



GENOTIPSKA KARAKTERIZACIJA SEVOV OPORTUNISTIČNEGA PATOGENA *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* PRI SLOVENSKIH BOLNIKIH S KRONIČNIM PARODONTITISOM, PRELIMINARNA RAZISKAVA

Genotype characterization of (opportunistic pathogen) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains from Slovenian patients with chronic periodontitis: a preliminary study

D. Obradović, R. Gašperšič, K. Seme, P. Maček, M. Butala

Izvleček

Izhodišče: Bakterija *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* je sicer lahko del normalne bakterijske flore ustne votline, določene seve pa se povezuje z nastankom agresivnejših oblik parodontalne bolezni ter z nekaterimi boleznimi srca in ožilja. Ni še raziskano, kako pogosto oportunistični patogen *A. actinomycetemcomitans* naseljuje subgingivalni biofilm slovenskih bolnikov s kroničnim parodontitisom. **Preiskovanci in metode:** V preliminarni študiji smo zbrali vzorce subgingivalnih oblog tridesetih slovenskih bolnikov z zmernim ali napredovalim kroničnim parodontitisom in pri izolatih z metodo verižne reakcije s polimerazo preverili prisotnost zapisov za virulentne dejavnike. **Rezultati:** Bakterijo *A. actinomycetemcomitans* smo našli pri 57 % bolnikov. Vsi izolati so imeli genetski zapis za najpomembnejše komponente levkotoksina, citotoksina Cdt in za kolonizacijo gostitelja pomembnih dejavnikov Flp-1 in ApaH. **Zaključki:** V nasprotju z ugotovitvami dosedanjih raziskav, da imajo sevi bakterije *A. actinomycetemcomitans* le redko hkrati zapis za vse komponente toksinov in nekatere druge dejavnike pomembne za kolonizacijo gostitelja, naši rezultati kažejo, da so sevi bolnikov v Sloveniji visoko virulentni. Posledično bi bilo pomembno izvesti raziskavo na večjem številu preiskovancev da bi ugotovili patogenetsko vlogo in genotipizirali te bakterije pri zdravih in obolelih posameznikih v Sloveniji.

Ključne besede:
kronični
parodontitis,
Aggregatibacter actinomycetemcomitans,
levkotoksin,
citotoksin Cdt,
serotipizacija

Abstract

Background: The opportunistic human pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* can form part of the normal bacterial flora of the oral cavity. However, some of its strains are implicated in the aetiology of aggressive forms of periodontitis and also in certain cardiovascular diseases. The prevalence and specific characteristics of this periodontal pathogen in the Slovenian population have not been investigated. **Patients and methods:** In this case series study, we collected subgingival plaque samples from 30 patients with moderate or advanced generalized chronic periodontitis. The PCR method with appropriate primers was used to test the isolates for the presence of important virulence factors. **Results:** We identified *A. actinomycetemcomitans* in 57 per cent of the patients. All isolates of *A. actinomycetemcomitans* from our patients harboured genes for leukotoxin, Cdt toxin and Flp-1 and ApaH colonization proteins. **Conclusions:** In contrast to earlier studies showing the presence of virulence determinants involved in the toxicity and colonization of this bacterium to be limited to 50 to 80 per cent of the isolates, our results indicate a high rate of virulence in isolates from Slovenian patients. Hence, our data suggest that *A. actinomycetemcomitans* strains may have a significant role in the pathogenesis of periodontal disease among Slovenians. These results indicate a need for further extensive characterization of the genotypic features of these strains in the Slovenian population.

Key words:
chronic
periodontitis,
Aggregatibacter actinomycetemcomitans,
leukotoxin,
cytotoxin Cdt,
serotypisation





Uvod

Parodontalna bolezen je kronična vnetna bolezen obzobnih tkiv, ki se v začetnem obdobju kaže z oteklino in rdečino dlesni, v napredovali fazi pa s propadom povezave med zobom in obzobnimi tkivi, nastankom obzobnih žepov, majavostjo in izpadom prizadetih zob (Skalerič in Kovač - Kavčič, 2000). Bolezen sprožijo bakterije zobnih oblog (t. i. biofilma), ki so nakopičene ob robu dlesni in v obzobnih žepih (Fine in sod., 2006). Bakterije v biofilmu sprožijo vnetni odgovor v obzobnih tkivih, ne da bi množično prodirale vanje. Nastanek mikrobne združbe (biofilma) na zobni površini je posledica pritrditve planktonskih bakterij na površino ustne votline ter zmožnost njihove koadhezije in izmenjave metabolitov med pari posameznih vrst bakterij (Kuboniwa in Lamont, 2010).

Bakterijske obloge v ustni votlini sestavlja več kot 700 bakterijskih vrst (Aas in sod., 2005). Površino zob in dlesni, prekrito z glikoproteini in polisaharidi slin, prvotno naselijo bakterije iz rodu aktinomicet in streptokokov, ki sintetizirajo številne dejavnike, potrebne za kolonizacijo, na katere se med izgradnjo zobnih oblog pritrjujejo poznejši naseljevalci ustne votline (Kolenbrander in sod., 2010). Kompleksna mikrobna združba je zgrajena v nekaj dneh (Quirynen in sod., 2005). Predvsem genotip in obrambni mehanizmi posameznika vplivajo na razvoj značilne, stalno prisotne mikrobne združbe v ustni votlini, ki sobiva skladno z gostiteljem (Slots in Ting, 1999).

V združbi bakterije komunicirajo z izmenjevanjem metabolitov, koordinirajo procese v biofilmu in odzive na razmere v okolju ter posledično spominjajo na večcelično, diferencirano tkivo evkariontov (Kolenbrander in sod., 2010; Ramsey in sod., 2011). Ta homeostaza se lahko poruši na primer zaradi delovanja stresnih dejavnikov okolja na bakterije in gostitelja, neustrezne ustne higijene ali/in oslabiljenega imunskega odziva gostitelja, kar lahko povzroči, da manjša populacija bakterij v biofilmu postane kompetitivnejša in se čezmerno namnoži ali da mesta v ustih kolonizirajo patogene bakterije iz okolja (Hajshengallis in sod., 2012). Takšno porušenje mikrobne združbe lahko stabilizira novo ravnovesje bakterijskih vrst v biofilmu, v katerem se ohranijo patogene bakterije v zadostnem številu v bližini obzobnih tkiv, kar vodi

v razvoj ali/in napredovanje parodontalne bolezni.

Med najpogosteje opisanimi patogeni v ustih izstopajo gramnegativne anaerobne in fakultativno anaerobne bakterije *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* in spiroheta *Treponema denticola* (Schacher in sod., 2007). Čeprav streptokoki v klasičnem patogenetskem modelu niso bili povezani z nastankom parodontalne bolezni, nove študije kažejo, da lahko delujejo kot »pomožni patogeni«, saj z izločanjem metabolitov omogočijo selektivno razrast ter zvečajo virulenco bakterij *A. actinomycetemcomitans* in *P. gingivalis* (Whitmore in Lamont, 2011).

Bolezni obzobnih tkiv torej povzročajo združbe mikrobov, ki omogočijo razrast in stimulirajo sintezo virulentnih dejavnikov patogenih bakterij, s katerimi zaobidejo obrambne mehanizme ter škodijo gostitelju (Fine in sod., 2006; Kolenbrander in sod., 2010). Dinamično naravo bakterij v biofilmu je zunaj gostitelja težko posnemati (Wessel in sod., 2013), zato je večina raziskav usmerjenih v razumevanje vpliva in potenciala posameznih bakterij na razvoj ustnih bolezni.

Ustna votlina ljudi je do zdaj edini poznani naravni habitat bakterije *A. actinomycetemcomitans* (Fine in sod., 2006). *A. actinomycetemcomitans* je sicer lahko del normalne ustne flore in poleg zobnih oblog kolonizira tudi druge predele ustne votline, bakterija je bila na primer iz slin izolirana pri 20 % splošne populacije odraslih na Finskem (Kononen in sod., 2007). Določeni sevi te bakterije lahko sintetizirajo številne dejavnike virulence ter vplivajo na razvoj kroničnih in agresivnih oblik parodontalne bolezni (Slots in Ting, 1999).

Ozdravitev parodontalne bolezni, ki nastane v povezavi z *A. actinomycetemcomitans*, je večinoma odvisna od odstranitve virulentnih sevov bakterije *A. actinomycetemcomitans* iz ustne votline (Fine in sod., 2007). Odstranitev zdravju škodljivih sevov *A. actinomycetemcomitans* iz zobnih oblog je najpogosteje uspešna po mehanski odstranitvi zobnih oblog v kombinaciji z antibiotikoma amoksicilin in metronidazol ali antibiotiki iz skupine tetraciklinov (Oettinger-Barak in sod., 2013).

Primerjava do zdaj poznanih 14 celotnih genomov *A. actinomycetemcomitans* kaže na raznoliko





organizacijo in zastopanost genov v genomih ter na različen nabor virulentnih dejavnikov med sevi (Kittichotirat in sod., 2011). Genotipsko se ti sevi razlikujejo predvsem v prisotnostih številnih otokov patogenosti z zapisi za dejavnike virulence, ki se lahko horizontalno širijo med bakterijami.

Virulentni sevi *A. actinomycetemcomitans* sintetizirajo dejavnike za kolonizacijo, invazijo (npr., pili Flp-1, faktor *ApaH*) ter dejavnike, ki zavrejo lokalni vnetno-imunski odziv v dlesni in povzročijo poškodbo obzobnih tkiv (npr. levkotoksin in citotoksin Cdt, angl., »*cytolethal dystending toxin*«) (Dogan in sod., 1999; Fine in sod., 2006). Levkotoksin povzroči razpad človeških levkocitov in eritrocitov, citotoksin Cdt pa uravnava celični cikel številnih evkariontskih celic, predvsem delečih se limfocitov, kar povzroči celično smrt (apoptozo) celic (DiRienzo, 2014; Kachlany, 2010).

Glede na imunsko-dominantni antigen na celični površini *A. actinomycetemcomitans*, to je O-polisaharid, izolate uvrščamo v sedem serotipov (a-g) (Henderson in sod., 2010; Tsuzukibashi in sod., 2014). Običajno se v gostitelju stabilno ohranja le po en serotip (Saarela in sod., 1992), v redkih primerih pa tudi dva ali trije različni serotipi te bakterije (Yoshida in sod., 2003).

Preseneča dejstvo, da se razširjenost in razporeditev določenih serotipov razlikujeta glede na zemljepisni položaj. Serotip b prevladuje pri bolnikih z agresivno obliko parodontitisa v ZDA, serotip c na Kitajskem, Japonskem, v Koreji in Turčiji, medtem ko so na Finskem, Švedskem in Danskem poglavitni in enakomerno zastopani serotipi a, b in c (Henderson in sod., 2010). Na takšno razširjenosti serotipov naj bi vplivala zmožnost prilagoditve določenih sevov te bakterije na majhne genetske raznolikosti v populacijah ljudi. Tako je v predelih SZ Afrike endemičen sev *A. actinomycetemcomitans* JP2, uvrščen v serotip b, ki zaradi delecije v promotorskem področju operona levkotoksina konstantno sintetizira veliko količino tega toksina (Haubek, 2010).

Prisotnost seva JP2 je povezana z nastankom juvenilnega, agresivnega lokaliziranega parodontitisa (Kononen in Muller, 2014). Nedavno so raziskovalci dokazali, da tudi nekatere druge spremembe, kot so točkovne mutacije v promotorskem področju operona za levkotoksin, vplivajo na zvečano sintezo levkotoksina in s tem virulenco

sevov, podobno tisti pri sevu JP2 (Hoglund Aberg in sod., 2014).

A. actinomycetemcomitans je modelni patogen za raziskave parodontalne bolezni in edina do zdaj poznana bakterija, ki je lahko del normalne človeške bakterijske flore ter nosi zapis za toksin Cdt in levkotoksin (Fine in sod., 2006). Ni še raziskano, kako pogosto oportunistični patogen *A. actinomycetemcomitans* naseljuje subgingivalni biofilm bolnikov s kroničnim parodontitisom v Sloveniji, prav tako še ni podatkov o zastopanosti posameznih serotipov pri slovenski populaciji in prisotnosti zapisa za virulentne dejavnike in s tem povezane patogenosti sevov.

Namen presečne raziskave je bil zato ugotoviti, kako pogosto *A. actinomycetemcomitans* naseljuje subgingivalni biofilm, pogostost prisotnosti posameznih serotipov sevov bakterije *A. actinomycetemcomitans*, ki smo jih izolirali pri bolnikih s kroničnim parodontitisom v Sloveniji, ter pogostost prisotnosti virulentnih dejavnikov, še posebej levkotoksina in citotoksina Cdt.

Preiskovanci in metode

Preiskovanci in izolacija A. actinomycetemcomitans

V študijo je bilo vključenih 30 bolnikov z zmernim ali napredujočim parodontitisom, ki so bili napoteni na zdravljenje parodontalne bolezni na Center za ustne bolezni in parodontologijo UKC. Vzorce subgingivalnih zobnih oblog smo jemali pri bolnikih, ki pred napotitvijo še niso bili zdravljeni.

V manj kot 24 urah smo vzorce suspendiranih bakterij nacepili na trdna selektivna gojišča, ki smo jih inkubirali v atmosferi z zvišanim tlakom CO₂ (10 %), pri 37 °C, do 7 dni. Bakterije *A. actinomycetemcomitans* smo identificirali na osnovi značilne morfologije kolonij zvezdastega videza, s testom na prisotnostjo katalaze in z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF (angl. *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) (Dingle in Butler-Wu, 2013). Izolati so bili shranjeni pri -80 °C. Podroben opis populacije, načina odvzema vzorcev, transporta, gojitvenih razmer in načina prepoznavanja bakterije *A. actinomycetemcomitans* je predstavljen v prispevku Sotoškove in sod. (2014) v tej številki Zobozdravstvenega vestnika.



Preglednica 1: Serotipizacija in prisotnost testiranih genov, pomembnih za virulenco *A. actinomycetemcomitans*, pri izolatih slovenskih bolnikov z zmernim ali napredovalim kroničnim parodontitisom.

Bolnik	Serotip	<i>ltxA</i>	<i>apaH</i>	<i>flp-1</i>	<i>cdtA</i>	<i>cdtB</i>	<i>cdtC</i>
1	B	+	+	+	+	+	+
2	C	+	+	+	+	+	+
3	C	+	+	+	+	+	+
4	C	+	+	+	+	+a	+
9	C	+	-	+	+	+	+
16	C	+	-	+	+	+a	+
18	B	+	+	+	+	+	+
20	C	+	+	+	+	+	+
22	C	+	+	+	+	+	+
25	B	+	+	+	+	+	+
31	C	+	+	+	+	+	+
32	C	+	+	+	+	+	+
34	A	+	+	+	+	+	+
35	B	+	+	+	+	+	+
36	Nd	+	+	+	+	+	+

ltxA: levkotoksin A, *apaH*: protein za invazijo, *flp-1*: poglavitni protein fimbrij, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*: podenota A, B in C toksina *cdt*, Nd. - Z v študiji uporabljenimi začetnimi oligonukleotidi serotipa nismo uspeli definirati. ^a - Krajša različica gena.

Izolacija genomske DNA izolatov *A. actinomycetemcomitans*

Izolate *A. actinomycetemcomitans* smo gojili tri dni brez stresanja pri 37 °C v tekočem selekcijskem gojišču: Brain Heart Infusion (BHI) z dodanim kvasnim ekstraktom, 15 mM HCO₂Na, 9 mM C₄H₂Na₂O₄. Iz treh mililitrov tako zrasle bakterijske kulture smo s kompletom Genomic DNA Purification kit (Thermo Scientific) po navodilih proizvajalca izolirali genomsko DNA *A. actinomycetemcomitans*. Izolate genomske DNA smo shranili pri -20 °C. Koncentracijo in čistost genomske DNA smo preverili spektrometrično, z aparatom NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

Detekcija virulentnih dejavnikov in serotipizacija izolatov *A. actinomycetemcomitans*

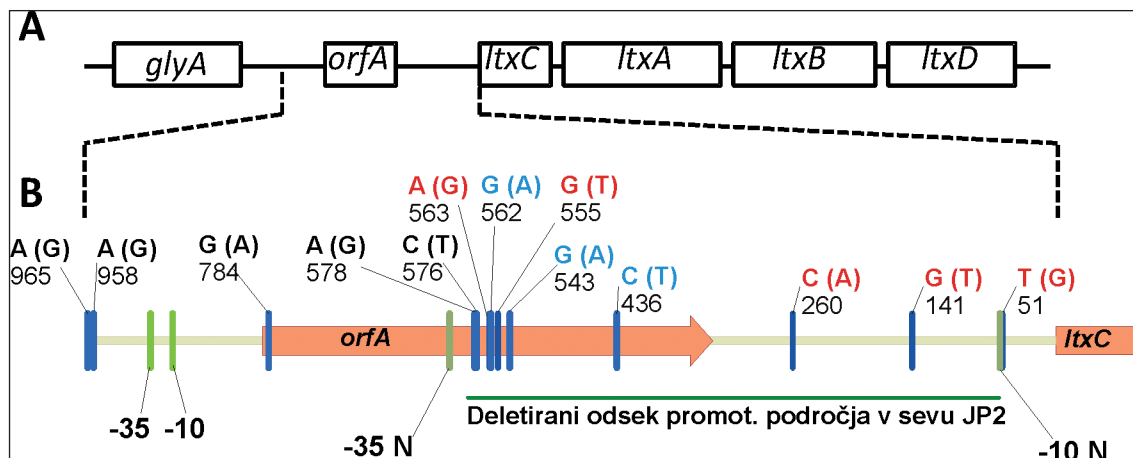
S pari specifičnih začetnih oligonukleotidov za kodirajoče regije genov za poglavitni protein fimbrij (Flp-1), proteina za invazijo bakterij (ApaH), komponent operona citotoksina Cdt (CdtA, CdtB, CdtC), levkotoksina (LtxA) oziroma promotorskega področja gena za LtxA (Wahasugui in sod., 2013) smo z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) pomnožili iz očiščene DNA *A. actinomycetemcomitans*. Serotipe sevov *A. actinomycetemcomitans* (a-f) smo določili glede na imunodominantni antigen na površini, O-polisaharid, kot navedeno (Kaplan in sod., 2001). Za pomnoževanje DNA smo uporabili DreamTaq DNA

Polymerazo (Thermo Scientific). Pomnožitev kodirajočih odsekov testiranih genov ter serotipizacija izolatov z verižno reakcijo s polimerazo sta potekali v razmerah, kot predhodno opisano (Kaplan in sod., 2001; Wahasugui in sod., 2013).

Pomnožke DNA smo pregledali z elektroforezo na 1,2-odstotnih agaroznih gelih, obarvanih z etidijevim bromidom, in jih primerjali s standardom, Generuler 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific). Promotorskemu področju gena *ltxA* smo določili nukleotidna zaporedja z uporabo nukleotidnih začetnikov 5`-GCAGGATCCATATTAATAATC-TCCTTGT-3` ali 5`-CGGTGACAACCTGATAA-CAGTATT-3`, določitev zaporedja je izvedlo podjetje MacroGen iz Nizozemske. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja promotorskega področja za levkotoksin smo preverili, ali kateri od izolatov spada med sev JP2.

Rezultati

Ugotovili smo, da subgingivalne zobne obloge sedemnajstih bolnikov naseljuje bakterija *A. actinomycetemcomitans*. Dva izolata bakterije *A. actinomycetemcomitans* sta slabo rasla v tekočem gojišču Aa, zato smo lahko izolirali genomsko DNA petnajstih izolatov, ki smo jih vključili v nadaljnjo analizo. Analiza pomnožkov kaže, da je večina (60 %) izolatov serotipa c (Preglednica 1).



Slika 1: Variabilnost promotorskega področja levkotoksina med izolati *A. actinomycetemcomitans*, izoliranimi iz bolnikov s kroničnim parodontitisom v Sloveniji. (A) Shematski prikaz okolice operona za levkotoksin (*ltxC*, *ltxA*, *ltxB*, *ltxD*). Promotorsko področje operona se razteza od stop kodona gena *glyA*, vsebuje kodirajočo regijo *orfA* za protein z neznano funkcijo, pa vse do začetka prvega gena operona, *ltxC*. (B) Prikaz dela promotorskega področja za levkotoksin in variabilnosti tega področja med sevi. Prikazano je področje v dolžini 969 nukleotidov. Spremembe nukleotidnega zaporedja v primerjavi z zaporedjem promotorskega področja levkotoksina *A. actinomycetemcomitans*, minimalno levkotoksičnega seva 652, ki je uvrščen v serotip c, (Številka zaporedja GeneBank: Z23268) (Brogan in sod., 1994) so navedene nad shematskim prikazom. Točkovne mutacije izolatov (npr. oznaka A(G) 965: Sprememba baze adenin v gvanin, 965 nukleotidov od začetka gena *ltxC*). V primerjavi z zaporedjem seva 652 so v črnem tisku prikazane nukleotidne zamenjave, prisotne v promotorskem področju levkotoksina pri sevih serotipa b in sevu z oznako 36, v rdečem nukleotidne zamenjave, specifične za sev 36, in v modrem zamenjave, identificirane v izolatih serotipa b, a ne pri sevu številka 36. Podpisano pod shematskim prikazom področja sta elementa -35 in -10 promotorja operona *ltx*. S horizontalno zeleno črto je označen deletirani odsek promotorskega področja v visoko levkotoksičnem sevu JP2, ki predvidoma vodi v nastanek novega, stalno aktivnega promotorja z elementoma promotorja, označenima z -35 N in -10 N (Brogan in sod., 1994).

Razen gena za ApaH, ki smo ga odkrili pri 13 izolatih, smo preostale tri testirane determinante virulence (*ltxA*, *fIO-1*, *cdtA*, *cdtB* in *cdtC*) odkrili pri vseh izolatih (Preglednica 1). Pri dveh izolatih smo dobili za 219 baznih parov krajši pomnožek gena *cdtB* (Wahasugui in sod., 2013). Z določitvijo nukleotidnega zaporedja teh variant gena *cdtB* smo ugotovili, da gre v obeh primerih za delecijo identičnega področja gena, ki vključuje tudi del katalitskega mesta proteina.

Med izolati nismo identificirali seva JP2 (Slika 1). Ugotovili smo, da se variabilnost v promotorskih področjih izolatov slovenskih bolnikov sklada s predhodno opisanimi. Promotorsko področje levkotoksina izolatov, uvrščenih v serotip b, vsebuje značilne zamenjave nukleotidov, kot so že bile opažene pri bakterijskih sevih tega serotipa (Chen in sod., 2012), področje levkotoksina seva številka 36 pa vsebuje vrsto specifičnih nukleotidnih zamenjav.

Razprava

Med prebivalci Slovenije je kronični parodontitis pogost, saj ima pri 50 letih bolezni v napredovali fazi že več kot 40 % populacije (Skalerič in sod., 2008). Kljub temu je sestava bakterijskih zobnih oblog, ki so primarni patogenetski dejavnik njegovega nastanka, slabo poznana. V prvem delu raziskave smo zato natančno opredelili pogostost prisotnosti najpogostejših parodontalno patogenih bakterij pri tridesetih bolnikih z zmernim ali napredovalim kroničnim parodontitisom ter bakterijo *A. actinomycetemcomitans* našli pri sedemnajstih bolnikih (57 %). Z metodo PCR smo ugotovili, da je 60 % izolatov *A. actinomycetemcomitans* serotipa c. To je zanimiva značilnost, ki je bila sicer opisana še pri posameznikih na Japonskem, Kitajskem, v Koreji in Turčiji (Henderson in sod., 2010). Vsi izolati *A. actinomycetemcomitans* so imeli zapis za vse testirane virulentne dejavnike za: kolonizacijo celic gostitelja





(gen *apaH*, poglavitno strukturno komponento fimbrij *flp-1*), operon citotoksina Cdt (*cdtABC*) in gen za levkotoksin (*ltxA*). To je v nasprotju z dosedanjimi ugotovitvami, saj imajo drugi poznani sevi *A. actinomycetemcomitans* le redko zapis za vse naštetje dejavnike virulence (Wahasugui in sod., 2013), operon Cdt je na primer prisoten pri 80–50 % sevov (Hoglund Aberg in sod., 2013; Jentsch in sod., 2012; Wang in sod., 2014).

Vsi bakterijski izolati *A. actinomycetemcomitans*, vključeni v študiji, imajo zapis za levkotoksin. Raziskovalci so v različnih populacijah dokazali prisotnost specifičnih visokovirulentnih sevov te bakterije, kot npr. seva JP2 v populaciji mediteranske Afrike (Haubek, 2010; Henderson in sod., 2010). Z določitvijo nukleotidnega zaporedja promotorskega področja za levkotoksin smo preverili, ali kateri od izolatov spada med sev JP2. Ta sev zaradi delecije v promotorskem področju operona levkotoksina konstantno sintetizira levkotoksin v visokih koncentracijah (Haubek, 2010) in je tesno povezan z nastankom juvenilnega, agresivnega lokaliziranega parodontitisa (Kononen in Muller, 2014).

Med izolati sicer nismo identificirali visokolevkotoksičnega seva JP2, verjamemo pa, da obstajajo med posamezniki v Sloveniji druge genotipske specifičnosti sevov bakterije *A. actinomycetemcomitans*, ki omogočijo prilagoditev na genetske značilnosti Slovencev. Promotorsko področje levkotoksina izolatov, uvrščenih v serotip b, namreč vsebuje značilne zamenjave nukleotidov, kot so že bile opažene pri bakterijskih sevih tega serotipa (Chen in sod., 2012), področje levkotoksina seva številka 36 pa vsebuje vrsto drugih specifičnih nukleotidnih zamenjav. Točkovne mutacije v promotorskem področju levkotoksina lahko vplivajo na uravnavo prepisa genov tega operona, posledično na zvečano ali zmanjšano sintezo toksina (Hoglund Aberg in sod., 2014).

Na specifikse sevov *A. actinomycetemcomitans* pri bolnikih s kroničnim parodontitisom v Sloveniji kaže tudi identifikacija krajše različice gena za katalitsko podenoto toksina Cdt (*cdtB*), ki smo jo našli pri dveh izolatih (Preglednica 1). Vse kaže, da je krajša različica toksina Cdt, opažena pri izolatih dveh pacientov, manj aktivna od divjega tipa toksina, kar lahko vpliva na virulentni potencial bakterije. Ta različica katalitske podenote tega

toksina še ni bila opisana, zato bomo njeno vlogo pri patogenezi bakterije *A. actinomycetemcomitans* testirali v prihodnje.

Rezultati študije kažejo, da bi bilo pomembno izvesti raziskavo z večjim številom vključenih preiskovancev, da bi lahko zaključili in statistično ovrednotili: (i) kateri serotip *A. actinomycetemcomitans* prevladuje v populaciji Slovencev, (ii) morebitno prisotnost seva JP2 in (iii) nakazali vlogo bakterij *A. actinomycetemcomitans* pri posameznikih z zdravimi obzobnimi tkivi ter posamezniki s parodontitisom v Sloveniji. Iz do zdaj zbranih podatkov pa že lahko sklepamo, da so sevi *A. actinomycetemcomitans* pri slovenskih bolnikih s kroničnim parodontitisom visokovirulentni in imajo pomembno vlogo pri razvoju parodontalne bolezni.

Zaključki

Pri 15 izolatih bakterije *A. actinomycetemcomitans*, ki smo jih našli pri 15 od skupno 30 bolnikov s kroničnim parodontitisom, je bil najpogosteje (60 %) prisoten serotip c, drugi pogostosti je bil serotip b (26 %). Vsi izolati bakterije *A. actinomycetemcomitans* so imeli zapis za najpomembnejše virulentne dejavnike: operon toksina Cdt (*cdtABC*), gen za katalitsko podenoto levkotoksina (*ltxA*) in gen, katerega produkt je pomemben za kolonizacijo gostitelja (*flp-1*). Zelo pogosto (v 86 % primerov) je bil prisoten tudi zapis za gen za *apaH*.

Reference

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5721–32.
- Brogan JM, Lally ET, Poulsen K, Kilian M, Demuth DR. Regulation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin expression: analysis of the promoter regions of leukotoxic and minimally leukotoxic strains. *Infect Immun* 1994; 62: 501–8.
- Chen C, Kittichotirat W, Chen W, Downey JS, Bumgarner R. Genome sequence of a serotype b non-JP2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strain, ANH9381, from a periodontally healthy individual. *J Bacteriol* 2012; 194: 1837.
- Dingle TC, Butler-Wu SM. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med* 2013; 33: 589–609.
- DiRienzo JM. Breaking the gingival epithelial barrier: Role of the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Cytolethal distending toxin in oral infectious disease. *Cells* 2014; 3: 476–99.



- Dogan B, Saarela MH, Jousimies-Somer H, Alaluusua S, Asikainen S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype e-biotypes, genetic diversity and distribution in relation to periodontal status. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14: 98–103.
- Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. *Periodontol* 2000 2006; 42: 114–57.
- Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3859–69.
- Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 717–25.
- Haubek D. The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: evolutionary aspects, epidemiology and etiological role in aggressive periodontitis. *APMIS* 2010; Suppl: 1–53.
- Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontol* 2000 2010; 54: 78–105.
- Hoglund Aberg C, Antonoglou G, Haubek D, Kwamin F, Claesson R, Johansson A. Cytolethal distending toxin in isolates of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* from Ghanaian adolescents and association with serotype and disease progression. *PLoS One* 2013; 8: e65781.
- Hoglund Aberg C, Haubek D, Kwamin F, Johansson A, Claesson R. Leukotoxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and periodontal attachment loss. *PLoS One* 2014; 9: e104095.
- Jentsch H, Cachovan G, Guentsch A, Eickholz P, Pfister W, Eick S. Characterization of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains in periodontitis patients in Germany. *Clin Oral Investig* 2012; 16: 1589–97.
- Kachlany SC. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res* 2010; 89: 561–70.
- Kaplan JB, Perry MB, MacLean LL, Furgang D, Wilson ME, Fine DH. Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infect Immun* 2001; 69: 5375–84.
- Kittichotirat W, Bumgarner RE, Asikainen S, Chen C. Identification of the pangenome and its components in 14 distinct *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains by comparative genomic analysis. *PLoS One* 2011; 6: e22420.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 471–80.
- Kononen E, Muller HP. Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000 2014; 65: 46–78.
- Kononen E, Paju S, Pussinen PJ, Hyvonen M, Di Tella P, Suominen-Taipale L, et al. Population-based study of salivary carriage of periodontal pathogens in adults. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2446–51.
- Kuboniwa M, Lamont RJ. Subgingival biofilm formation. *Periodontol* 2000 2010; 52: 38–52.
- Oettinger-Barak O, Dashper SG, Catmull DV, Adams GG, Sela MN, Machtei EE, et al. Antibiotic susceptibility of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 in a biofilm. *J Oral Microbiol* 2013; 5: 1–8.
- Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, et al. Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets. *J Dent Res* 2005; 84: 340–4.
- Ramsey MM, Rumbaugh KP, Whiteley M. Metabolite cross-feeding enhances virulence in a model polymicrobial infection. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002012.
- Saarela M, Asikainen S, Alaluusua S, Pyhala L, Lai CH, Jousimies-Somer H. Frequency and stability of mono- or poly-infection by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes a, b, c, d or e. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 277–9.
- Schacher B, Baron F, Rossberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 566–73.
- Skalerič U, Kovač - Kavčič M. Some risk factors for the progression of periodontal disease. *J Int Acad Periodontol* 2000; 2: 19–23.
- Skalerič E, Petelin M, Kovač - Kavčič M, Skalerič U. Potrebe po parodontalnem zdravljenju pri prebivalcih Ljubljane 20 let po prvem pregledu. *Zobozdrav Vestn* 2008; 63: 63–6.
- Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000 1999; 20: 82–121.
- Tsuzukibashi O, Saito M, Kobayashi T, Umezawa K, Nagahama F, Hiroi T, et al. A gene cluster for the synthesis of serotype g-specific polysaccharide antigen in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Arch Microbiol* 2014; 196: 261–5.
- Wahasugui TC, Nakano V, Piazza RM, Avila-Campos MJ. Phenotypic and genotypic features of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolated from patients with periodontal disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75: 366–72.
- Wang X, Li L, Yang M, Geng Y, Chen H, Xu Y, Sun Y. Prevalence and distribution of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its *cdtB* gene in subgingival plaque of Chinese periodontitis patients. *BMC Oral Health* 2014; 14: 37.
- Wessel AK, Hmelo L, Parsek MR, Whiteley M. Going local: technologies for exploring bacterial microenvironments. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11: 337–48.
- Whitmore SE, Lamont RJ. The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Mol Microbiol* 2011; 81: 305–14.
- Yoshida Y, Suzuki N, Nakano Y, Shibuya K, Ogawa Y, Koga T. Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 135–9.
- Davor Obradović, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani; doc. dr. Rok Gašperšič, prof. dr. Katja Seme, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani; prof. dr. Peter Maček; doc. dr. Matej Butala, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

