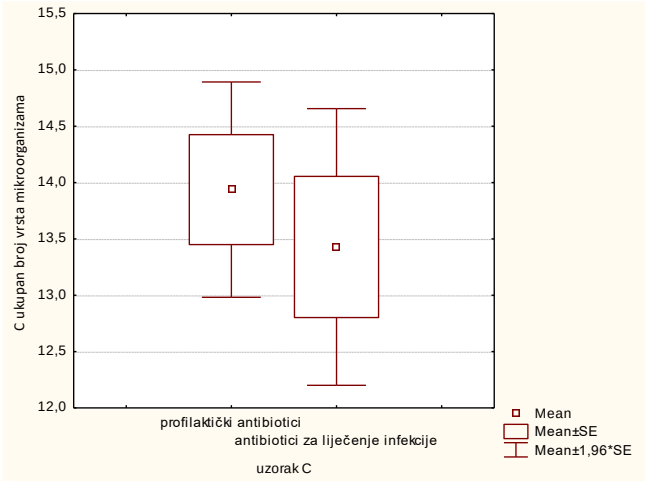
Slika 21.4. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima C (mikofenolna kiselina u obliku natrijevog mikofenolata (Myfortic®) u usporedbi s mofetilmikofenolatom (Cellcept®)).

4.2.9. Analiza mikroorganizama i antibiotika

Analizirajući broj vrsta mikroorganizama i upotrebu antibiotika, nije nađena statistički značajna razlika u broju vrsta mikroorganizama u uzorcima B i C između ispitanika koji su profilaktički uzimali 400 mg sulfametoksazola i 80 mg trimetoprima svaki drugi dan i ispitanika koji su uzimali antibiotike zbog liječenja infekcije ($p = 0.15$, $p = 0.18$) (slike 22.1 i 22.2). Zbog malog broja ispitanika koji su uzimali antibiotike zbog liječenja infekcije, razlika koja je vidljiva na grafovima nije statistički značajna.



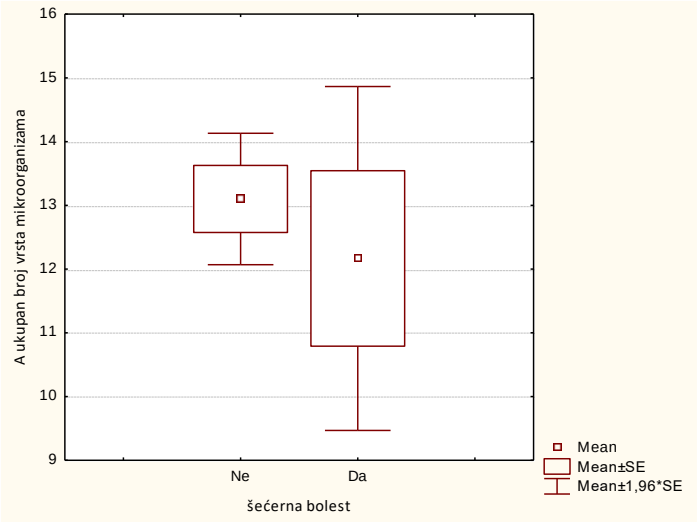
Slika 22.1. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorku B kod bolesnika koji su profilaktički uzimali 400 mg sulfametoksazola i 80 mg trimetoprima svaki drugi dan i onih koji su uzimali antibiotike zbog liječenja infekcije u vrijeme davanja uzorka B.



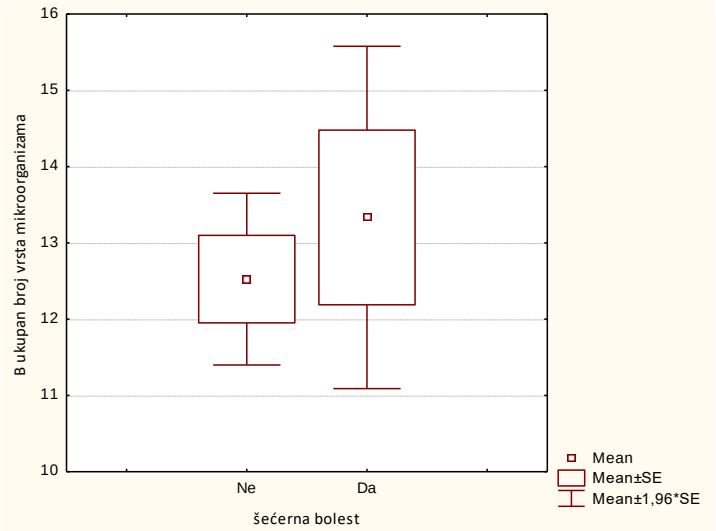
Slika 22.2. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorku C kod bolesnika koji su profilaktički uzimali 400 mg sulfametoksazola i 80 mg trimetoprima svaki drugi dan i onih koji su uzimali antibiotike zbog liječenja infekcije u vrijeme davanja uzorka C.

4.2.10. Analiza mikroorganizama i šećerne bolesti

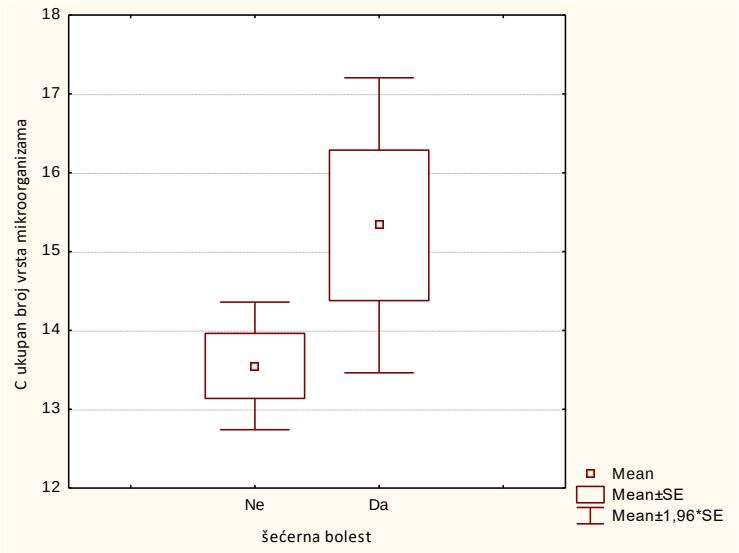
Analizirajući broj vrsta identificiranih mikroorganizama i šećernu bolest, nije nađena statistički značajna razlika u broju vrsta mikroorganizama u uzorcima A, B i C između ispitanika sa i bez šećerne bolesti ($p > 0.05$) (slike 23.1, 23.2 i 23.3). Budući da se radilo o malom broju ispitanika koji su imali šećernu bolest, statistički se rezultat ne može smatrati pouzdanim.



Slika 23.1. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima A kod bolesnika bez i sa šećernom bolesti.



Slika 23.2. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima B kod bolesnika bez i sa šećernom bolesti.



Slika 23.3. Prikaz broja vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima C kod bolesnika bez i sa šećernom bolesti.

5. RASPRAVA

5. RASPRAVA

Oralna mikrobiota predstavlja jednu od najvećih i najraznolikijih skupina mikroorganizama u ljudskom organizmu. Postoji više od 700 identificiranih vrsta mikroorganizama u usnoj šupljini, a najčešće su izolirani sljedeći rodovi: *Actinomyces, Veillonella, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Treponema, Neisseria, Haemophilus, Eubacterium, Lactobacillus, Bifidobacterium, Capnocytophaga, Eikenella, Leptotrichia, Peptostreptococcus, Staphylococcus* i *Propionibacterium*.[86] Mnogi od ovih mikroorganizama se povezuju s oralnim i općim zdravljem, ali i bolestima, posebno ukoliko se poremeti osjetljiva ravnoteža između njih i imunološkog sustava, kao što se to događa kod bolesnika koji su imunosuprimirani, odnosno koji su imali transplantaciju bubrega.[87] Pokazane su značajne promjene mikrobiote i mikrobioma u uzorcima stolice, oralnih obrisaka/ispiraka te mokraće bolesnika s transplantiranim organima.[88]

U našem radu usporedili smo mikroorganizme kod bolesnika s TBI prije i u dva vremenska razdoblja nakon transplantacije bubrega. Naši bolesnici su bili kontrola sami sebi što je značajno smanjilo interindividualne razlike koje mogu biti velike, posebno ukoliko se radi o oralnoj mikrobioti.[74] Kada smo usporedili broj vrsta identificiranih mikroorganizama u uzorcima A, B i C s dobi bolesnika, ustanovili smo da imamo ujednačenu raspodjelu u našoj dobnoj skupini od 30 do 70 godina, što odgovara rezultatima drugih istraživanja koja su pokazala da se značajne promjene u oralnoj mikrobioti pojavljuju uglavnom nakon sedmog desetljeća života.[89]

Uspoređujući broj vrsta identificiranih mikroorganizama i spol naših ispitanika, pokazali smo da kod uzoraka A i C nije bilo statistički značajne razlike među spolovima, ali je statistički značajna razlika postojala u uzorcima B, gdje je kod žena identificiran manji broj vrsta mikroorganizama u usporedbi s muškarcima. Pokazano je da između žena i muškaraca postoje značajne razlike u farmakokinetici i farmakodinamici imunosupresivnih lijekova.[90] Zašto smo kod naših ispitanika imali smanjenje broja identificiranih vrsta mikroorganizama kod žena u odnosu na muškarce i to samo u ranom posttransplantacijskom uzorku možemo samo nagađati. Poznato je da na početku uzimanja imunosupresiva postoje značajne oscilacije u njihovoj koncentraciji u krvi, te da je potrebno određeno vrijeme da bi se koncentracija stabilizirala, odnosno da bi bila u željenim razinama. Moguće je da su kod naših bolesnica ove oscilacije na početku bile izraženije u odnosu na muškarce, mada treba naglasiti da je i broj ispitanica bio gotovo dvostruko manji od broja ispitanika, te je moguće da se ovakva razlika ne bi pokazala na istom broju muškaraca i žena.

Streptokoki su među najzastupljenijim mikroorganizmima u usnoj šupljini, a oni su i primarni kolonizatori sluznice usne šupljine te zuba. Streptokoki, osobito iz viridans-skupine su također važni jer mogu uzrokovati različite bolesti usne šupljine kao što je to karijes, ali isto tako i neke druge bolesti po cijelom organizmu kao što su endokarditis, apsces ili upala pluća. U našem istraživanju streptokoki su također bili najčešće zastupljena skupina oralnih mikroorganizama s više od 1/3 ukupnih izolata (35 %). Pored toga što su bili najzastupljenija skupina, pokazali smo njihovu zapravo sličnu učestalost u uzorcima poslije transplantacije u odnosu na uzorke prije transplantacije (33 % prema 35, odnosno 37 %), mada smo također pokazali i statistički značajno povećanje kod uzoraka C u odnosu na uzorke A što ukazuje na to da imunosupresivna terapija ne smanjuje zastupljenost streptokoka u uzorcima iz usne šupljine barem unutar prvih nekoliko mjeseci, nego ih čak i povećava. Diaz i suradnici su u svom radu, koristeći vrlo osjetljivu metodu rRNA sekvencioniranja, također pokazali da su streptokoki najčešće zastupljeni oralni mikroorganizmi i da čine oko 25% oralne mikrobiote bolesnika s transplantiranim bubregom te da imunosupresivna terapija kod njihovih bolesnika nakon jedne godine nije djelovala značajno na ovu, najčešću skupinu oralnih mikroorganizama.[88] Također su pokazali da imunosupresivna terapija djeluje najznačajnije na oportunističke patogene te da kortikosterioidi imaju najznačajnije djelovanje na bakterije, dok je mikofenolat imao najznačajniji efekt na gljive (*Candida* spp.). U drugim istraživanjima je također pokazana povezanost između primjene mikofenolata i razvoja oportunističkih gljivičnih infekcija.[91]

Učestalost izolacije enterobakterija u našem istraživanju nije se bitno promijenila prije, odnosno nakon transplantacije. Naime, radi se o porodici bakterija koja se relativno rijetko nalazi u usnoj šupljini te je kod naših bolesnika činila oko 1% izolata. Kod skupine 3 mikroorganizama (gram-pozitivni fakultativno anaerobni koki i štapići, osim viridans-streptokoka i srodnih bakterija) uočili smo povećanje broja vrsta izolata, dok smo kod skupina 4 i 5 (gram-negativni aerobni i fakultativno anaerobni mikroorganizmi, osim enterobakterija) zabilježili smanjenje, odnosno smanjenje pa povećanje broja vrsta mikroorganizama, ovisno o različitim vremenskim periodima uzimanja uzoraka od naših bolesnika. Kod skupine 6 (gram-pozitivni anaerobi), broj vrsta izolata se također značajno povećao kod naših bolesnika. Oralna kolonizacija gram-negativnim štapićima, ali i gram-pozitivnim kokima (*Staphylococcus aureus*) je pokazana kod različitih medicinski kompromitiranih bolesnika, posebno kod starijih bolesnika zbog njihovih učestalih hospitalizacija, različitih bolesti te uz njih vezano uzimanje velikog broja različitih lijekova, ali i njihovo loše opće i imunološko stanje. Međutim, isto tako je pokazano da bi za povećanu učestalost izolacije ovih mikroorganizama mogli biti važniji

lokalni faktori kao što su oralno zdravlje i oralna higijena, nego samo imunološko stanje bolesnika.[92] Smatra se da *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. i *Staphylococcus* spp. nisu u velikoj mjeri prisutni u zdravoj oralnoj mikrobioti, mada su ih u nekim studijama uspjeli izolirati iz orofarinksa malog broja zdravih ljudi. Neki od ovih mikroorganizama kao što su *Klebsiella* spp. i *Pseudomonas* spp. su dobro poznati uzročnici infekcija kod imunosuprimiranih bolesnika te je samim time za očekivati njihovu češću izolaciju iz uzoraka imunosuprimiranih bolesnika kao što je to bilo u našem slučaju. Naime, česti kontakti sa sustavom zdravstvene skrbi kao i podvrgnutost nadomjesnoj funkciji bubrega, mogu poticati prisutnost tipičnih, bolničkih bakterija u tijelu pa i usnoj šupljini bolesnika. Za skupine 8 i 9 imali smo premali broj izolata da bi mogli donositi valjane zaključke, osim da se radi u mikroorganizmima koji imaju vrlo malu zastupljenost u ustima, kako prije tako i nakon transplantacije bubrega.

Jedna od najvažnijih nuspojava imunosupresivne terapije je povećana vjerojatnost infekcija[93] koje se preveniraju, odnosno liječe antibioticima, ali antibiotici, loša oralna higijena, odnosno loše oralno zdravlje, kao i sama imunosupresija mogu promijeniti broj i vrstu mikroorganizama u usnoj šupljini.[94] U našem istraživanju smo pokazali da iako nema statistički značajne promjene u ukupnom broju vrsta mikroorganizama u našim uzorcima prije i nakon transplantacije bubrega, postoji statistički značajna razlika u broju vrsta mikroorganizama unutar određenih skupina (1, 3, 4, 5 i 6). Ove promjene mogu biti povezane s oralnom higijenom i oralnim statusom, odnosno oralnim zdravljem, imunosupresivnom terapijom, upotrebom antibiotika, odnosno drugih lijekova koje uzimaju bolesnici s transplantiranim bubregom, ali i drugim bolestima koje imaju. Kada smo analizirali oralnu higijenu i oralni status, nismo našli povezanost između ove dvije varijable i mikroorganizama vjerojatno, jer se one nisu mijenjale nakon transplantacije. Naime, s jedne strane bolesnici su i nakon transplantacije bubrega zadržali svoje ranije navike vezane uz oralnu higijenu, a s druge strane, nisu imali dodatnih stomatoloških zahvata u vrijeme uzimanja, odnosno između uzimanja uzoraka pa je samim time mogućnost djelovanja oralne higijene i oralnog statusa na oralne mikroorganizme kod naših bolesnika svedena na minimum. Isto tako je važno napomenuti da su svi naši bolesnici imali sanirano zubalo, odnosno pregledani su od strane doktora dentalne medicine i ustanovljeno im je zadovoljavajuće oralno zdravlje te im je isključena oralna patologija koja bi bila kontraindikacija za transplantaciju bubrega, da bi uopće mogli ući na listu za transplantaciju bubrega, odnosno da bi bili transplantirani.

Većina naših bolesnika je imala zubne ispune, dok je veliki broj bolesnika imao protetske stomatološke radove (mostove, krune, proteze i implantate). Kada smo usporedili ove parametre i mikroorganizme, također nismo našli statistički značajnu povezanost, vjerojatno zbog sličnog sastava plaka na caklini zuba s plakom na protezama gdje su u oba izolata najčešće prisutni streptokoki,[77] kao što je to bilo i u našem istraživanju. Isto tako istraživači su već pokazali da nošenje proteza ne mijenja bitno oralne mikrobiote,[95] što je također u skladu s našim rezultatima.

Kada smo analizirali upotrebu antibiotika i mikroorganizme, nismo našli statistički značajne razlike između bolesnika koji su profilaktički uzimali male doze antibiotika (prema shemi i dozi profilaktičke primjene antibiotika, 400 mg sulfametoksazola i 80 mg trimetoprima kroz 6 mjeseci svaki drugi dan) i onih koji su uzimali antibiotike zbog liječenja infekcije. Djelovanje različitih antibiotika na oralnu mikrobiotu ovisi o samom antibiotiku, na primjer ciprofloksacin koji se često koristi za liječenje urinarnih infekcija kako u općoj populaciji tako i kod bolesnika koji su imali transplantaciju bubrega[96] ima vrlo malo učinka na oralnu mikrobiotu. Štoviše, naši bolesnici u vrijeme uzimanja uzoraka, odnosno u razdoblju između uzimanja uzoraka nisu koristili antibiotike za koje je pokazano da značajno djeluju na oralnu mikrobiotu kao što su amoksicilin, odnosno tetraciklini.[77] Važno je također napomenuti i da koncentracija većine antibiotika u slini nije velika, ali je ipak dovoljna da djeluje na neke bakterije, u prvom redu na streptokoke.[25] Budući da smo mi u našoj studiji imali veliki broj vrsta izolata iz roda streptokoka u sve tri skupine, te se ona čak i povećala s trajanjem imunosupresivne terapije, odnosno s uzimanjem profilaktičkih antibiotika (sulfametoksazola i trimetoprima), možemo zaključiti da ti antibiotici sigurno nisu značajno djelovali na ovu skupinu mikroorganizama, pa je moguće i na druge mikroorganizme u ustima. S druge strane, važno je napomenuti da je za neke druge antibiotike, kao što je to amoksicilin pokazano da i jedna doza dana u profilaktičke svrhe može značajno reducirati populaciju streptokoka u gingivalnim džepovima.[97]

Postoje neizravni dokazi za snažnu povezanost oralnog i crijevnog mikrobioma. Naime, dok je oralni mikrobiom relativno stabilan u slučajevima primjene antimikrobnih lijekova, crijevni mikrobiom je izrazito osjetljiv na djelovanje antimikrobnih lijekova i u njemu se događaju značajne promjene koje mogu dovesti do brojnih patoloških stanja. Međutim, ukoliko iz različitih razloga, dođe do promjena u oralnom mikrobiomu, odnosno stanja nazvanog disbioza te promjene mogu značajno utjecati na crijevni mikrobiom, te dovesti do promjena i poremećaja kao što su sustavno širenja bakterija po tijelu, ali i upalnih promjena u različitim tkivima i organima te promjena koje se povezuju s razvojem neuroloških i autoimunih bolesti, ali i

dijabetesa. Zbog navedenog, smatramo vrijednim istraživati i razvijati nove dijagnostičke metode, te pratiti bolesnike prije i nakon transplantacije solidnih organa i krvotvornih matičnih stanica, kako bi se uočile promjene koje ukazuju na nepovoljni ishod i tijek liječenja i koji bi se mogli prevenirati primjenom antimikrobnih lijekova.[98]

Šećernu bolest je prije transplantacije imalo 13 % bolesnika, a nakon transplantacije još su 3 bolesnika dobila (6.5 %) šećernu bolest (post-transplantacijska šećerna bolest). Incidencija post-transplantacijske šećerne bolesti je različita u različitim studijama, između ostalog zbog razlika u populacijama koje su uključene u studije, kao i u metodologiji samih studija te upotrebe različitih imunosupresiva i iznosi od 2.2 do 14 %.[99] Većina naših bolesnika je koristila imunosupresiju s takrolimusom za kojeg je pokazano da ima značajno veću vjerojatnost nastanka post-transplantacijske šećerne bolesti u usporedbi s ciklosporinom.[100,101] Pokazano je također, da šećerna bolest dovodi do hiposalivacije i kserostomije te da je povezana s određenim promjenama mikrobiološke flore u ustima. Naime, kod bolesnika sa šećernom bolesti povećan je broj vrsta iz rodova streptokoka i laktobacila.[102,35] Usporedba oralnih izolata bolesnika koji su dobili šećernu bolest nakon transplantacije (post-transplantacijska šećerna bolest) bi zapravo dala točniji odgovor na pitanje o djelovanju šećerne bolesti na mikroorganizme nakon transplantacije, nego skupina bolesnika koji su imali šećernu bolest prije transplantacije. Iako postoji razlika u vrstama mikroorganizmima izoliranih kod bolesnika koji su imali šećernu bolest u odnosu na one koji nisu imali šećernu bolest u uzorcima C, ona nije statistički značajna vjerojatno zbog toga što se radilo o malom broju bolesnika koji su imali šećernu bolest, pogotovo post-transplantacijsku šećernu bolest. Možda bi se statistički značajna razlika pokazala na većem uzorku ispitanika. U nedavnom radu Anbalagan i suradnici su pokazali da su zapravo vrste izoliranih mikroorganizama kod bolesnika sa šećernom bolesti u odnosu na zdravu populaciju vrlo slična, ali su neki mikroorganizmi više, odnosno manje zastupljeni kod bolesnika sa šećernom bolesti.[103]

Pokazano je da imunosupresivna terapija može promijeniti sastav oralne mikrobiote, a kakav točno utjecaj ima koja vrsta imunosupresiva možemo samo pretpostavljati, jer kada smo našu kohortu podijelili na dodatne dvije, odnosno četiri podskupine (ovisno o vrsti same imunosupresije), broj bolesnika u skupinama, odnosno podskupinama je bio premali da bi se mogao dobiti kvalitetan, statistički značajan podatak.

Pokazali smo povećanje broja gram-pozitivnih koka i srodnih bakterija, anaerobnih gram-pozitivnih koka kao i smanjenje broja gram-negativnih štapića (osim enterobakterija). Ovakve promjene su zapravo suprotne onome što se događa starenjem organizma, naime broj gram-

pozitivnih bakterija je najveći u djetinjstvu te se smanjuje s godinama, dok se broj gram-negativnih štapića povećava. Pokazano je da je starija životna dob (> 70 godina) povezana sa značajnim promjenama oralne mikrobiote, odnosno s povećanjem broja laktobacila, stafilokoka i gljiva, vjerojatno zbog prisutnosti više različitih bolesti kod ove populacije te uz to vezano liječenje, uzimanjem više vrsta različitih lijekova.[94] Prosječna životna dob naših bolesnika je bila 54 godine te je samo jedan bolesnik imao više od 70 godina (71 godinu), što našu populaciju svrstava u mlađu životnu skupinu te samim time objašnjava naše rezultate.

Budući da su i nakon transplantacije, između ostalog i zbog imunosupresije bolesnici izloženi različitim patogenima koji uzrokuju različite oralne bolesti i nakon transplantacije se savjetuju redovite stomatološke kontrole te održavanje oralnog zdravlja i oralne higijene s ciljem prevencije, odnosno liječenja ovih bolesti.[104]

Pokazali smo da se nakon transplantacije povećava broj vrsta gram-pozitivnih koka (aerobnih i anaerobnih) i smanjuje broja vrsta gram-negativnih štapića. Moguće je da su ove promjene povezane s imunosupresivnom terapijom, ali i s primjenom antimikrobnih lijekova. Moguće je da bi se značajniji rezultati, u smislu pomaka i promjene u sastavu mikrobiote, dobili s nastavkom praćenja bolesnika, odnosno uzorkovanja i mikrobiološke analize kroz godinu i više nakon transplantacije, kada se kod bolesnika javljaju i druge infekcije, a razina imunosupresije se snižava, dok se oni vraćaju uobičajenim aktivnostima. Istraživanje je prekinuto nakon što u KBC-u Zagreb više nije bila dostupna dijagnostika putem MALDI TOF MS i to kroz dulji vremenski period.

U inicijalnom planu istraživanja, planirana je kvantifikacija pojedinih dijelova mikrobiote usne šupljine, što se kasnije pokazalo nemogućim iz tehničkih razloga. Naime, u svrhu dosljedne kvantifikacije, bilo je uputno uzorke serijski razrijediti 10 puta i na taj način dobiti precizne brojeve pojedinih bakterija. Inokulacijom putem mikrobiološke eze i pipete i dalje su dobiveni veliki brojevi pojedinih vrsta bakterija te je rezultat izražen, u određenom broju slučajeva semikvantitativno kao, primjerice $>10^5$. Osim toga, za ostvarenje ciljeva i testiranje hipoteze istraživanja, kvantifikacija nije bila nužna.

Potrebna su daljnja istraživanja oralne mikrobiote kod bolesnika s transplantiranim bubrezima, kako bi se ustanovilo koji mikroorganizmi su točno prisutni kod ovih bolesnika i kako se oni mijenjaju, te samim time koju bi ulogu mogli imati u razvoju određenih bolesti, s ciljem njihovog sprečavanja, odnosno liječenja.

Najnovije metode molekularne mikrobiologije uglavnom se temelje na sekvencioniranju nove generacije te identificiranju genoma direktno iz uzorka, sveobuhvatne su i nisu limitirane na samo poznate vrste. Takva vrsta ispitivanja nije bila moguća u našem istraživanju iz tehničkih i financijskih razloga, što ostavlja mjesta za daljnja istraživanja korištenjem najmodernijih molekularnih tehnika ili alociranjem značajnih sredstava ili njihovim pojeftinjenjem. Važno je napomenuti da i u slučaju tehnički izvedenog sekvencioniranja nove generacije i dalje ostaje problem bioinformatičke analize, za koju u Hrvatskoj nema adekvatnih stručnjaka niti postoji obrazovni kurikulum koji ih profilira, unatoč velikoj potrebi za njihovim uslugama.

6. ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

U oralnoj šupljini bolesnika s TBI, odnosno transplantiranih bolesnika postoji veliki broj različitih mikroorganizama koji se mijenjaju ovisno o različitim faktorima. U našem istraživanju pokazali smo da iako se ukupni broj vrsta mikroorganizama prije, odnosno u dva vremenska razdoblja nakon transplantacije nije mijenjao značajno, došlo je do značajnih promjena unutar pojedinih skupina mikroorganizama u koje smo grupirali naše izolate.

Neki mikroorganizmi, odnosno broj vrsta unutar određenih grupa mikroorganizama se povećava, unutar nekih se smanjuju, a unutar određenih skupina se broj vrsta ne mijenja bitno u dva vremenska razdoblja nakon transplantacije u usporedbi s istim skupinama prije transplantacije bubrega. Od ukupno izoliranih mikroorganizama u našem istraživanju najzastupljeniji su, u postotku broja vrsta, bili mikroorganizmi iz skupine 1, zatim iz skupina 4 i 5. Mikroorganizmi iz skupine 1 (streptokoki i srodne bakterije) inače spadaju u najčešće skupinu mikroorganizama pripadnika oralne mikrobiote i čine oko 1/3 ukupnih izolata što je potvrđeno i u našoj studiji. Štoviše kod mikroorganizama iz skupine 1 vidi se blagi trend povećanja broja vrsta izolata s trajanjem imunosupresivne terapije što je bilo i statistički značajno. Kod mikroorganizama iz skupine 4 (gram-negativni štapići) pokazali smo smanjenje broja vrsta izolata s trajanjem imunosupresivne terapije, dok smo kod skupina 5 (gram-negativni koki) i 6 (gram-pozitivni anaerobni mikroorganizmi) imali povećanje broja vrsta mikroorganizama. Neki od ovih mikroorganizama se smatraju patogenim, a povećanje njihovog broja vrsta bi moglo biti posebno važno kod bolesnika s imunosupresijom kao što su to bolesnici s transplantiranim bubrezima. U ostalim skupinama imali smo relativno mali broj vrsta izolata koji se nisu značajno mijenjali.

U našem istraživanju nismo našli statistički značajnu povezanost između oralne higijene i oralnog statusa i mikroorganizama izoliranih prije, odnosno nakon transplantacije bubrega, vjerojatno zbog toga jer bolesnici nakon transplantacije bubrega nisu promijenili svoje navike vezane uz oralnu higijenu, odnosno nije im se promijenio oralni status. Također nismo našli bitne promjene kod usporedbe zubnih ispuna i protetskih radova vjerojatno zbog istog, odnosno sličnog sastava plaka, što je pokazano i u drugim radovima.

Također nismo našli povezanost između same vrste imunosupresivne terapije, kao i upotrebe antibiotika, odnosno prisustva šećerne bolesti vjerojatno zbog toga jer smo imali različite vrste imunosupresiva te relativno mali broj bolesnika u ovim skupinama.

Pokazali smo povećanje broja i vrsta gram-pozitivnih koka (aerobnih i anaerobnih) i smanjenje broja vrsta gram-negativnih štapića. Moguće je da su ove promjene povezane s imunosupresivnom terapijom, ali i s primjenom antimikrobnih lijekova.

Na kraju smo zaključili da naši rezultati predstavljaju novi doprinos poznavanju mikrobiološke flore usne šupljine kao takve, a posebno kod bolesnika s TBI, odnosno s transplantiranim bubregom, što je za njih vrlo važno.

7. LITERATURA

7. LITERATURA

1. Kolff WJ, Berk HT, ter Welle M, van der LEY AJ, van Dijk EC, van Noordwijk J. The artificial kidney: a dialyser with a great area. 1944. J Am Soc Nephrol. 1997;8:1959-65.
2. Brescia MJ, Cimino JE, Appel K, Hurwich BJ. Chronic hemodialysis using venipuncture and a surgically created arteriovenous fistula. NEJM. 1966;275:1089-92.
3. Asif A, Roy-Chaudhury P, Beathard GA. Early arteriovenous fistula failure: a logical proposal for when and how to intervene. Clin J Am Soc Nephrol. 2006;1:332-9.
4. Farber A, Imrey PB, Huber TS, Kaufman JM, Kraiss LW, Larive B i sur. Multiple preoperative and intraoperative factors predict early fistula thrombosis in the Hemodialysis Fistula Maturation Study. J Vasc Surg. 2016;63:163-70.
5. Nassar GM, Ayus JC. Infectious complications of the hemodialysis access. Kidney Int. 2001;60:1-13.
6. Rašić S, Bašić-Jukic N. Modaliteti peritoenalne dijalize. U: Bašić-Jukić N, Rački S i sur. Peritonealna dijaliza. Medicinska naklada Zagreb 2017. str. 47-57.
7. Barry JM. Current status of renal transplantation. Urol Clin N Am 2001;28:677-86.
8. Republika Hrvatska. Zakon o presađivanju ljudskih organa u svrhu liječenja. Članak 18 i 19. NN 144/12.
9. Kaštelan Ž, Hudolin T. Kirurški principi nefrektomije kod umrlog darovatelja bubrega. U: Transplantacija bubrega. Urednici Bašić-Jukić N, Kaštelan Ž i sur. Medicinska naklada Zagreb 2016. str. 93-102.
10. Žgrablić N. Uloga transplantacijskog koordinatora u transplantacijskoj medicini - europska iskustva i modeli. Medix 2011;92/93:156-8.
11. Barry JM, Conlin MJ. Renal Transplantation. U: Campbell-Walsh Urology, Tenth Edition. Urednici Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW i Peters CA. Elsevier Saunders Philadelphia 2012. str: 1226-56.
12. Kaštelan Ž, Bašić-Jukić N, Furić-Čunko V. Povijest transplantacije. U: Transplantacija bubrega. Urednici Bašić-Jukić N, Kaštelan Ž i sur. Medicinska naklada Zagreb 2016. str. 1-12.
13. Fučkar Ž. Razvoj transplantacije bubrega. U: Povijest urologije na Sušaku. Urednik Fučkar Ž. DP Tisak Rijeka 2006. str. 79-86.
14. Eurotransplant. Eurotransplant International Foundation P.O. Box 2304 NL -2301 CH Leiden The Netherlands [pristupljeno 22.9.2019.]. Dostupno na: https://www.eurotransplant.org/cms/index.php

15. Kalluri HV, Hardinger KL. Current state of renal transplant immunosuppression: Present and future. World J Transplant 2012;24:51-68.
16. Spolidorio LC, Spolidorio DMP, Massucato EMS, Neppelenbroek KH, Campanha NH, Sanches MH. Oral health in renal transplant recipients administered cyclosporin A or tacrolimus. Oral Dis. 2006;12:309-14.
17. Wright G, Welbury RR, Hosey MT. Cyclosporin-induced gingival overgrowth in children. Int J Paediatr Dent. 2005;15:403-11.
18. Costa LC, Costa FO, Cortelli SC, Cortelli JR, Cota LO. Gingival overgrowth in renal transplant subjects: A 44-month follow-up study. Transplantation. 2013;96:890–6.
19. Kim JY, Park SH, Cho KS, Kim HJ, Lee CK, Park KK i sur. Mechanism of azithromycin treatment on gingival overgrowth. J Dent Res. 2008;87:1075-9.
20. Ciavarella D, Guiglia R, Campisi G, Di Cosola M, Di Liberto C, Sabatucci A i sur. Update on gingival overgrowth by cyclosporine A in renal transplants. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2007;12:E19-25.
21. Nappalli D, Lingappa A. Oral manifestations in transplant patients. Dent Res J 2015;12:199-208.
22. Levarda Hudolin K, Hudolin T, Bašić-Jukić N, Kaštelan Ž. Oral lesions in kidney transplant recipients. Acta Clin Croatica 2016;55:459-63.
23. O'Neill J. Antimibrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance. Tockling drug-resistant infections globally. [pristupljeno 22.9.2019.].
Dostupno na:
https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf
%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf
24. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. Lancet. 2003;361:512-9.
25. Stjernquist-Desatnik A, Samuelsson P, Walder M. Penetration of penicillin V to tonsillar surface fluid in healthy individuals and in patients with acute tonsillitis. J Laryngol Otol. 1993;107:309-12.
26. Harrison GA, Stross WP, Rubin MP, Davies RM, Speller DC. Resistance in oral streptococci after repeated three-dose erythromycin prophylaxis. J Antimicrob Chemother. 1985;15:471-9.

27. Ready D, Lancaster H, Qureshi F, Bedi R, Mullany P, Wilson M. Effect of amoxicillin use on oral microbiota in young children. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:2883-7.
28. Haak BW, Lankelma JM, Hugenholtz F, Belzer C, de Vos WM, Wiersinga WJ. Long-term impact of oral vancomycin, ciprofloxacin and metronidazole on the gut microbiota in healthy humans. J Antimicrob Chemother. 2019;743:782-86.
29. Scannapieco FA, Dasanayake AP, Chhun N. Does periodontal therapy reduce the risk for systemic diseases? Dent Clin North Am. 2010;54:163-81.
30. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC i sur. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. J. Periodontol. 1996;67(Suppl):1085-93.
31. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. Ann Periodontol. 1998;3:302-9.
32. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Dahlen G, Rattarasarn C. Root surface and coronal caries in adults with type 2 diabetes mellitus. Community Dent Oral Epidemiol. 2007;35:302-9.
33. Soell M, Hassan M, Miliauskaite A, Haikel Y, Selimovic D. The oral cavity of elderly patients in diabetes. Diabetes Metab. 2007;33(Suppl 1):S10-8.
34. Hintao J, Teanpaisan R, Chongsuvivatwong V, Ratarasan C, Dahlen G. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. Oral Microbiol Immunol. 2007;22:175-81.
35. Kampoo K, Teanpaisan R, Ledder RG, McBain AJ. Oral bacterial communities in individuals with type 2 diabetes who live in southern Thailand. Appl Environ Microbiol. 2014;80:662-71.
36. de Groot PF, Belzer C, Aydin Ö, Levin E, Levels JH, Aalvink S i sur. Distinct fecal and oral microbiota composition in human type 1 diabetes, an observational study. PLoS One. 2017;12(12):e0188475.
37. Casarin RC, Barbagallo A, Meulman T, Santos VR, Sallum EA, Nociti FH i sur. Subgingival biodiversity in subjects with uncontrolled type-2 diabetes and chronic periodontitis. J Periodontal Res. 2013;48:30-6.
38. Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. J Dent Res. 2019;98:148-56.

39. Woodward RS, Schnitzler MA, Baty J, Lowell JA, Lopez-Rocafort L, Haider S i sur. Incidence and cost of new onset diabetes mellitus among U.S. wait-listed and transplanted renal allograft recipients. Am J Transplant. 2003;3:590-8.
40. Wissing KM, Abramowicz D, Weekers L, Budde K, Rath T, Witzke O i sur. Prospective randomized study of conversion from tacrolimus to cyclosporine A to improve glucose metabolism in patients with posttransplant diabetes mellitus after renal transplantation. Am J Transplant. 2018;18:1726-34.
41. Benjamin RM. Oral health: The silent epidemic. Public Health Rep. 2010;125:158-9.
42. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabe E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A i sur. Global burden of oral conditions in 1990–2010: A systematic analysis. J Dent Res. 2013;92:592-7.
43. Gillings MR, Paulsen IT, Tetu SG. Ecology and evolution of the human microbiota: Fire, farming and antibiotics. Genes (Basel) 2015;6:841-57.
44. American Dental Association. History of Dentistry Timeline. 2016. [pristupljeno 22.9.2019.]. Dostupno na: https://www.ada.org/en/member-center/ada-library/dental-history
45. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA i sur. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001;183:3770-83.
46. Schenkein HA, Loos BG. Inflammatory mechanisms linking periodontal diseases to cardiovascular diseases. J Clin Periodontol. 2013;84(4 Suppl):S51-69.
47. Bansal M, Khatri M, Taneja V. Potential role of periodontal infection in respiratory diseases - a review. J Med Life. 2013;6:244-8.
48. Azarpazhooh A, Leake JL. Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. J Periodontol 2006; 77:1465-82.
49. Sjogren P, Nilsson E, Forsell M, Johansson O, Hoogstraate J. A systematic review of the preventive effect of oral hygiene on pneumonia and respiratory tract infection in elderly people in hospitals and nursing homes: Effect estimates and methodological quality of randomized controlled trials. J Am Geriatr Soc 2008;56:2124-30.
50. Borgnakke WS, Ylostalo PV, Taylor GW, Genco RJ. Effect of periodontal disease on diabetes: Systematic review of epidemiologic observational evidence. J Periodontol 2013;84(4 Suppl):S135–52.
51. Heilmann A, Tsakos G, Watt RG. Oral health over the life course. U: A life course perspective on health trajectories and transitions. Urednici: Burton-Jeangros C, Cullati

S, Sacker A i Blane D. Springer Open, Cham Heidelberg New York Dordrecht London 2015.

52. WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO, 2003. [pristupljeno 22.9.2019.]. Dostupno na: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42665/WHO_TRS_916.pdf;jsessionid=5AD396E4A047A024232DB34E5427A21D?sequence=1
53. Jover Cerveró A, Bagán JV, Jiménez Soriano Y, Poveda Roda R. Dental management in renal failure: Patients on dialysis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2008;13:E419-26.
54. Galili D, Berger E, Kaufman E. Pulp narrowing in renal end stage and transplanted patients. J Endod. 1991;17:442-3.
55. Woodhead JC, Nowak AJ, Crall JJ, Robillard JE. Dental abnormalities in children with chronic renal failure. Pediatr Dent 1982;4:281-5.
56. Klassen JT, Krasko BM. The dental health status of dialysis patients. J Can Dent Assoc. 2002;68:34-8.
57. Löcsey L, Alberth M, Mauks G. Dental management of chronic haemodialysis patients. Int Urol Nephrol 1986;18:211-3.
58. Atassi F. Oral home care and the reasons for seeking dental care by individuals on renal dialysis. J Contemp Dent Pract. 2002;3:31-41.
59. Griffin SO, Barker LK, Griffin PM, Cleveland JL, Kohn W. Oral health needs among adults in the United States with chronic diseases. J Am Dent Assoc. 2009;140:1266-74.
60. Grubbs V, Plantinga LC, Tuot DS, Powe NR. Chronic kidney disease and use of dental services in a United States public healthcare system: a retrospective cohort study. BMC Nephrol. 2012;13:16
61. Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. Public Health Nutr. 2004;7:201-26.
62. Akar H, Akar GC, Carrero JJ, Stenvinkel P, Lindholm B. Systemic consequences of poor oral health in chronic kidney disease patients. Clin J Am Soc Nephrol. 2011;6:218-26.
63. Ruospo M, Palmer SC, Craig JC, Gentile G, Johnson DW, Ford PJ i sur. Prevalence and severity of oral disease in adults with chronic kidney disease: a systematic review of observational studies. Nephrol Dial Transplant. 2014;29:364-75.
64. Alaluusua S, Lukinmaa PL, Koskimies M, Pirinen S, Hölttä P, Kallio M i sur. Developmental dental defects associated with long breast feeding. Eur J Oral Sci. 1996;104:493-7.

65. Wilczyńska-Borawska M, Bagińska J, Małyszko J. Dental problems in a potential kidney transplant recipient: case report and literature review. Ann Acad Med Stetin. 2010;56:51-4.
66. Greenberg MS, Glick M. Burket's Oral Medicine - Diagnosis and Treatment. 11-sto izdanje. USA: B C Decker Inc. 2003.
67. Salamon KM, Lambert K. Oral nutritional supplementation in patients undergoing peritoneal dialysis: a randomised, crossover pilot study. J Ren Care. 2018;44:73-81.
68. Iwasaki M, Taylor GW, Awano S, Yoshida A, Kataoka S, Ansai T i sur. Periodontal disease and pneumonia mortality in haemodialysis patients: A 7-year cohort study. J Clin Periodontol. 2018;45:38-45.
69. Zwiech R, Brzda-Zwiech A. Does oral health contribute to post-transplant complications in kidney allograft recipients? Acta Odontol Scand. 2013;71:756-63.
70. Pereira-Lopes O, Sampaio-Maia B, Sampaio S, Vieira-Marques P, Monteiro-da-Silva F, Braga AC i sur. Periodontal inflammation in renal transplant recipients receiving everolimus or tacrolimus - preliminary results. Oral Dis. 2013;19:666-72.
71. Chu FC, Tsang PC, Chan AW, Leung WK, Samaranayake LP, Chan TM. Oral health status, oral microflora, and non-surgical periodontal treatment of renal transplant patients receiving cyclosporin A and FK506. Ann R Australas Coll Dent Surg 2000;15:286–91.
72. Saraiva L, Lotufo RF, Pustiglioni AN, Silva HT, Jr, Imbronito AV. Evaluation of subgingival bacterial plaque changes and effects on peri-odontal tissues in patients with renal transplants under immunosuppres-sive therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;101:457-62.
73. Ahmadieh A, Baharvand M, Fallah F, Djaladat H, Eslani M. Oral microflora in patients on hemodialysis and kidney transplant recipients. Iran J Kidney Dis. 2010;4:227-31.
74. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. Science 2009;326: 1694-97.
75. Franzosa EA, Huang K, Meadow J F, Gevers D, Lemon KP, Bohannan BJ i sur. Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. Proc Natl Acad Sci USA 2015 112:E2930E2938.25.
76. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE i sur. A core gut microbiome in obese and lean twins. Nature. 2009;457:480-84.

77. Arweiler NB, Netuschil L. The oral mikrobiota. U: Microbiota of the Human Body. Implications in Health and Disease. Urednik: Schwiertz A. Springer International Publishing Switzerland 2016. str. 45-60.

78. Budimir A. MALDI -TOF MS u mikrobiološkoj dijagnostici. U Priručniku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Metode molekularne biologije u medicini, urednice: Bulić-Jakuš F, Sertić J. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet. Poslijediplomski udžbenici i priručnici. Zagreb, 2016. str. 170-75.

79. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS Microbiol Rev. 2012;36:380-407.

80. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. Anal Chem. 1975;47:219-25.

81. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ i sur. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrixassisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 1996;10:1227-32.

82. Giebel R, Worden C, Rust SM, Kleinheinz GT, Robbins M, Sandrin TR. Microbial fingerprinting using matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. Adv Appl Microbiol 2010;71: 149–84.

83. Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. Nat Rev Microbiol. 2010;8:74-82.

84. Bruker. MALDI Biotyper® CA System. Clinical Application for Identification of Microorganisms. Bruker Daltonics Inc. Billerica, MA. USA. [pristupljeno: 22.9.2019.]. Dostupno na: https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/Brochures/1857366_MALDI_Biotyper_CA_brochure_01-2018_ebook.pdf

85. Zimbro MJ, Urednik. Difco & BBL Manual: manual of microbiological culture media. 2 izdanje. Sparks, MM: Becton, Dickinson 2009. str. 686.

86. The oral cavity and its indigenous microbiota. U: Microbial Inhibitants of Humans. Urednik: Wilson M.Cambridge University Press. Cambridge UK, 2005. str. 318-74.

87. Borewicz K, Pragman AA, Kim HB, Hertz M, Wendt C, Isaacson RE. FEMS Microbiol Lett. 2013;339:57-65.

88. Diaz PI, Hong BY, Frias-Lopez J, Dupuy AK, Angeloni M Abusleme L i sur. Transplantation-associated long-term immunosuppression promotes oral colonization by potentially opportunistic pathogens without impacting other members of the salivary bacteriome. Clin Vaccine Immunol. 2013;20:920-30.
89. Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults. J Med Microbiol. 1991;35:5-11.
90. Momper JD, Misel ML, McKay DB. Sex differences in transplantation. Transplant Rev (Orlando). 2017;31:145-50.
91. Kurayev A, Gottlieb AB. Candida Esophagitis Associated With Mycophenolate Mofetil Treatment of Atopic Dermatitis. J Drugs Dermatol. 2016;15:1267-69.
92. Tada A, Hanada N. Opportunistic respiratory pathogens in the oral cavity of the elderly. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010;60:1-17.
93. Marcén R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. Drugs 2009;69:2227-43.
94. Zawadzki PJ, Perkowski K, Starościak B, Baltaza W, Padzik M, Pionkowski K i sur. Identification of infectious microbiota from oral cavity environment of various population group patients as a preventive approach to human health risk factors. Ann Agric Environ Med. 2016;23:566-9.
95. Kraneveld EA, Buijs MJ, Bonder MJ, Visser M, Keijser BJ, Crielaard W i sur. The relation between oral candida load and bacterial microbiome profiles in Dutch older adults. PLoS One 2012;7:e42770.
96. Parasuraman R, Julian K; AST Infectious Diseases Community of Practice. Urinary tract infections in solid organ transplantation. Am J Transplant. 2013;13(Suppl 4):327-36.
97. Larsson Wexell C, Ryberg H, Sjöberg Andersson WA, Blomqvist S, Colin P, Van Bocxlaer J i sur. Antimicrobial Effect of a Single Dose of Amoxicillin on the Oral Microbiota. Clin Implant Dent Relat Res. 2016;18:699-706.
98. Kodukula K, Faller DV, Harpp DN, Kanara I, Pernokas J, Pernokas M i sur. Gut Microbiota and Salivary Diagnostics: The Mouth Is Salivating to Tell Us Something.Biores Open Access. 2017;6:123-32.
99. Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, Besse T, Grabensee B, Klein B i sur. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of

renal allograft rejection: A report of the European tacrolimus multicenter renal Study Group. Transplantation 1997;64:436–43.

100. Jensik SC. Tacrolimus (FK506) in kidney transplantation: Three year survival results of the US multicenter, randomized, comparative trial. FK506 kidney transplant Study Group. Transplant Proc. 1998;30:1216-18.

101. Fisher RA, Ham JM, Marcos A, Shiffman ML, Luketic VA, Kimball PM i sur. A prospective randomized trial of mycophenolate mofetil with neoral or tacrolimus after orthotopic liver transplantation. Transplantation 1998;66:1616-21.

102. Khovidhunkit SO, Suwantuntula T, Thaweboon S, Mitrirattanakul S, Chomkhakhai U, Khovidhunkit W. Xerostomia, hyposalivation, and oral microbiota in type 2 diabetic patients: a preliminary study. J Med Assoc Thai. 2009;92:1220-8.

103. Anbalagan R, Srikanth P, Mani M, Barani R, Seshadri KG, Janarthanan R. Next generation sequencing of oral microbiota in Type 2 diabetes mellitus prior to and after neem stick usage and correlation with serum monocyte chemoattractant-1. Diabetes Res Clin Pract. 2017;130:204-10.

104. Lima RB, Santos PS, Malafronte P, Muller H, Caiaffa-Filho HH, Sens YA. Oral manifestation of cytomegalovirus associated with herpes simplex virus in renal transplant recipient. Transplant Proc. 2008;40:1378-81.

8. ŽIVOTOPIS

8. ŽIVOTOPIS

Katarina Levarda Hudolin, rođena je 21.5.1969. godine u Travniku, gdje je završila osnovnu i srednju medicinsku školu. Također je u Travniku završila i osnovnu glazbenu školu. Stomatološki fakultetu u Sarajevu je upisala 1988. godine, međutim zbog ratnih zbivanja prebacila se na Stomatološki fakultet u Rijeci, a nakon toga i 1993. godine na Stomatološki fakultet u Zagrebu, koji je završila 2000. godine. Pripravnički staž je odradila u Domu zdravlja Sesvete, nakon čega je otvorila privatnu ordinaciju u Gračanima.

Godine 2013. godine započela je specijalizaciju iz stomatološke protetike te upisala znanstveni specijalistički studij na Stomatološkom fakultetu u Zagrebu. Također je u sklopu specijalizacije odslušala stručni postdiplomski studij iz stomatološke protetike.

Član je Hrvatske stomatološke komore.

Sudjelovala je na više domaćih i međunarodnih kongresa i autor je i suautor nekoliko stručnih i znanstvenih radova.

Udana je i majka dvoje djece.

Popis objavljenih radova

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Hudolin T, Kastelan Z, Ilic I, Levarda-Hudolin K, Basic-Jukic N, Rieken M, Spagnoli GC, Juretic A, Mengus C. Immunohistochemical analysis of the expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens in diffuse large B-cell testicular lymphoma. J Transl Med. 2013;11:123.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Levarda-Hudolin K, Hudolin T, Bašić-Jukić N, Kaštelan Ž. Oral Lesions in Kidney Transplant Recipients. Acta Clin Croat. 2016;55:459-463.

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom

1. Basic Jukic N, Kes P, Jelakovic B, Mustapic M, Furic Cunko V, Basic Kes V, Levarda Hudolin K. Conversion from CNI to MTORI in renal transplant recipients with neurotoxicity. Transpl Int. 2013;26(Suppl 2):81.

2. Basic Jukic N, Juric I, Levarda Hudolin K i sur. Renal transplantation in the Roma (Gypsie) minority in Croatia. Transplant Int. 2013;26(Suppl 2):189.

3. Levarda-Hudolin K, Budimir A, Bašić-Jukić N, Bošnjak Z, Mareković I, Kraljević S, Kaštelan Ž i Hudolin T. Oral microbiota before and after kidney transplantation. 3 Međunarodni kongres Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Westin, Zagreb, Hrvatska, 2017.