

Aggregatibacter actinomycetemcomitans – osobna iskaznica parodontopatogena

Larisa Musić, dr.med.dent.¹

Dr.sc. Ivan Puhar²

[1] Diplomirala u akademskoj godini 2013./2014.

[2] Zavod za parodontologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Uvod

Aggregatibacter actinomycetemcomitans bakterija je donedavno u literaturi poznata kao *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; reklasificirana je s bakterijama *Haemophilus aphrophilus* i *H. paraphrophilus* u novi, predloženi rod *Aggregatibacter* 2006. godine na temelju njihove filogenetske sličnosti. Prvi ju je put, pod nazivom *Bacterium actinomycetemcomitans*, opisao Klinger 1912. godine kao kokobacil izoliran zajedno s bakterijama roda *Actinomyces* iz aktinomikotičkih lezija čovjeka. Ime vrste dobila je zahvaljujući baš toj činjenici, a ime roda *Aggregatibacter* možemo pripisati njenoj tendenciji da u tekućem mediju raste u malim granulicama koje adheriraju uz površinu spremnika (1).

A. actinomycetemcomitans je nepokretni, spororastući, kapnofilni (zahtjeva atmosferu s povećanim koncentracijom CO₂), Gram-negativni kokobacil. Raste sporo na temperaturi od 37°C, u aerobnim ili anaerobnim uvjetima, u tekućim i čvrstim medijima, u atmosferi s otprilike 5% CO₂. Nakon 24 sata kolonije postaju vidljive te postižu promjer od 3 mm nakon nekoliko dana; isprva glatke, kupolaste i prozirne, kasnije postaju nazubljene, zvjezdastog oblika (Slika 1) (2).

Klasificirano je 5 sero skupina *A. actinomycetemcomitans* na temelju površinskih polisaharida, od čega su serotipovi a, b i c najčešće prisutni u usnoj šupljini. I dok se serotip c najčešće nalazi u zdravih pojedinaca, jedan specifični klon b serotipa pokazuje povećanu leukotoksičnu aktivnost i predominantno se povezuje sa slučajevima lokaliziranog agresivnog parodontitisa (2, 3, 4).

Mikrobiologija

Theilade je 1986. godine u svom radu „*The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases*“ predložio tzv. hipotezu nespecifičnog plaka (eng. *Non Specific Plaque Hypothesis*); cjelokupna mikrobiološka flora oralnog plaka i njihovi štetni produkti, prema toj teoriji, smatrani su uzrokom parodontne bolesti (5). Spoznajom da postoje biološki relevantne razlike u sastavu plaka i da je u parodontnim lezijama prisutan veći broj pojedinih mikroorganizama naspram klinički zdravih, mijenja se stajalište o parodontitisu kao bolesti uzrokovanoj specifičnim patogenima, što se u literaturi naziva hipotezom specifičnog plaka (6). Upravo je *A. actinomycetemcomitans* prvi bio prepoznat kao mogući parodontni patogen zbog povećane detekcije i većeg broja u lezijama lokaliziranog agresivnog parodontitisa u usporedbi s drugim kliničkim stanjima i zdravim parodontom. Interes za identifikacijom bakterija koje doprinose nastanku i napretku parodontne bolesti postoji dakle već od 70-ih, međutim nekoliko je čimbenika predstavljalo problem u tom pokušaju. Neke od patogena nije moguće uzgojiti u kulturi, već su tek moderne laboratorijske tehnike omogućile njihovu identifikaciju DNA sekvencioniranjem. Nadalje, Kochove postulate koji karakteriziraju klasičnu infekciju, bilo je nemoguće primijeniti na parodontitis. Parodontnim patogenima potrebno je dugo inkubacijsko vrijeme, mogu se naći i u asimptomatskog nositelja ili im je ograničen spektar domaćina. Socransky je tako početkom 90-ih pred-

ložio modificirane postulate utvrđene za parodontitis, a koje karakteriziraju oportunističku infekciju: 1) asocijacija (uzročnik se na aktivnim „mjestima“ mora naći u većem broju nego na neaktivnim), 2) eliminacija (eliminacija uzročnika bi trebala zaustaviti napredovanje bolesti), 3) odgovor domaćina (stanični ili humoralni imunološki odgovor trebao bi dokazivati specifičnu ulogu uzročnika u bolesti), 4) faktori virulencije (uzročnik bi trebao posjedovati faktore virulencije koji su važni za početak procesa i 5) pokus na životinjama (na životinjskom modelu mora se dokazati da patogen uzrokuje bolest) (7). Tablica 1. prikazuje kako je najveći broj istraživanja dokazao visok stupanj patogenosti *A. actinomycetemcomitans* prema postulatima Socranskog (8).

Oportunistički patogen

Kako je parodontitis bolest multifaktorske etiologije, za nastanak bolesti ne vezujemo isključivo prisutnost bakterije, iako patogeni mikroorganizmi subgingivnog biofilma jesu primarni etiološki faktor. Bez obzira na kolonizirane patogene, domaćin ne mora uopće pokazati znakove bolesti ili se oni javljaju u veoma varijabilnom vremenskom razdoblju. Razvoj parodontne bolesti ovisi o istodobnom tijeku niza događaja – domaćin mora biti osjetljiv i lokalno i sistemski. Genetski određena nespecifična i specifična obrana te opći sindromi i bolesti, navike (pušenje, alkohol!), stres i psihološki faktori koji su isto tako pod utjecajem socijalne okoline, karike su u razvoju i napredovanju parodontitisa.

A. actinomycetemcomitans je bakterija koja je dio normalne flore usne šupljine u mnogih zdravih pojedinaca, ali predstavlja i potencijalni patogen. Ono što iznenađuje jest brojnost moćnih faktora i mehanizama virulencije ove bakterije, a koji joj osiguravaju preživljavanje u usnoj šupljini i odlučujući su za njen destruktivni potencijal u bolesnim stanjima koje izaziva. Bakterijska adhezija koja olakšava kolonizaciju jest jedan od najvažnijih mehanizama virulencije, a bakterijske strukture vanjske površine, koje ju osiguravaju stvaranjem veza sa specifičnim receptora na površini stanica domaćina, nazivaju se adhezinima. Bakterija tako može prijanjati na zube, epitelne stanice, druge bakterije i ekstracelularni matriks. Fimbrije im, primjerice, omogućavaju 2 – 3x lakšu adheziju (9). Osim adhezina, promociju kolonizacije i perzistenciju ove bakterije u usnoj šupljini osiguravaju i bakteriozini (aktinobacilin djeluje na aktinomicete i streptokoke koji su primarni kolonizatori) i invazini (prodiru u neke fagocite). Jedan od faktora virulencije *A. actinomycetemcomitans* jest i endotoksin (lipopolisaharid) koji izaziva resorpciju kosti i upalu, a kolagenaze i citotoksini koji djeluju na fibroblaste oštećuju vezivno tkivo i ekstracelularni matriks. Bakterija djeluje i na imunosni odgovor domaćina proizvodnjom imunosupresivnih faktora koji smanjuju stvaranje IgG i IgM, slabljenjem aktivacije komplementa i ometanjem kemotaksije, djelujući protiv PMN (8, 10). Zapaženo je da *A. actinomycetemcomitans* izlučuje sekrete iz membranskog mjehurića (eng. vesicles) – kako oni mogu sadržavati leukotoksin, endotoksin i ostale čimbenike, membranski mjehurići također predstavljaju važan čimbenik virulentnosti (11). Dokazano je da *A. actinomycetemcomitans* također ima sposobnost invazije stanica gingivnog epitela, međutim tek oko 25% bakterijskih izolata je invazivno (9). Adhezini su odgovorni za vezanje bakterije za stanicu, nakon čega slijedi endocitički proces. Bakterija preživljava kisele uvjete unutar endosoma te se zato

nakon njegova raspada živa može naći unutar citoplazme stanice domaćina. (Slika 2) (12, 13). Specifičnost *A. actinomycetemcomitans* je njena mogućnost brzog umnožavanja u stanici, izlaska iz stanice nakon invazije i invazije sljedeće stanice (9).

Leukotoksin

A. actinomycetemcomitans izražava dva egzotoksina, citoletalni rastegnuti toksin (eng. *citolethal distending toxin*, Cdt) i leukotoksin, koji je najmoćniji faktor virulencije koji izražava *A. actinomycetemcomitans*. Cdt izražava veliki broj Gram-negativnih bakterija i uzrokuju smrt stanica domaćina na način da blokiraju njihovu proliferaciju, međutim nije u potpunosti razjašnjena njegova uloga u nastanku bolesti. Leukotoksin pak selektivno utječe na ljudske stanice hematopoetskog porijekla (i nekih drugih primata), vežući se na specifične receptore (LFA-1 receptori, eng. *lymphocyte function associated receptor-1*) i narušavajući integritet membrane, uzrokujući nastanak pora (u manjim koncentracijama) ili potpuni kolaps membrane (u višim koncentracijama). Pripada porodici RTX (eng. *Repeats in ToXin*, ponavljanja u toksinu) litičkih toksina. Iako se isprva smatralo kako leukotoksin djeluje samo na PMN i monocite, danas se zna da u višim koncentracijama utječe i na eritrocite i limfocite (14, 15). Mnogi od preko 40 podtipova *A. actinomycetemcomitans* ne izražavaju leukotoksin – dokazano je da bakterije izolirane iz oboljelih pacijenata pokazuju značajno izraženiju leukotoksičnost od onih parodontološki zdravih, a izražena leukotoksičnost povezuje se s modifikacijama promotora i operona gena koji kodira leukotoksin (3, 4).

Povezanost s parodontnim bolestima

Kao što je već spomenuto, istraživanja su povezala povišene razine bakterije *A. actinomycetemcomitans* u aktivnim područjima kod pacijenata s lokaliziranim

agresivnim parodontitisom. Dapače, studije o povezanosti pokazale su da je *A. actinomycetemcomitans* izoliran u 90% pacijenata oboljelih od lokaliziranog agresivnog parodontitisa. Lokalizirani agresivni parodontitis najčešće karakterizira njegova pojava oko i za vrijeme puberteta, a javlja se lokalizirano na prvom kutnjaku/sjekutiću, s interproksimalnim gubitkom pričvrstka na najmanje dva trajna zuba, od kojih je jedan prvi kutnjak i ne zahvaća više od dva zuba koji nisu sjekutić/kutnjak. Pokazalo se i da većina pacijenata s lokaliziranim agresivnim parodontitisom ima izrazito povećan broj serumskih antitijela na *A. actinomycetemcomitans*, a postoji i lokalna sinteza antitijela na ovaj mikroorganizam. Imunodominantni antigen *A. actinomycetemcomitans* serotipno je specifičan, a većina protutijela koja se vežu na njega sastoji se od IgG. U serumu pacijenata s lokaliziranim agresivnim parodontitisom dokazan je visok titar i snaga vezanja IgG2 specifičnog za *A. actinomycetemcomitans*, a smatra se da je visoki titar antitijela domaćinov mehanizam da lokalizira gubitak pričvrstka na manjem području i time se štiti od raširenog agresivnog parodontitisa (11). Potvrđujući jedan od postulata po Socranskom, eliminacijom bakterija, odnosno smanjenjem njihova broja, liječenje se pokazalo uspješnim, dok je loš i neuspjeli ishod terapije vezan za nemogućnost smanjenja subgingivalnih naslaga i samim time bakterija. U uvodu je već navedeno kako bakterije serotipa b vezujemo za nastanak lokaliziranog agresivnog parodontitisa.

Ovaj se patogen također može naći kod pacijenata s generaliziranim agresivnim parodontitisom, uz bakterije *Porphyromonas gingivalis* i *Tannerella forsythensis*, međutim nesmatra se glavnim uzročnikom bolesti. Pacijenti oboljeli od generaliziranog agresivnog parodontitisa također su često seronegativni na *A. actinomycetemcomitans*, odnosno kod njih je izražen nizak titar i snaga vezanja (11).

Funkcije regulirane quorum sensingom

Quorum sensing je oblik bakterijske komunikacije koja omogućuje bakteriji spoznaju o gustoći bakterijske populacije, sukladno čemu cijela populacija prilagođava svoje „ponašanje“, odnosno gensku ekspresiju. Bakterije proizvode signalne molekule, tzv. autoinduktore, čija se koncentracija povećava proporcionalno s rastom bakterijske populacije. Kada koncentracija signalnih molekula dosegne podražajni prag, dolazi do transkripcije gena za neki protein, čime se izražava neka od funkcija bakterijske stanice. Istraživanja su pokazala kako *A. actinomycetemcomitans* posjeduje autoinduktor-2 (AI-2) quorum sensing sustav; on je usko povezan uz sposobnost bakterije da formira biofilm. Inaktivacijom QS sustava u mutantnih sojeva onemogućeno je bakteriji da formira biofilm ili je rast biofilma ograničen (16, 17). Dokazana je i povezanost AI-2 QS sustava u unosa željeza u stanicu; ono je bakterijama esencijalno za mnoge različite funkcije - procesi intermedijarnog metabolizma poput oksidativne fosforilacije, prijenosa elektrona ili aromatske biosinteze zahtijevaju željezo, isto kao i određeni proteini (citokromi, flavoproteini, feritin) i enzimi (peroksidaza, superoksid dismutaza), a važno je i za regulaciju metaboličkih proizvoda poput porfirina, toksina, vitamina, pa čak i DNA i

RNA bakterije. U mutantnih sojeva, s inaktiviranim QS sustavom, smanjen je unos željeza iz proteina (transferina i hemoglobina) domaćina. Potvrđena je i o autoinduktoru-2-ovisna regulacija gena koji kodiraju proteine vanjske membrane bakterije, enzime, transkripcijske regulatore i komponente fimbrija. Inaktivacijom QS sustava također je smanjena ekspresija leukotoksina, bakterijinog najjačeg faktora virulencije (18).

Povezanost *A. actinomycetemcomitans*, bakterijskog endokarditisa i drugih infekcija


Aggregatibacter actinomycetemcomitans i bakterije roda *Haemophilus*, *Cardiobacterium*, *Eikenella* i *Kingella* (tzv. HACEK grupa mikroorganizama) normalna su flora orofaringealnog područja, a povezani su s nastankom infektivnog endokarditisa. *A. actinomycetemcomitans* je drugi najčešći uzročnik infektivnog endokarditisa iz HACEK skupine bakterija (19). Pregled radova iz 2004. obuhvaća 102 do tada zabilježena i u znanstvenim časopisima objavljena slučaja bakterijskog endokarditisa uzrokovanih *A. actinomycetemcomitans*. Prijašnja bolest srca, pokazalo se, veoma je važan faktor za razvoj bakterijskog endokarditisa, a najčešće zahvaćeno mjesto jest aortalna valvula (2).

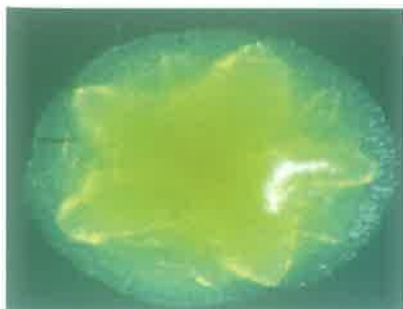
Najbolji dokaz sistemskog utjecaja

A. actinomycetemcomitans je pozitivan nalaz bakterije u endarterektomiranim uzorcima koronarnog aterosklerotskog plaka kod pacijenata kod kojih je ista bila prisutna i u subgingivnom plaku (21).

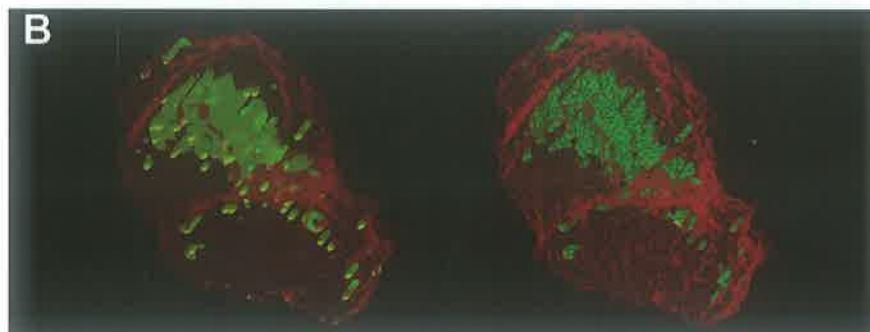
U literaturi su opisane i mnoge druge različite infekcije uzrokovane *A. actinomycetemcomitans*, uključujući endoftalmitis, apsces mozga, septikemija u trudnoći, plućna infekcija, perikarditis, septički artritis, vertebralni osteomijelitis i kronični limfadenitis. *A. actinomycetemcomitans* također se može naći uz bakterije roda *Actinomyces* u aktinomikozama (2).

Zaključak

Uloga *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* kao vrlo važnog etiološkog čimbenika u nastanku lokaliziranog agresivnog parodontitisa znanstveno je potvrđena. Riječ je o bakteriji koja je često u zdravih pojedinaca dio komenzalne flore usne šupljine, ali isto tako i o oportunističkom patogenu koji ima destruktivni učinak zahvaljujući nizu različitih i moćnih faktora virulencije. Nove tehnološke metodologije i proučavanje genoma bakterije dali su neke od odgovora na pitanja kako je moguće da „ponašanje“ bakterije varira između različitih bakterijskih serotipova i kakve to ima posljedice u patološkim stanjima poput parodontitisa. 



Slika 1 Kolonija *A. actinomycetemcomitans* karakterističnog zvjezdastog oblika. Preuzeto iz (22)



Slika 2 Trodimenzionalna rekonstrukcija stanice hibridizirane probama specifičnima za *A. actinomycetemcomitans*. Bakterije (zeleno) se nalaze intracelularno (stanica – crvena). Značajno je za primijetiti masivan cluster bakterija u sredini stanice! Preuzeto iz (23)

Tablica 1. Stupanj patogenosti različitih mikroorganizama (narančasto označene – narančasti kompleks, crveno označene – crveni kompleks, A. actinomycetemcomitans posebno označen) prema postulatima Socranskog. Preuzeto i prerađeno iz (8)

Postulati po Socranskom →		Asocijacija	Eliminacija	Odgovor domaćina	Faktori virulencije	Pokusi na životinjama
↓ Vrsta bakterije						
Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	+++	+++	+++	+++	+++
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+++	+++	+++	+++	+++
Pi	<i>Prevotella intermedia</i>	+++	++	++	+++	+++
<td><i>Fusobacterium nucleatum</i></td> <td>+++</td> <td>+</td> <td>+++</td> <td>++</td> <td>+</td>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+++	+	+++	++	+
Tf	<i>Tannerella forsythensis</i>	+++	++	+	+++	+

* broj križića pokazuje čestoću studija s pozitivnim rezultatima

LITERATURA

- Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56(9):2135-46.
- Taylor LS, Selwyn DRL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) [homepage on the Internet]. No date [cited 29.10.2014.]. Available from: www.antimicrobe.org/new/b72.asp
- Zambon JJ, Slots J, Genco RJ. Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect Immun.* 1983;41:19-27.
- Haubek D, Johansson A. Pathogenicity of the highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its geographic dissemination and role in aggressive periodontitis. *J Oral Microbiol.* Published online Aug 14, 2014.
- Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1986;13(10):905-11.
- Loesche WJ. The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease. *Dent Update.* 1992;19(2):68,70-2,74.
- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 1992;63(4):322-31.
- Wolf HF, Rateitschak-Plüss EM, Rateitschak KH. *Parodontologija: Stomatološki atlas.* 3rd ed. Jastrebarsko: Naklada Slap; 2009.
- Raja M, Ummer F, Dhivakar CP. *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* – A Tooth Killer? *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(8) doi: 10.7860/JCDR/2014/9845.4766
- Jain R, Mittal K, Kapoor S. Virulence factors of *A. actinomycetemcomitans* – A review. *J Pharm Biomed Sci* 2013;34(34):1693-8.
- Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Klinička parodontologija i dentalna implantologija – prema 4. izdanju.* Zagreb: Nakladni zavod Globus; 2004.
- Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1991;59(8):2719-26.
- Sreenivasan PK, Meyer DH, Fives-Taylor PM. Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 1993;61(4):1239–45.
- Mangan DF, Taichman NS, Lally ET, Wahl SM. Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect Immun.* 1991;59(9):3267-72.
- Balashova NV, Crosby JA, Al Ghofaily L, Kachlany SC. Leukotoxin confers beta-hemolytic activity to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 2006;74(4):2015-21.
- Shao H, Lamont RJ, Demuth DR. Auto-inducer 2 is required for biofilm growth of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infect Immun.* 2007;75(9):4211-8.
- Fine DH, Velliyagounder K, Furgang D, Kaplan JB. The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates. *Infect Immun.* 2005;73(4):1947-53.
- Fong KP, Gao L, Demuth DR. luxS and arcB control aerobic growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* under iron limitation. *Infect Immun.* 2003;71(1):298-308.
- Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(1):177-207.
- Patuarel L, Casalta JP, Habib G, Nezri M, Raoult D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:98-118.
- Rath SK, Mukherjee M, Kaushik R, Sen S, Kumar M. Periodontal pathogens in atheromatous plaque. *Indian J Pathol Microbiol.* 2014;57(2):259-64.
- Aggregatibacter actinomycetemcomitans* colony. [image on the internet] No date. [Cited 2014 Oct 27] Available from: <http://www.odont.umu.se/english/research/doctoral-projects/virulence/>
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. *Infect Immun.* 2001;69(4):2700-7.