

Rechtsdraaiende proteasesubstraten lijken bruikbaar voor orale microbiologische diagnostiek

De huidige methoden voor het identificeren van micro-organismen in klinische materialen zijn tijdrovend, complex of missen sensitiviteit en specificiteit. Daardoor zijn tot op heden nog geen testen beschikbaar voor snelle microbiologische diagnostiek in mond-zorgpraktijken. Gebaseerd op het feit dat bacteriën unieke enzymen bezitten voor het metaboliseren van rechtsdraaiende aminozuren is een snelle methode ontwikkeld voor het identificeren van metabool actieve bacteriën. Door gebruik te maken van substraten met rechtsdraaiende aminozuren kon *Porphyromonas gingivalis* binnen 10 minuten gedetecteerd worden met een specificiteit van 96-100%. Deze methode paveit de weg naar het ontwikkelen van een snelle orale diagnostische microbiologische test.

Bikker FJ, Kaman WE, Veerman ECI. Rechtsdraaiende proteasesubstraten lijken bruikbaar voor orale microbiologische diagnostiek

Ned Tijdschr Tandheelkd 2013; 120: 164-167

doi: 10.5177/ntvt.2013.03.12199

Inleiding

Microbiologische diagnostiek is van groot belang voor toenemend inzicht in het ontstaan en de behandeling van aandoeningen als cariës, parodontitis en halitose. In een gezonde mond bestaat een ecologisch evenwicht tussen micro-organismen en afweer. Wanneer die balans wordt verstoord, bijvoorbeeld door ondermaatse mondzorg of door een gebrek aan speeksel, kunnen pathogene micro-organismen de overhand krijgen met nadelige effecten op de mondgezondheid.

Kennis van de samenstelling van de orale microflora is niet alleen van belang voor diagnostiek en voor de evaluatie van de effectiviteit van een behandeling, ze is ook bruikbaar voor het geven van adviezen die zijn toegesneden op de specifieke omstandigheden van een individu. Het zou ideaal zijn wanneer een mondzorgverlener direct in zijn praktijk de orale microflora bij zijn patiënten zou kunnen controleren op de aanwezigheid van bepaalde pathogenen. De huidige vormen van microbiologische diagnostiek zijn hiervoor niet geschikt. Zowel voor de uitvoering als voor de interpretatie van deze bewerkelijke en tijdrovende microbiologische testen is specifieke expertise nodig. Het kan dagen tot zelfs weken duren voordat een uitslag bekend is. Een snelle, goedkope en simpel uitvoerbare diagnostische methode, toegesneden op specifieke vraagstellingen, kan de doelmatigheid van de verleende mondzorg verbeteren.

Fenotypische identificatie

De traditioneel voor orale microbiologische diagnostiek gebruikte methode is fenotypische identificatie, gebaseerd op het identificeren van micro-organismen op grond van hun uiterlijke kenmerken en biochemische eigenschap-

Wat weten we?

De bestaande identificatiemethoden lenen zich niet voor orale microbiologische diagnostiek omdat zij te tijdrovend en complex zijn en sensitiviteit en specificiteit missen.

Wat is nieuw?

Een nieuwe methode is ontwikkeld voor snelle microbiologische diagnostiek, gebaseerd op het feit dat bacteriën eiwitplitsende enzymen, proteasen, uitscheiden die rechtsdraaiende aminozuren detecteren.

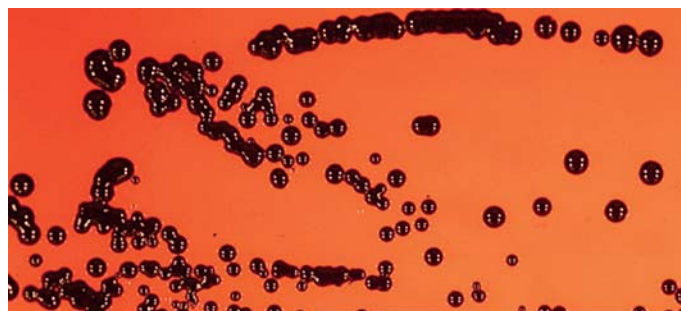
Praktijktoepassing

Het gebruik van rechtsdraaiende aminozuren paveit de weg naar het ontwikkelen van een snelle orale diagnostische microbiologische detectiemethode.

pen. Methoden die hierbij veel worden gebruikt, zijn Gram-kleuring, testen van metabolieten, detectie met antilichamen en kweken op selectieve media. Het kweken op selectieve media gebeurt bij voorkeur met media waarop alleen het micro-organisme kan groeien waarin men is geïnteresseerd, bijvoorbeeld het paropathogene micro-organisme *Porphyromonas gingivalis* (afb. 1) (Verner et al, 2006). Nadeel van deze methode is dat zij alleen kan worden gebruikt voor micro-organismen die *in vitro* kweekbaar zijn. Bovendien wordt de fenotypische identificatie soms bemoeilijkt doordat sommige stammen van een soort micro-organismen unieke biochemische kenmerken bezitten die afwijken van de karakteristieke kenmerken van hun soort. Verder is het kweken en testen van micro-organismen tamelijk bewerkelijk en duurt het minimaal een dag voordat de resultaten beschikbaar zijn.

Detectie met behulp van antigenen

Een methode die zich leent voor diagnostiek in de mond-



Afb. 1. Bacteriekolonies van *Porphyromonas gingivalis* gekweekt op een voedingsbodem. (Bron: <http://www.odont.uio.no>)

zorgpraktijk is detectie van micro-organismen met behulp van specifieke antilichamen. Hiermee kunnen antigenen worden aangetoond die specifiek zijn voor bepaalde micro-organismen (Slots et al, 1985). Ontwikkelingen op het gebied van procestechnologie en miniaturisatie hebben geleid tot het uitbrengen van steeds meer van dergelijke op antilichaam gebaseerde detectiemethoden. De speekseltest voor het aantonen van het humaan immunodeficiëntievirus (hiv) is hiervan een voorbeeld (afb. 2) (Roberts et al, 2007). Deze speekseltest kan antilichamen gericht tegen hiv in speeksel detecteren en wordt gebruikt voor het opsporen van seropositiviteit onder risicogroepen die via de normale weg lastig te benaderen zijn, zoals drugsgebruikers en prostituees. Het voordeel van deze test is dat de uitslag binnen enkele minuten bekend is. De test is eenvoudig in gebruik maar de gevoeligheid is, behalve in combinatie met het kweken van micro-organismen, niet goed genoeg. Ook bestaat de mogelijkheid van kruisreactiviteit met andere micro-organismen, waardoor vals-positieve resultaten op de loer liggen.

Genetische identificatie

In de afgelopen 15 jaar zijn nieuwe diagnostische methoden ontwikkeld waarbij identificatie gebeurt op basis van desoxyribonucleïnezuur (DNA). Daarbij wordt met behulp van de polymerasekettingreactie selectief DNA van een bepaald micro-organisme vermeerderd (Sakamoto et al, 2001; Boutaga et al, 2003).

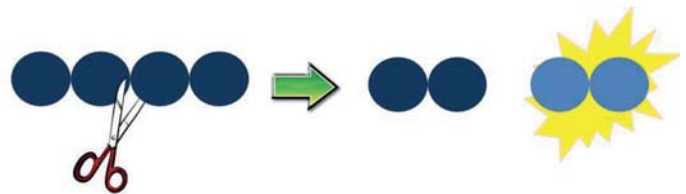
De polymerasekettingreactie berust op het zo lang vermenigvuldigen van (bacterieel) DNA tot voldoende beschikbaar is voor analyse. Microbiologische diagnostiek met de polymerasekettingreactie kent een aantal voordelen. Omdat elk micro-organisme een unieke DNA-sequentie heeft, is ze uiterst specifiek. Daarnaast is deze methode ook uiterst (en soms te) gevoelig: bij de polymerasekettingreactie wordt aanwezig DNA vermenigvuldigd, dus in theorie is 1 DNA-molecuul voldoende voor analyse. In de praktijk zijn echter enkele tot tientallen micro-organismen per monster nodig om voldoende signaal te genereren. Een ander groot voordeel is dat met de polymerasekettingreactie ook niet-kweekbare micro-organismen kunnen worden gedetecteerd. Diagnostiek met de polymerasekettingreactie is nu nog complex en duur vanwege de benodigde specialistische apparatuur en expertise, zodat deze methode voorlopig niet geschikt is voor diagnostiek in de mondzorgpraktijk.

Proteasesubstraten

Proteasen zijn enzymen die interessante eigenschappen hebben voor het bedrijven van snelle diagnostiek (Loesche et al, 1990; Kaman et al, 2011; Galassi et al, 2012; Kaman et al, 2012). Ze kunnen in korte tijd, uiteenlopend van seconden tot minuten, de verbinding tussen 2 aminozuren in een eiwit of een peptide verbreken. De eiwitten en peptiden waarvan de verbinding tussen aminozuren wordt verbroken, zijn dus substraten voor de werking van proteasen. Het verloop van deze enzymatische splitsing kan tegenwoordig op eenvoudige wijze worden aangetoond, bijvoorbeeld door



Afb. 2. Voorbeeld van een diagnostische test die is gebaseerd op antilichamen, de speeksel hiv-test. (Bron: OraSure Technologies, Inc)

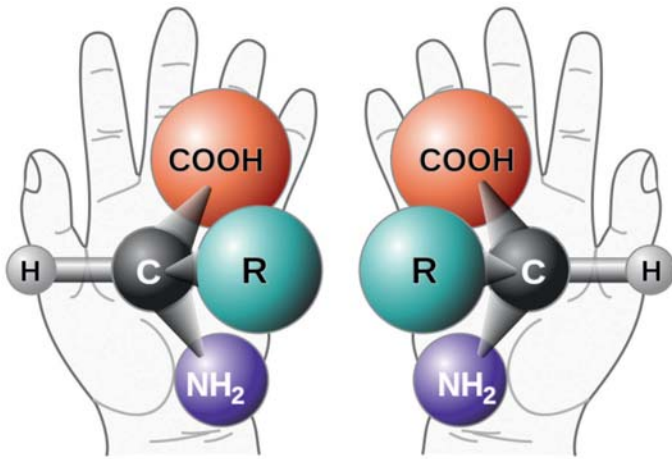


Afb. 3. Een proteasesubstraat bestaat uit aminozuren. Wanneer een protease het substraat knipt, valt het in brokstukken uiteen.

kleurverandering of fluorescentie (afb. 3). Proteasen worden niet verbruikt bij de splitsing van aminozuren en in theorie kunnen ze dus een sterk signaal genereren.

Proteasen spelen een cruciale rol in verschillende cellulaire en biochemische processen. Een voorbeeld van bacteriële proteasen zijn de gingipainen die afkomstig zijn van *Porphyromonas gingivalis*. Gingipainen spelen een belangrijke rol in de virulentie van *Porphyromonas gingivalis* doordat ze bindweefsel afbreken. Voorbeelden van humane proteasen zijn trypsine en cathepsine die worden aangemaakt door macrofagen voor de afweer van een bacteriële infectie.

Meer dan 20 jaar geleden zijn al proteasesubstraten gebruikt voor diagnostiek van paropathogene bacteriën die zijn betrokken bij halitose. Het proteasesubstraat dat het meest veelbelovend leek voor orale diagnostiek is benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) (Loesche et al, 1990). BANA wordt afgebroken door proteasen die afkomstig zijn van *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* en *Bacteroides forsythus* en kan daarom worden gebruikt om de aanwezigheid van ten minste 1 van deze bacteriën te detecteren. BANA wordt echter ook gesplitst door humane enzymen, zoals trypsine. Bovendien is het kleursignaal dat ontstaat bij splitsing van BANA niet erg sterk en daarmee zijn de sensitiviteit en de specificiteit van de test niet erg groot. Door dit gebrek aan sensitiviteit en specificiteit heeft de diagnostiek met BANA binnen de mondzorg nooit een hoge vlucht genomen.



Afb. 4. L- en D-aminozuren zijn optische isomeren, oftewel elkaars spiegelbeelden. (Bron: www.wikipedia.org)

Substraten met uniciteit voor bacteriële proteasen

Proteasen hebben vaak een voorkeur voor de plaats waar ze in een aminozuurketen knippen. Trypsine bijvoorbeeld splitst bij voorkeur achter een positief geladen aminozuur. Chymotrypsine daarentegen splitst achter ongeladen aminozuren met vetachtige, waterafstotende eigenschappen. Zo heeft elk type protease 1 of meerdere aminozuren van voorkeur. In theorie zou deze uniciteit kunnen worden gebruikt om substraten te ontwikkelen die slechts door 1 bepaald type protease kunnen worden gesplitst. In de praktijk is echter gebleken dat verschillende proteasen toch vaak hetzelfde substraat kunnen afbreken, zoals in het geval van BANA. Daardoor is een test op basis van proteasen ongeschikt. Voor microbiële diagnostiek is het echter van wezenlijk belang dat substraten uniciteit hebben voor een bepaalde bacteriële protease. Omdat deze substraten tot dusver niet voor handen zijn, wordt soms als tussenoplossing ervoor gekozen proteasen eerst te isoleren uit (gekweekte) bacteriën, waarna de uniciteit met substraten wordt bevestigd. Het zal duidelijk zijn dat deze kostbare, ingewikkelde en tijdrovende methode ongeschikt is voor snelle diagnostiek en alleen maar in uitzonderlijke gevallen wordt toegepast.

Een aantal jaren geleden zijn substraten ontwikkeld die vrijwel uniek zijn voor bacteriële proteasen. Om de essentie van deze methode te begrijpen, is het nodig dieper in te gaan op een kenmerkende eigenschap van aminozuren. Aminozuren zijn asymmetrische moleculen die in spiegelbeeldige vormen kunnen voorkomen, de links- ('levorotary') en de rechtsdraaiende ('dextrorotary') vorm (afb. 4). In het menselijk lichaam worden alleen linksdraaiende of L-aminozuren gebruikt als bouwstenen voor eiwitten. Bacteriën zijn echter in staat ook rechtsdraaiende of D-aminozuren te gebruiken, bijvoorbeeld voor de opbouw van hun celwand.

L- en D-aminozuren hebben chemisch gezien identieke eigenschappen. Het enige waarin ze verschillen is dat ze elkaars spiegelbeeld zijn. Dit verschil in vorm gaat pas een rol spelen in processen waarbij aminozuren precies moe-

ten passen in een ander molecuul, bijvoorbeeld in een protease. Zoals sommige instrumenten alleen geschikt zijn voor gebruik door linkshandigen, zo kunnen humane proteasen alleen eiwitten knippen die zijn opgebouwd uit L-aminozuren. Het besef dat bacteriën in staat zijn om te gaan met D-aminozuren heeft als uitgangspunt gediend bij de zoektocht naar substraten die specifiek worden afgebroken door bacteriële proteasen. Ontdekt werd bijvoorbeeld dat een substraat bestaande uit 2 L-aminozuren werd afgebroken door veel verschillende humane en bacteriële proteasen. Na het vervangen van een L-aminozuur door een D-aminozuur werd het eiwit uitsluitend herkend door *Bacillus anthracis* en aanverwante soorten bacteriën die in verband worden gebracht met voedselvergiftiging en bioterrorisme (Anthrax-brieven) (Kaman et al, 2011).

Om te onderzoeken of deze methode ook toepasbaar was voor het detecteren van paropathogenen, zoals *Porphyromonas gingivalis*, zijn 115 verschillende substraten gemaakt. Deze 115 varianten kunnen worden onderverdeeld in 3 groepen. Groep 1: substraten bestaande uit 2 L-aminozuren; groep 2: substraten bestaande uit 2 D-aminozuren en groep 3: substraten bestaande uit 1 L- en 1 D-aminozuur. De substraten uit groep 1 werden afgebroken door een grote verscheidenheid aan bacteriële en humane proteasen. De substraten uit groep 2 daarentegen werden niet of nauwelijks afgebroken. Maar in groep 3 werden 5 substraten snel en specifiek afgebroken door proteasen van *Porphyromonas gingivalis*. Proteasen die door andere orale pathogenen, waaronder *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en *Fusobacterium nucleatum*, werden aangemaakt, braken deze substraten niet af. Ook humane proteasen of proteasen die voorkomen in speeksel braken deze substraten niet af (Kaman et al, 2012). De aanwezigheid van D-aminozuren in combinatie met L-aminozuren in een substraat bleek dus de sleutel te zijn tot het aantonen van bacteriële proteolytische uniciteit.

Onderzocht werd of deze methode in potentie kan worden gebruikt voor snelle diagnostiek in speeksel. Met de substraten van *Porphyromonas gingivalis* werden scores voor specificiteit behaald tussen de 96-100% ten opzichte van bacteriekweek. Dat wil zeggen dat een negatieve test voor 96-100% werd bevestigd met een bacteriekweek. De specificiteit van BANA was in hetzelfde onderzoek 85%. Daarnaast werd vastgesteld dat de sensitiviteit van de substraten van *Porphyromonas gingivalis* 60-75% was ten opzichte van een bacteriekweek, terwijl de sensitiviteit van BANA voor *Porphyromonas gingivalis* in hetzelfde onderzoek 40% was. De snelheid waarbinnen een betrouwbaar signaal kon worden gemeten was 10 minuten (Galassi et al, 2012; Kaman et al, 2012). Inmiddels is vervolgonderzoek gaande om de techniek te modificeren zodat de activiteit van deze substraten met het blote oog kan worden vastgesteld, naar analogie van bijvoorbeeld zwangerschapstesten.

De diagnostiek gebaseerd op proteasesubstraten die D-aminozuren bevatten, heeft dus de potentie uit te groeien tot een methode voor snelle diagnostiek in mondzorgpraktijken.

Literatuur

- * Boutaga K, Winkelhoff AJ van, Vandembroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4950-4954.
- * Galassi F, Kaman WE, Anssari Moin D, et al. Comparing culture, real-time PCR and fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Porphyromonas gingivalis* in patients with or without peri-implant infections. *J Periodont Res* 2012; 47: 616-625.
- * Kaman WE, Hulst AG, Alphen PTW van, et al. Peptide-based fluorescence resonance energy transfer protease substrates for the detection and diagnosis of *Bacillus* species. *Anal Chem* 2011; 83: 2511-2517.
- * Kaman WE, Galassi F, Soet JJ de, et al. Highly specific protease-based approach for detection of *Porphyromonas gingivalis* in diagnosis of periodontitis. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 104-112.
- * Loesche WJ, Bretz WA, Kerschensteiner D, et al. Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-DL-arginine-naphthylamide. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1551-1559.
- * Roberts KJ, Grusky O, Swanson AN. Outcomes of blood and oral fluid rapid HIV testing: a literature review, 2000-2006. *Aids Patient Care Stds* 2007; 21: 621-637.
- * Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real-time PCR. *Microbiol Immunol* 2001; 45: 39-44.
- * Slots J, Hafström C, Rosling B, Dahlén G. Detection of *Actinobacillus-actinomycetemcomitans* and *Bacteroides-gingivalis* in subgingival smears by the indirect fluorescent-antibody technique. *J Periodont Res* 1985; 20: 613-620.
- * Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giunelli B, Lakhssassi N, Sixou M. Carpegen® real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21: 341-346.

Summary**Dextrorotary protease substrates could be suitable for oral microbiological diagnostics**

*The currently available methods for the identification of micro-organisms in a clinical sample are time consuming, complex or lack sensitivity and specificity. Consequently, no tests are available for rapid microbiological diagnostics in dental clinics so far. Based on the fact that bacteria possess unique enzymes for processing dextrorotary amino acids, a rapid method has been developed to detect metabolically active bacteria. Using dextrorotary amino acid containing substrates, *Porphyromonas gingivalis* could be detected in clinical samples with a specificity of 96-100% within 10 minutes. This new method opens the door for the development of a rapid oral diagnostic microbiological test.*

Bron

F.J. Bikker¹, W.E. Kaman^{1,2}, E.C.I. Veerman¹

Uit 'de afdeling Conserverende en Preventieve Tandheelkunde van het Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA) en ²de afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten van het Erasmus Medisch Centrum te Rotterdam

Datum van acceptatie: 26 november 2012

Adres: dr. F.J. Bikker, ACTA, Gustav Mahlerlaan 3004, 1081 LA Amsterdam
fbikker@acta.nl