



Účast mikroflóry dutiny ústní v etiologii parodontitidy

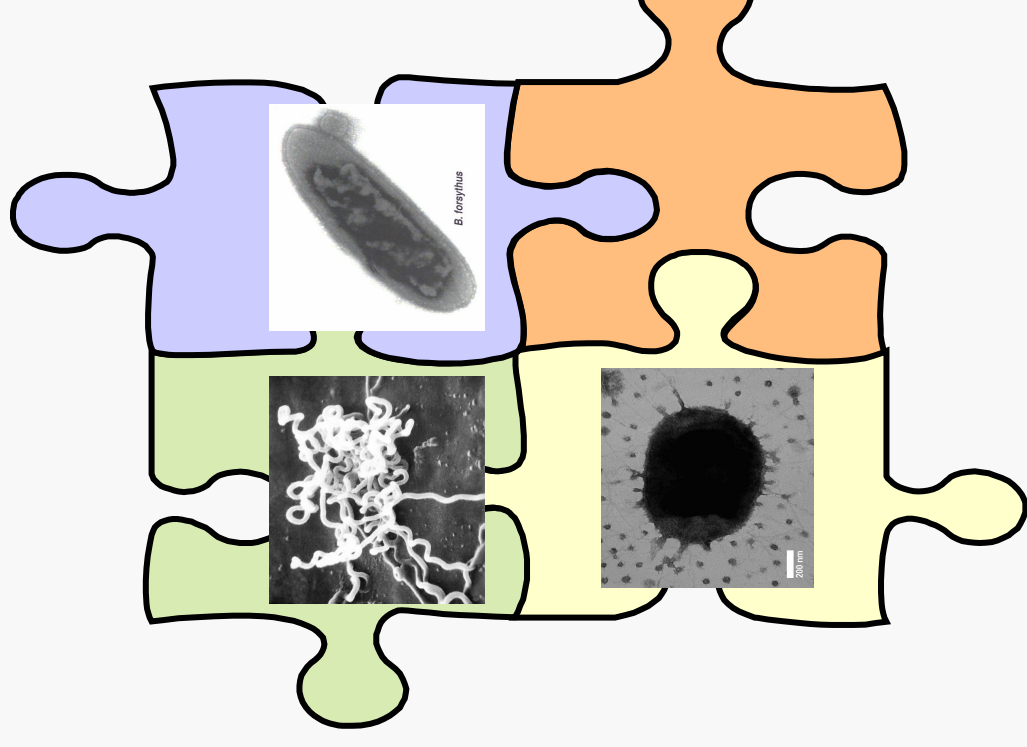
Vladana Woznicová

Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Habilitační přednáška 14.2.2008

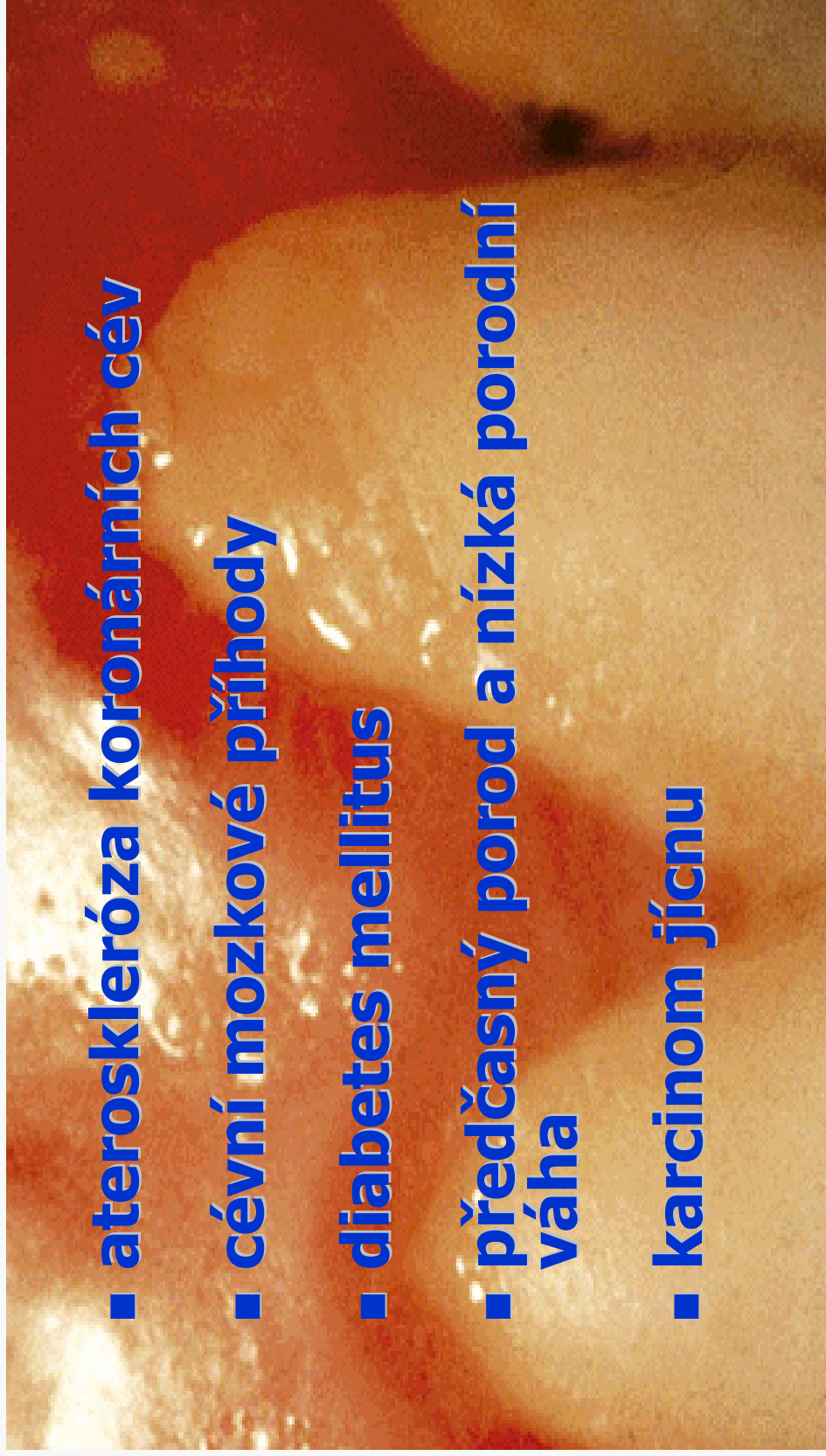
Úvod

- **Mikroflóra dutiny ústní**
- **Zubní plak**
- **Vznik parodontitidy**
- **Klíčové mikroorganismy**

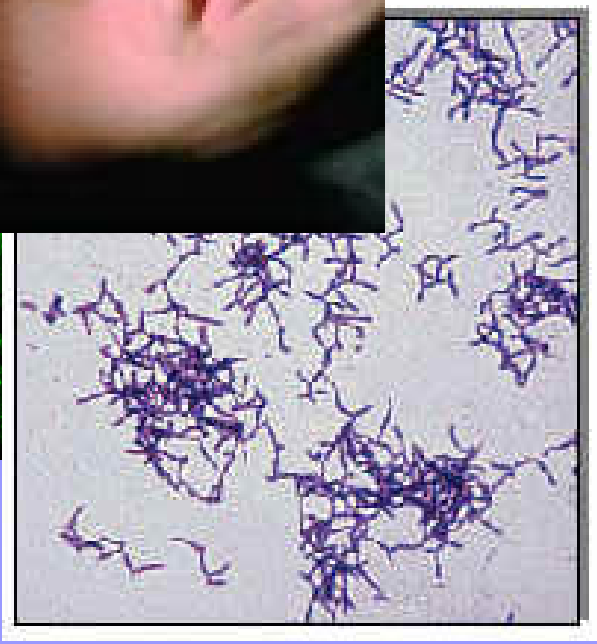
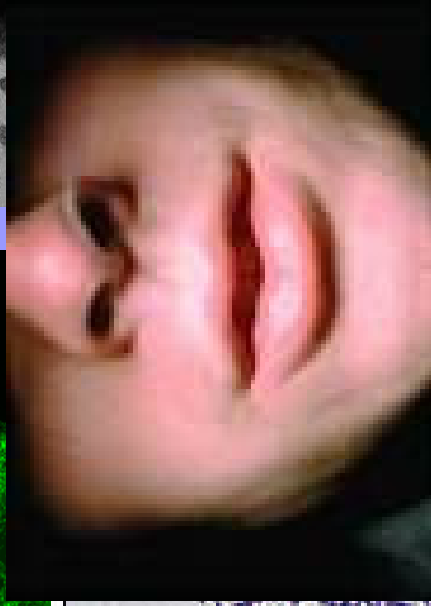
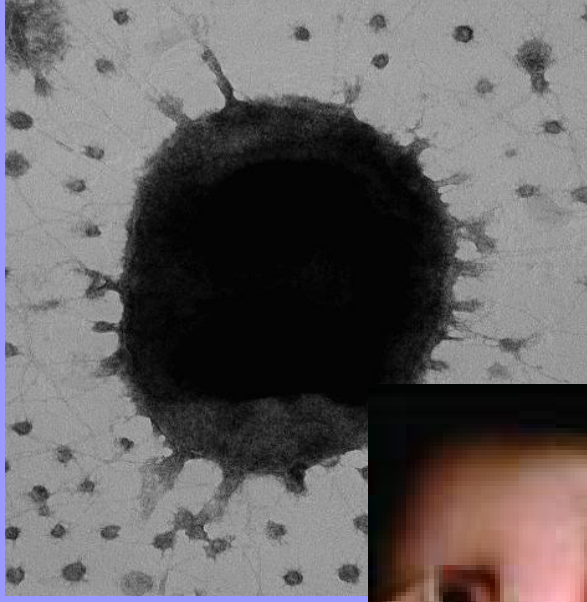
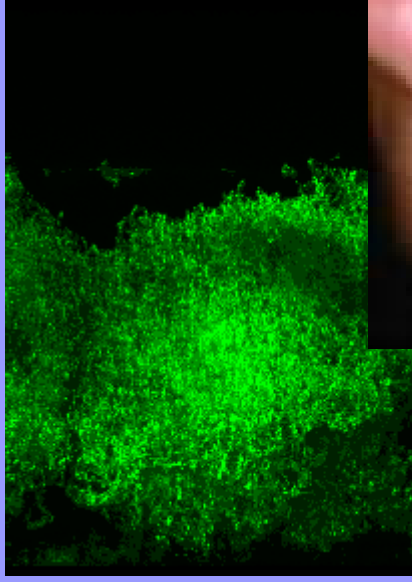


Parodontitida... velké téma... aneb z malých příčin velké následky...?

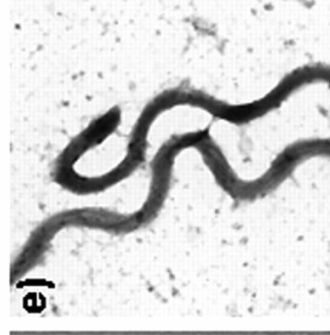
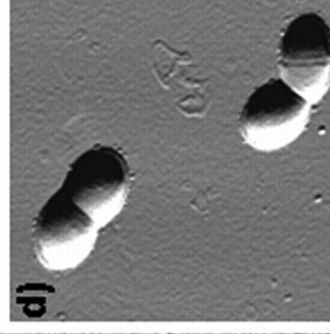
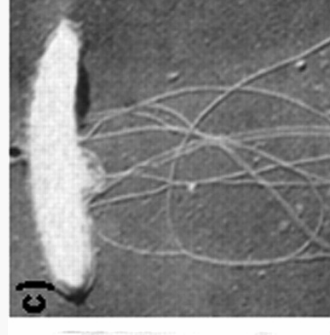
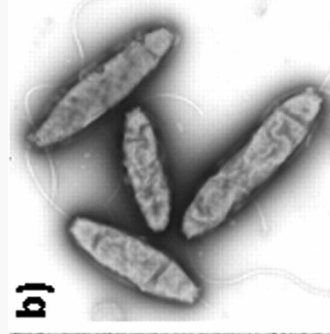
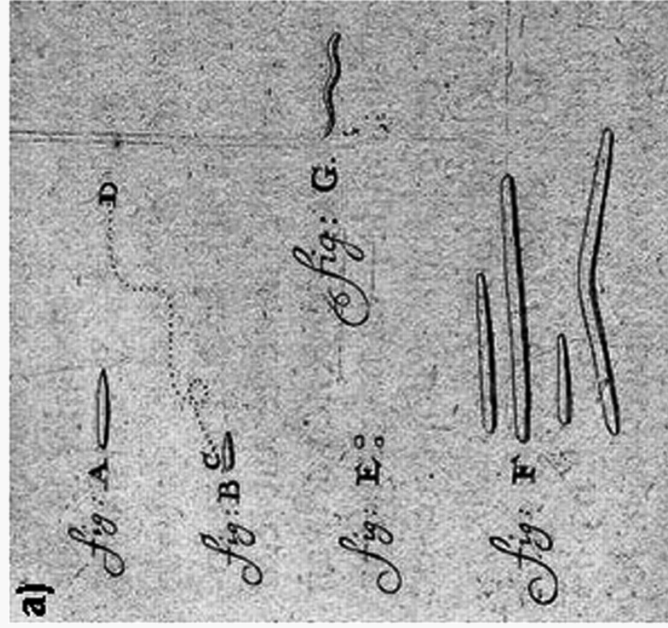
- **ateroskleróza koronárních cév**
- **cévní mozkové příhody**
- **diabetes mellitus**
- **předčasný porod a nízká porodní váha**
- **karcinom jícnu**



I. část: Mikroflóra dutiny ústní



Vše začalo Leeuwenhoekeem...



(a) Původní kresba A.L., (b) *Campylobacter rectus*, (c) *Selenomonas sputigena*, (d) ústní koky (e) *Treponema denticola*, (f) *Leptotrichia buccalis*

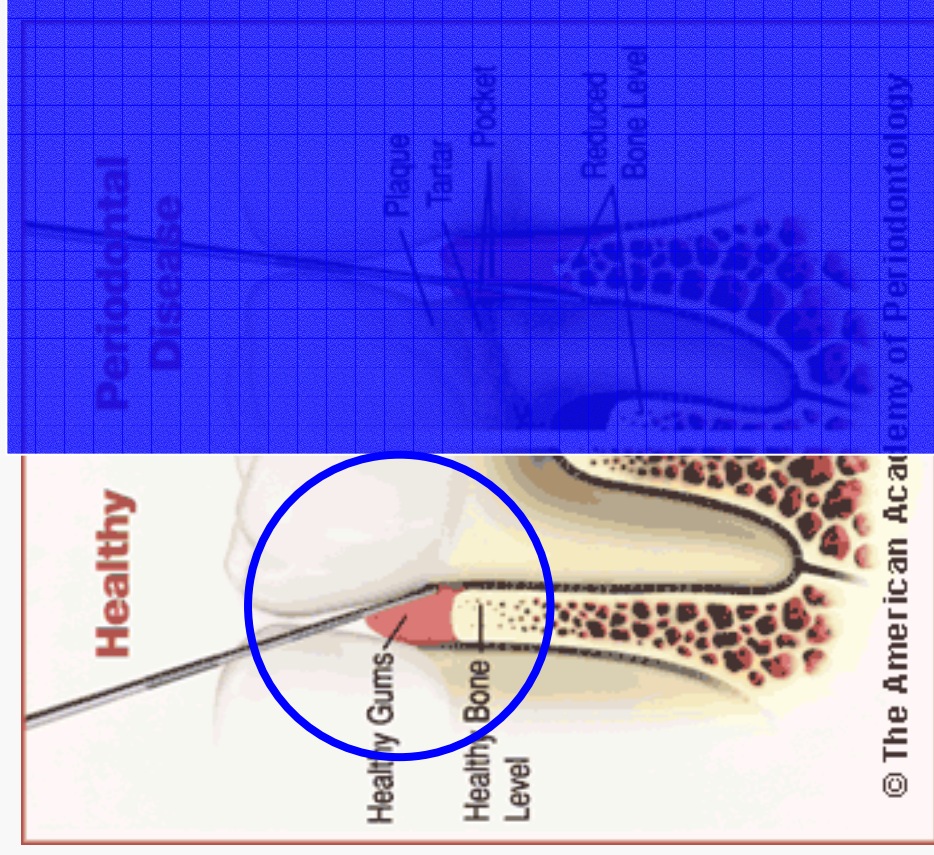


Mikroflóra dutiny ústní

- Jedno z nejrozsáhlejších mikrobiálních společenství, přes **700 rodů**, některé dosud nepopsané
- Stálá – komenzálové, nebo přechodná
- Ekologický systém
- Tvorba **biofilmu**
- Významný vliv na zdraví lokálně i celkově
- Vztah k etiologii **zubního kazu a parodontitidy**

Sulcus gingivalis

Kolonizující bakterie - klíčová role při vzniku a vývoji onemocnění parodontu, prostředí zřetelně **anaerobní, omýván sulkární tekutinou**



Sulcus gingivalis - mikroflóra

ANAEROBY

Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans

Actinomyces – *A. gerencseriae*, *A. georgiae*

Fusobacterium – *F. nucleatum*, *F. alocis*, *F. sulci*

Prevotella nigrescens

Porphyromonas gingivalis, *P. endodontalis*

Treponema denticola, *T. vincentii*, *pectinovarum*, *socranskii*

Tannerella forsythia

Wolinella succinogenes

Selenomonas sputigena

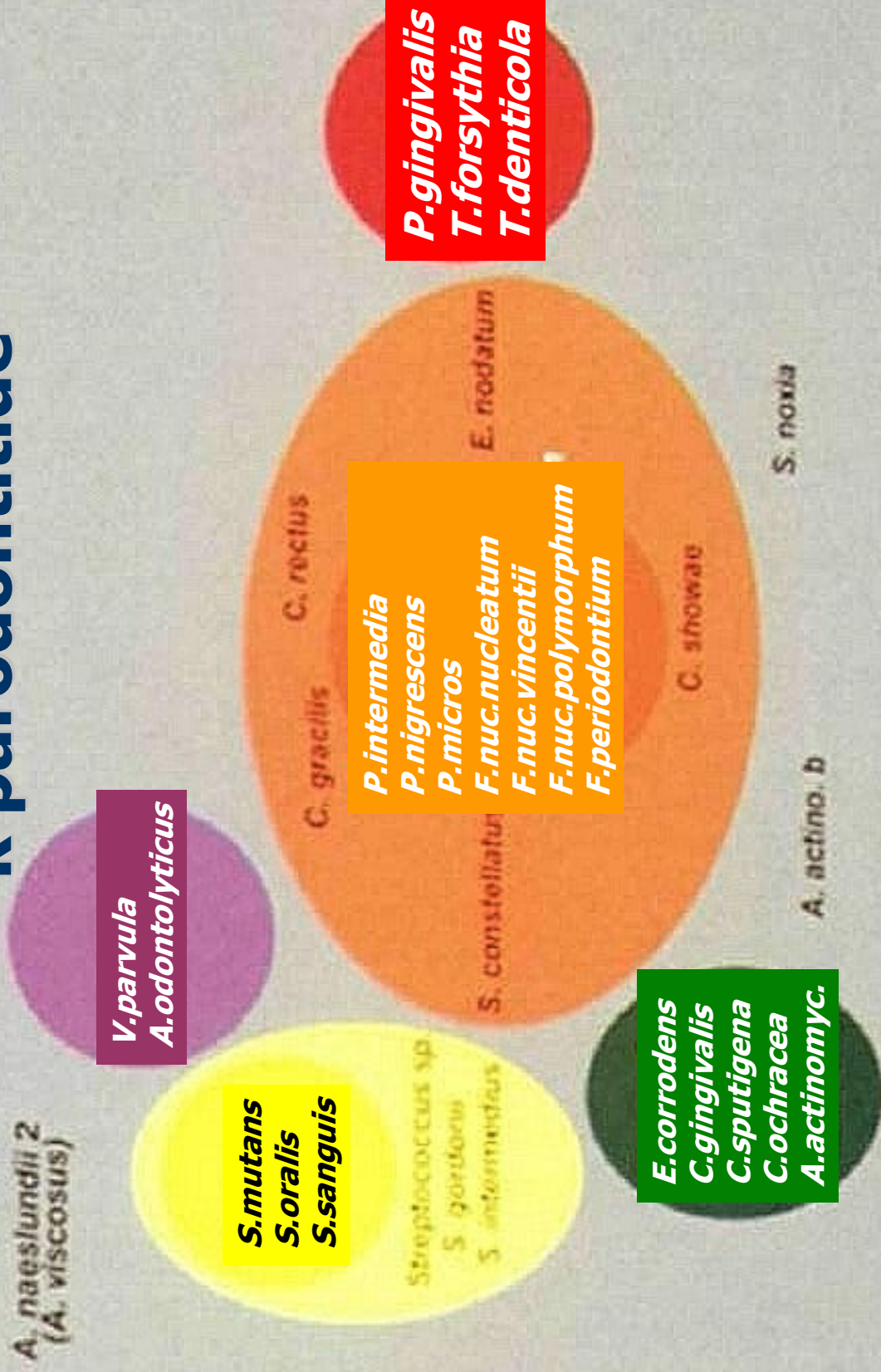
AEROBY

Streptococcus anginosus, *Streptococcus constellatus* subsp.

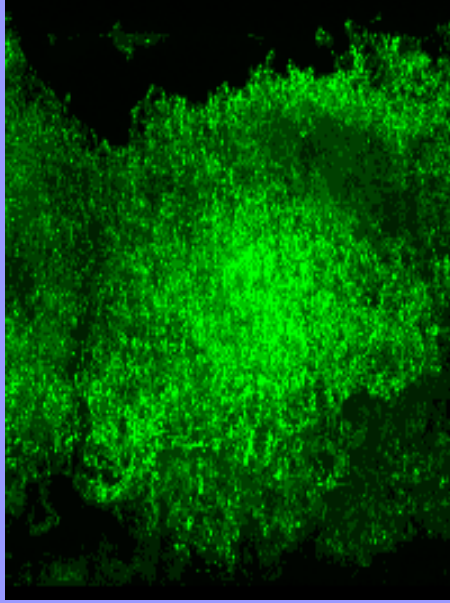
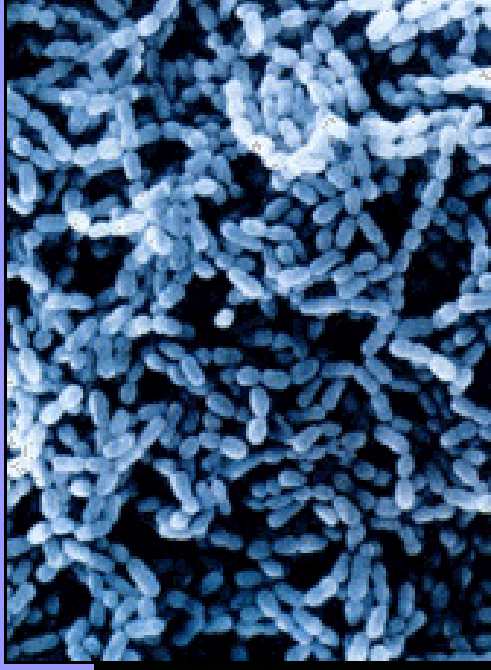
constellatus, *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis*,

Streptococcus intermedius

Vztah bakteriálních společenství k parodontitidě

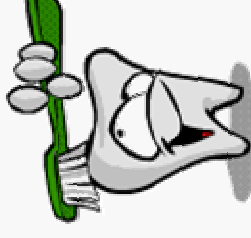


II. část: Zubní plak



Zubní plak - biofilm

- **Přilnavá mikrobiální vrstva na povrchu zubu = živé i mrtvé bakterie + jejich produkty + složky hostitelské (ze slin)**
- Nedá se opláchnout, odstranit lze pouze mechanicky
- Složení plaku závisí na jeho stáří a lokalizaci

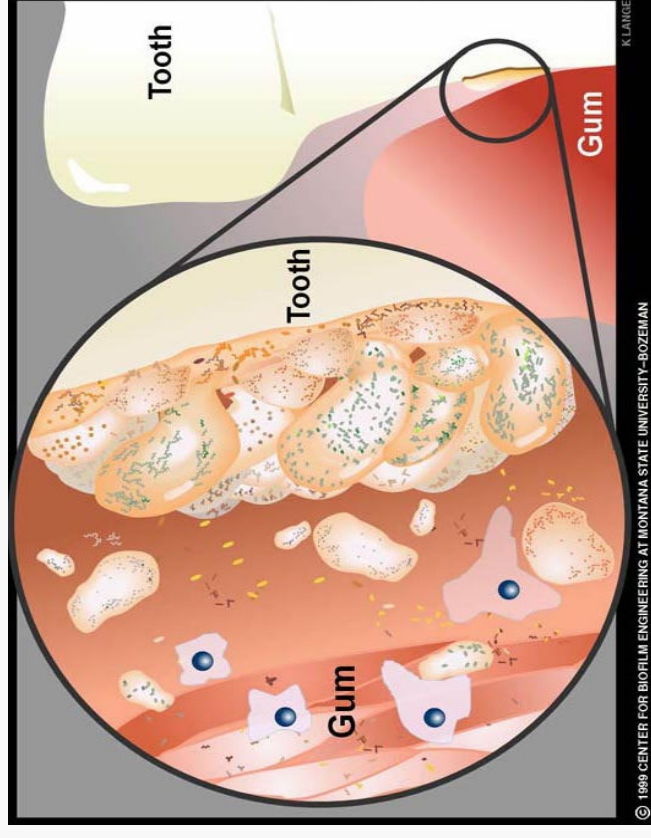


Lokalizace:

- **Supragingivální plak**
- **Subgingivální plak**

Subgingivální plak

- **Dva druhy plaku** - adherentní a neadherentní
- **Adherentní plak** - nasedá na kořen zubu, obdoba plaku supragingiválního = G+ tyčinky a vlákna (aktinomycety) a G+ koky
- **Neadherentní plak** - mezi adherentním plakem a povrchem měkké tkáně dásně = G- pohyblivé aneroby



Distribuce mikroorganismů

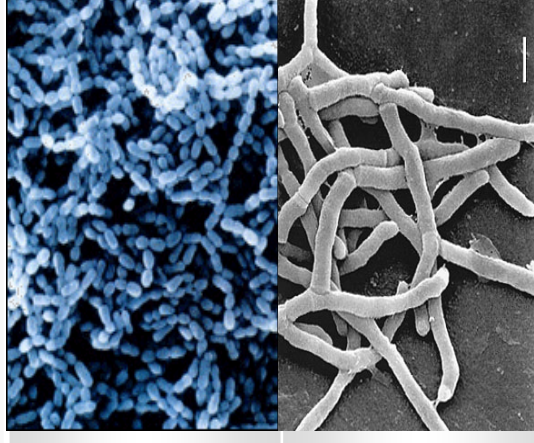
- V supra- i subgingiválním plaku nejčastěji zastoupeným rodem **Actinomyces sp.**
- **Supragingivální plak** - významně vyšší množství některých aktinomycet, neisserií, streptokoků, celkově bakterií "**green**" a "**purple**" komplex
- **Subgingivální plak** - významně vyšší množství prevotel, *Tannerella forsythia* a *P. gingivalis*, celkově "**red**" a "**orange**" komplex
- Periodontální patogeny někdy jen v supragingiválním plaku
- Supragingivální plak - rezervoár infekce nebo reinfekce subgingiválního prostoru

(Ximénez-Fivye et al., 2000)

Vývoj zubního plaku

Do 24
hodin

v plaku převládají streptokoky
skupiny *mutans*, *sanguinis* a *mitis*

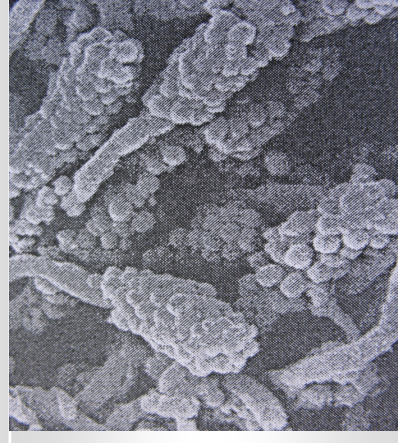


Dny

přibývá G+ tyčinek a vláknitých mikroorganismů
- laktobacily a aktinomycety

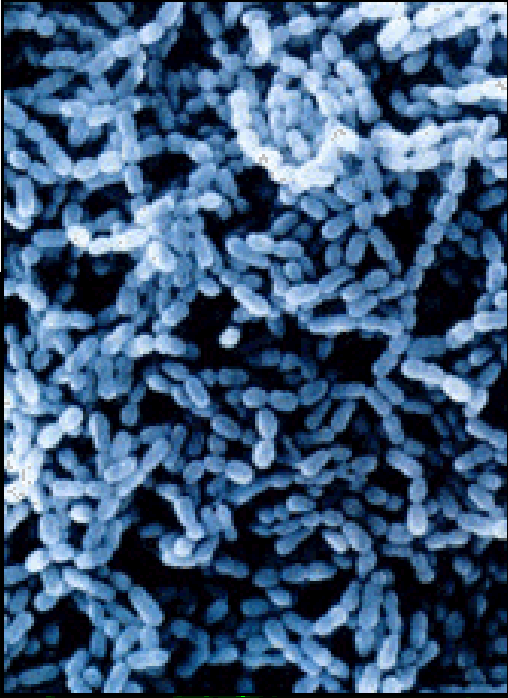
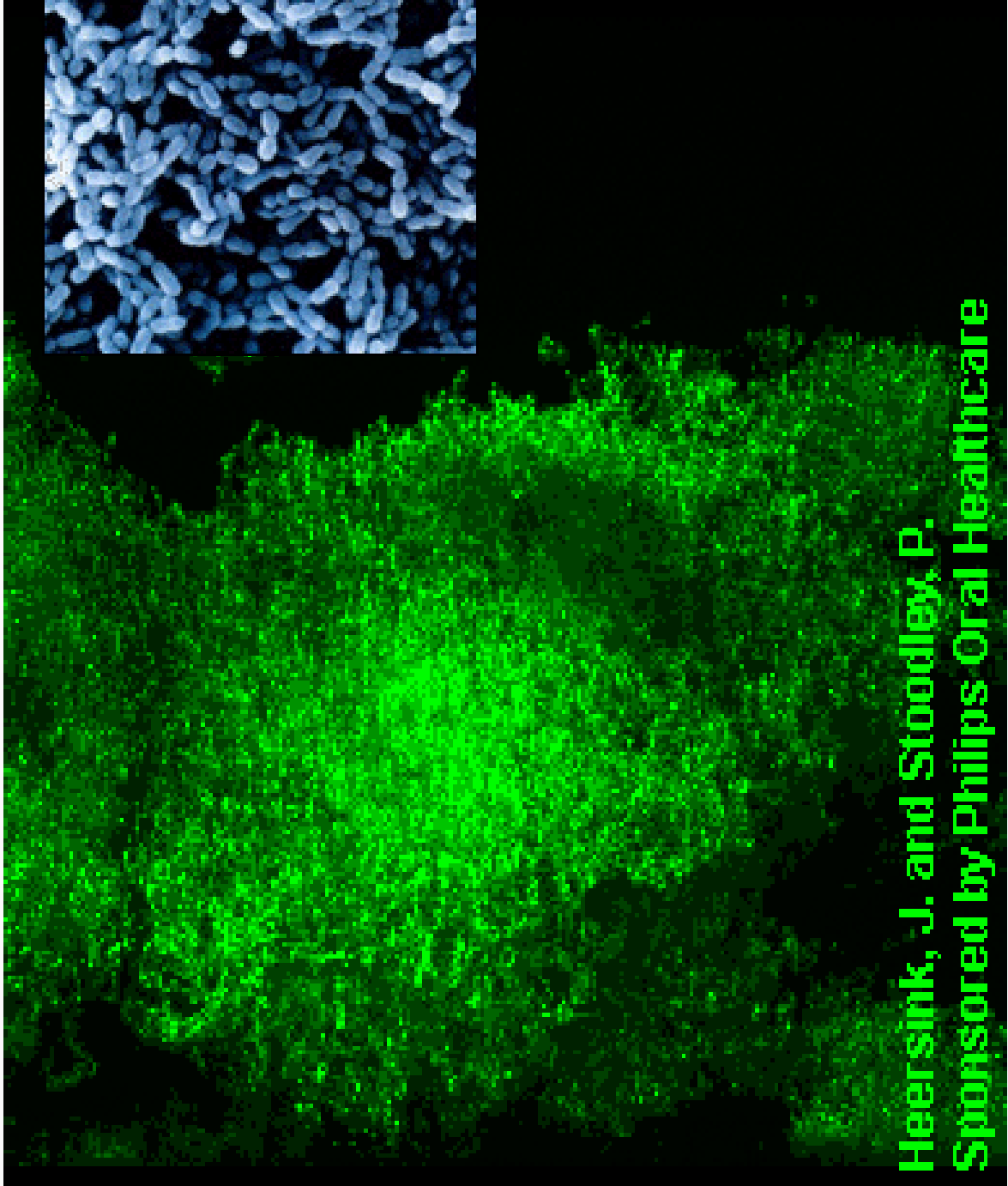
Týden

sloupcovité mikrokolonie kokoidních mikrobů, na něž při povrchu
plaku nasedají tyčinky až vlákna

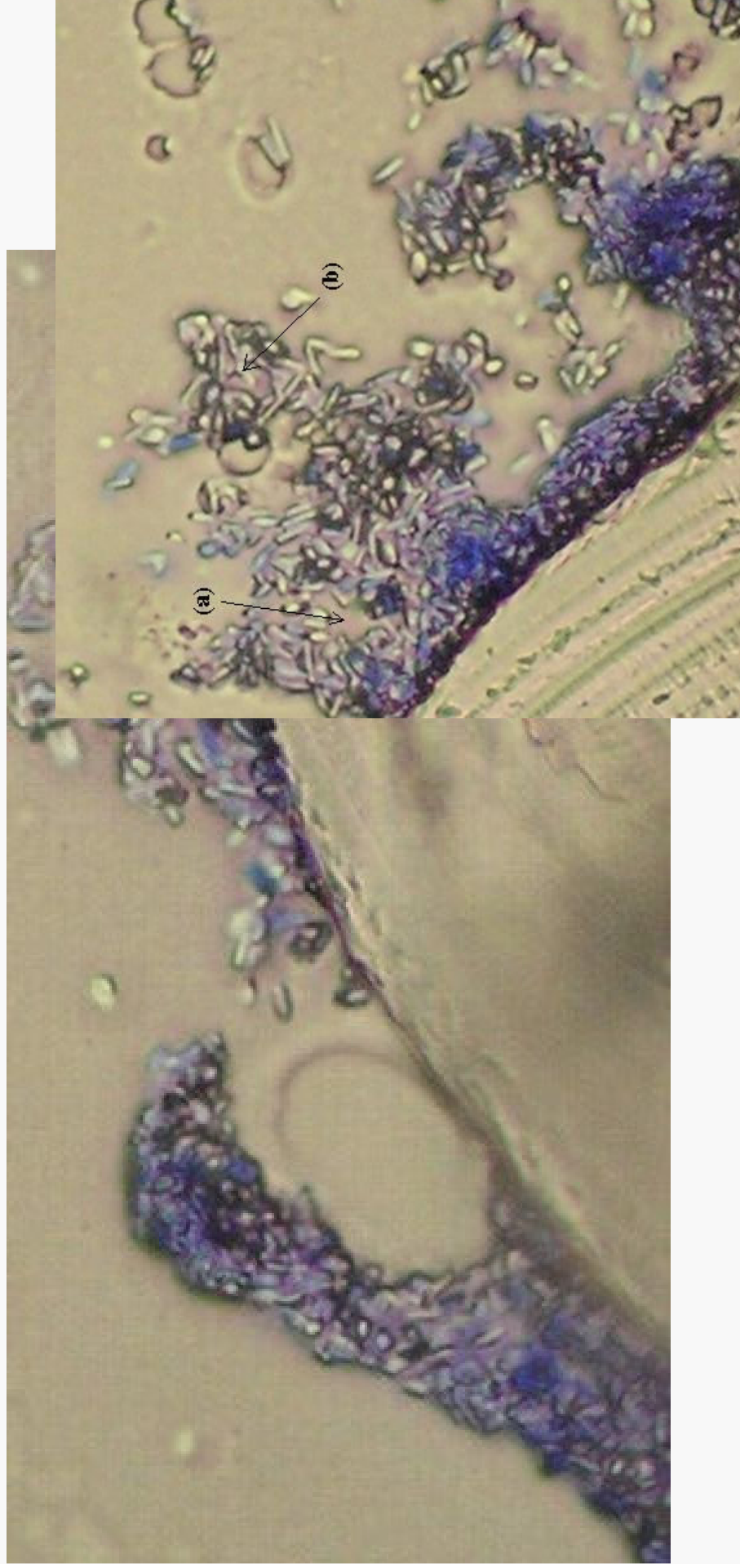


Tři
týdny

převaha vláknitých mikrobů, na povrchu
útvary vzhledu kukuřičných klasů:
centrální vlákno (*Eubacterium yurii*)
obklopeno G+ koky



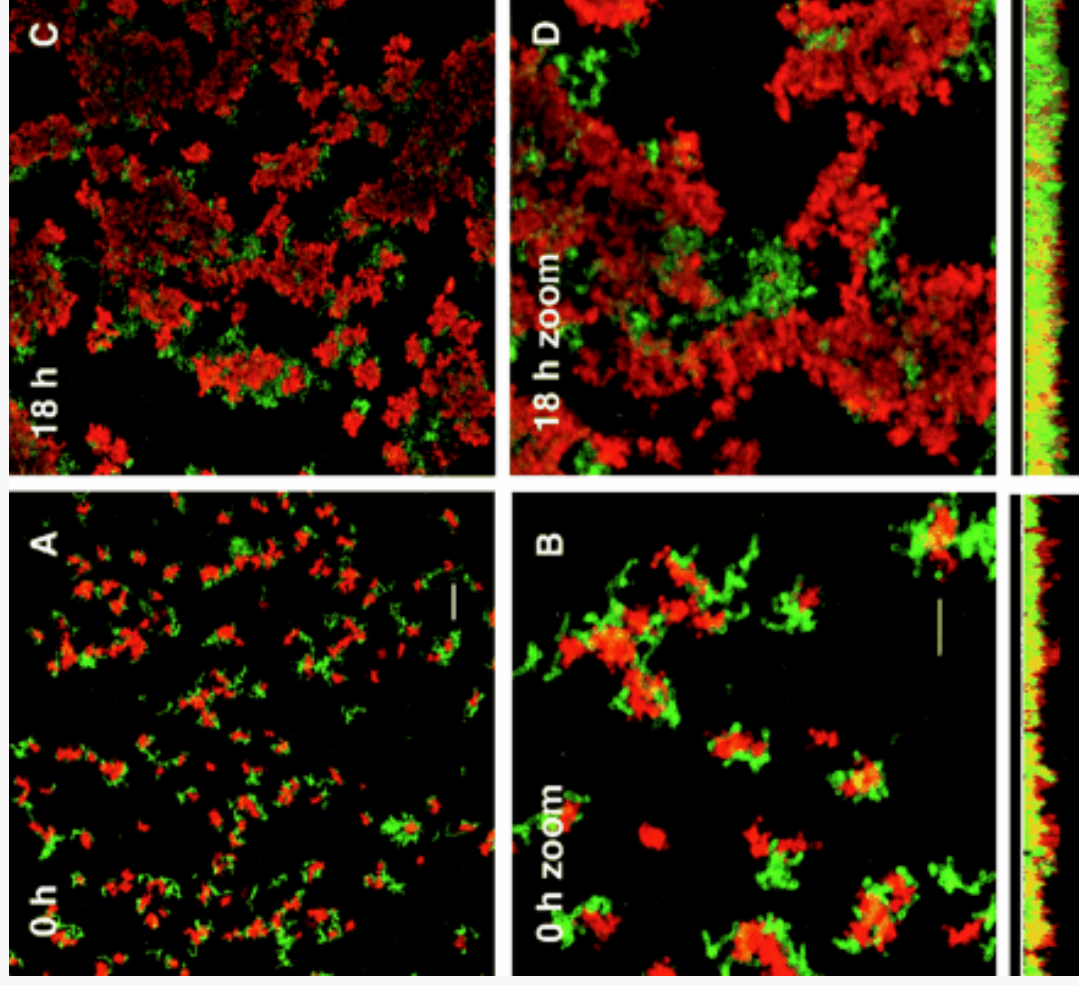
**Heersink, J. and Stoodley, P.
Sponsored by Philips Oral Healthcare**



Obarvený biofilm na katétru (stafylokoky a kandidy):

a) - kanálek, b) - houbovitá struktura

Foto: Dr. Veronika Holá, MÚ

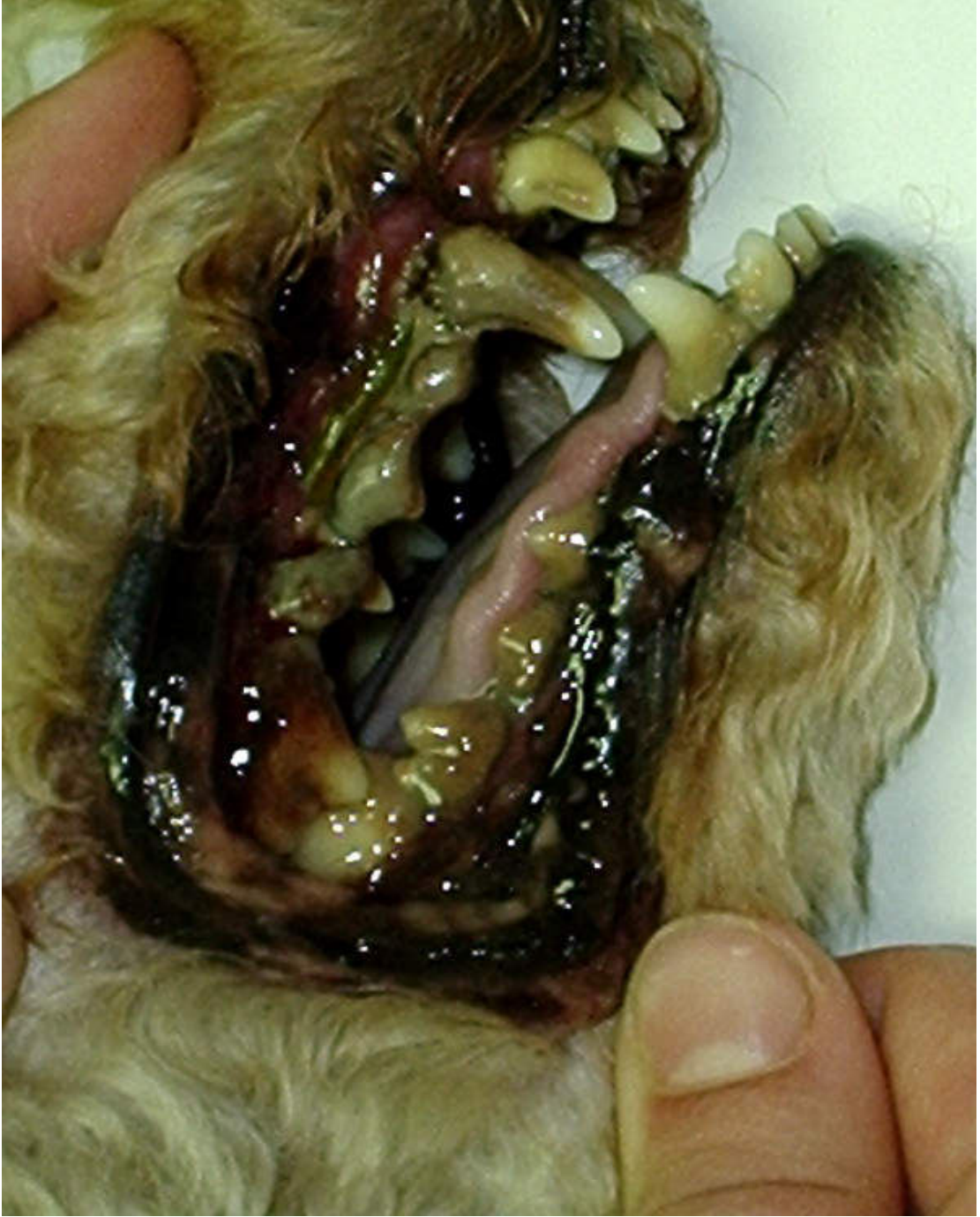


Konfokální laserová mikroskopie – dvoudruhový biofilm, Kolenbrander et al., 2002

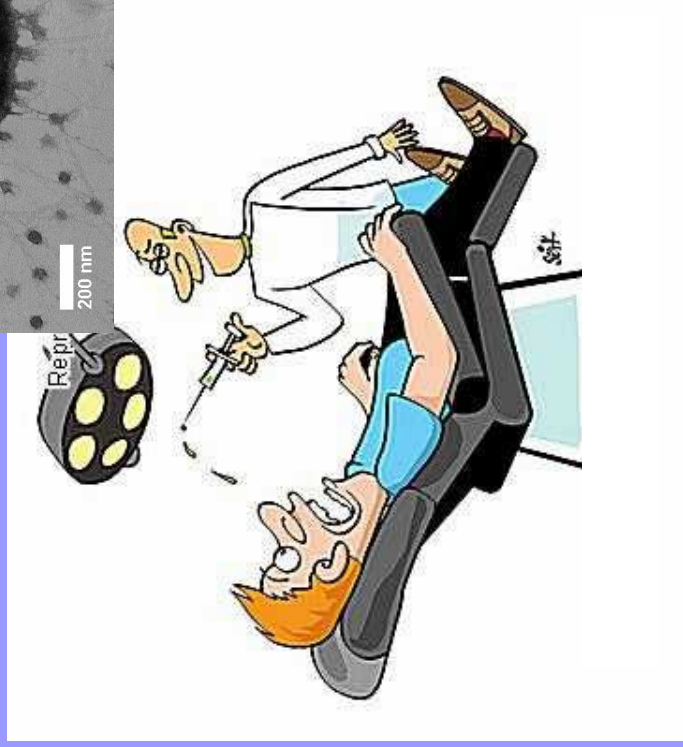
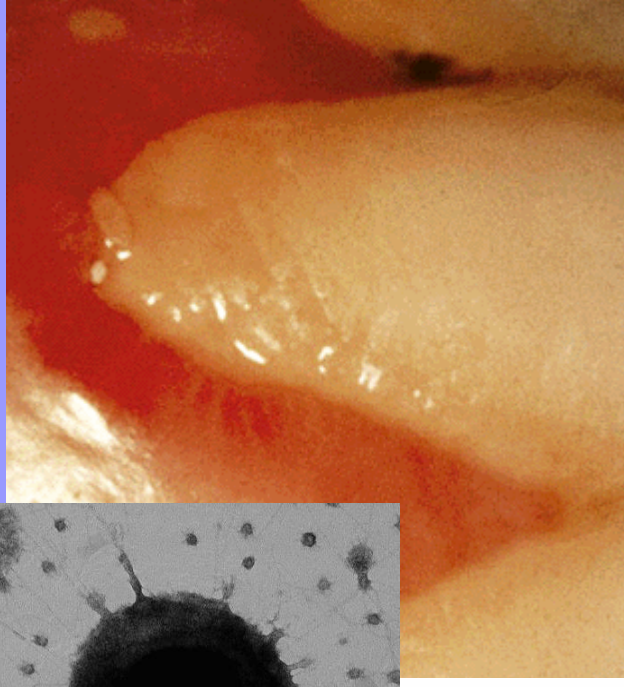
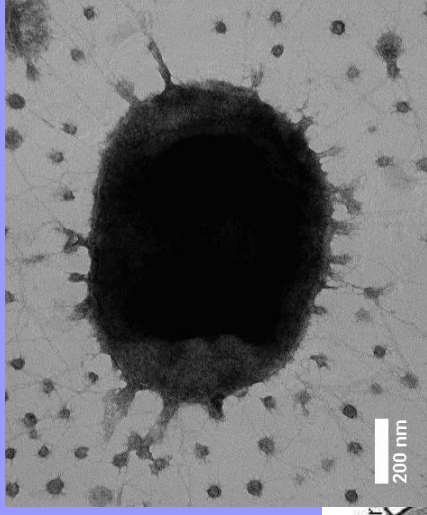
Vývoj zubního plaku

- ❖ Glykoproteiny – **pelikula** – receptory pro adhezi G+ koků a tyčinek
- ❖ Tvorba **exopolysacharidů** - hlavní složka mezibuněčné matrix
- ❖ Metabolismus bakterií v plaku - zapojení dalších druhů, zrání urychluje **sacharóza**
- ❖ Ve spodních vrstvách se tvoří **zubní kámen** - 80 % minerálů
- ❖ **Snížování pH** vlivem bakteriálního metabolismu < 5,5 - demineralizace skloviny
- ❖ **Subgingivální kámen** (tzv. konkrement) - G - mikroorganismy
- ❖ Porozita zubního kamene - vláknité bakterie palisádovitě k povrchu zubu - ukládání mikrobiálních složek působících **toxicky na tkáňě parodontu**





III. část: Vznik parodontitidy

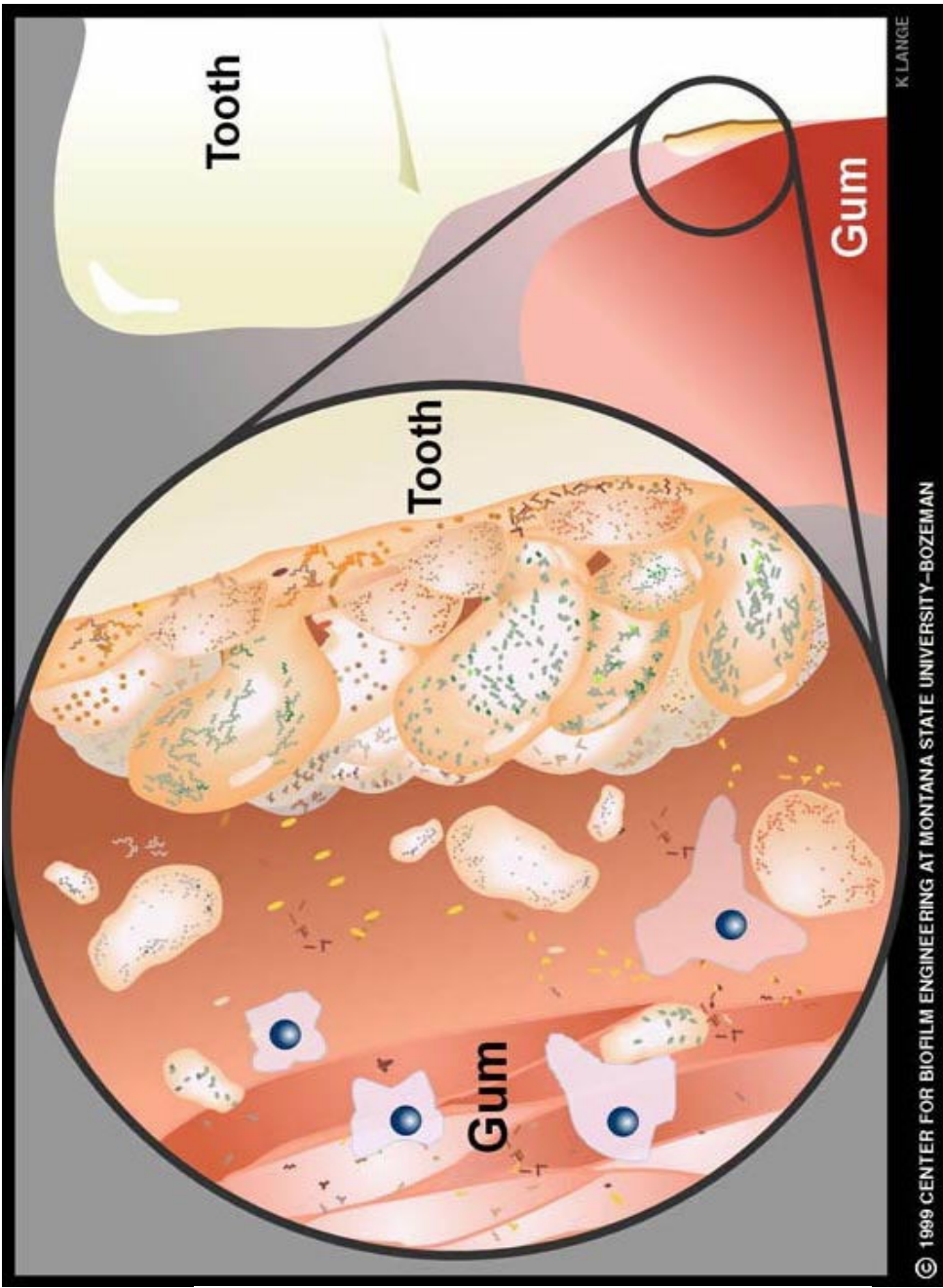


Reakce dásně

- ❖ Zubní plak na okraji dásní - tkáň dásně v okolí sulku se chronicky zanítí = **marginální gingivitis**
- ❖ Exsudace – chemotaxe anaerobních proteolytických bakterií
- ❖ Zvýšená migrace polymorfonukleárů
- ❖ Zánět naruší funkci spojovacího epitelu, **plak proniká apikálně do subgingivální oblasti**
- ❖ Příznaky tím výraznější, čím je plak starší a silnější

Mikrobiologie chronické marginální gingivitidy

- Klinické příznaky - občasné krváčení z dásní - zarudlé, prosáklé, bolestivost minimální
- **Časné stádium** - po týdnu trvání - **roste počet kapnofilních a striktně anaerobních mikrobů** (kapnocytofágů, aktinomycet a anaerobních G- tyčinek)
- **Konečné stádium** - více mikrobů a **převládají anaeroby** (v černých koloniích rostoucí např. *Porphyromonas gingivalis* a *Prevotella intermedia*, ústní spirochéty)
- **Krváčení** z dásní přispívá k množení černě pigmentovaných anaerobních tyčinek, slouží jako **zdroj heminu**



Zdroj: www.zahnarzt-hilpoltstein.de

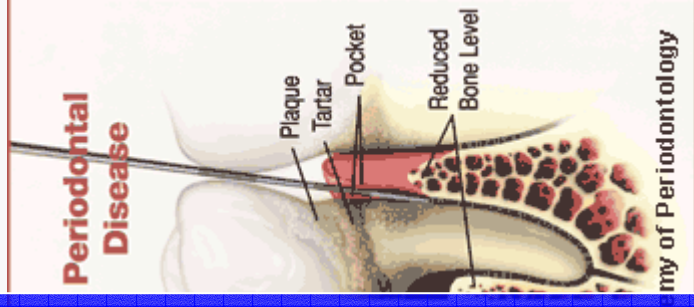
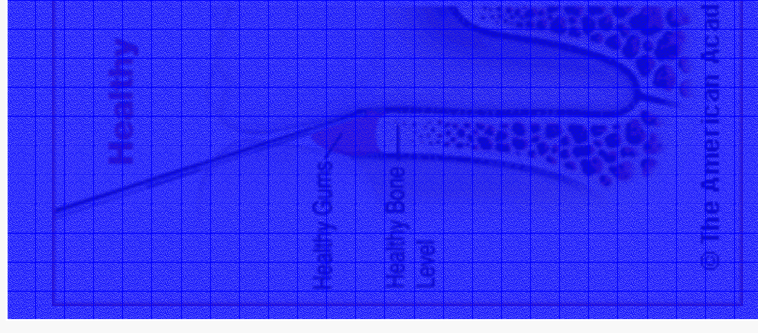
Zdroj: Center for biofilm engineering at MSU-Bozeman

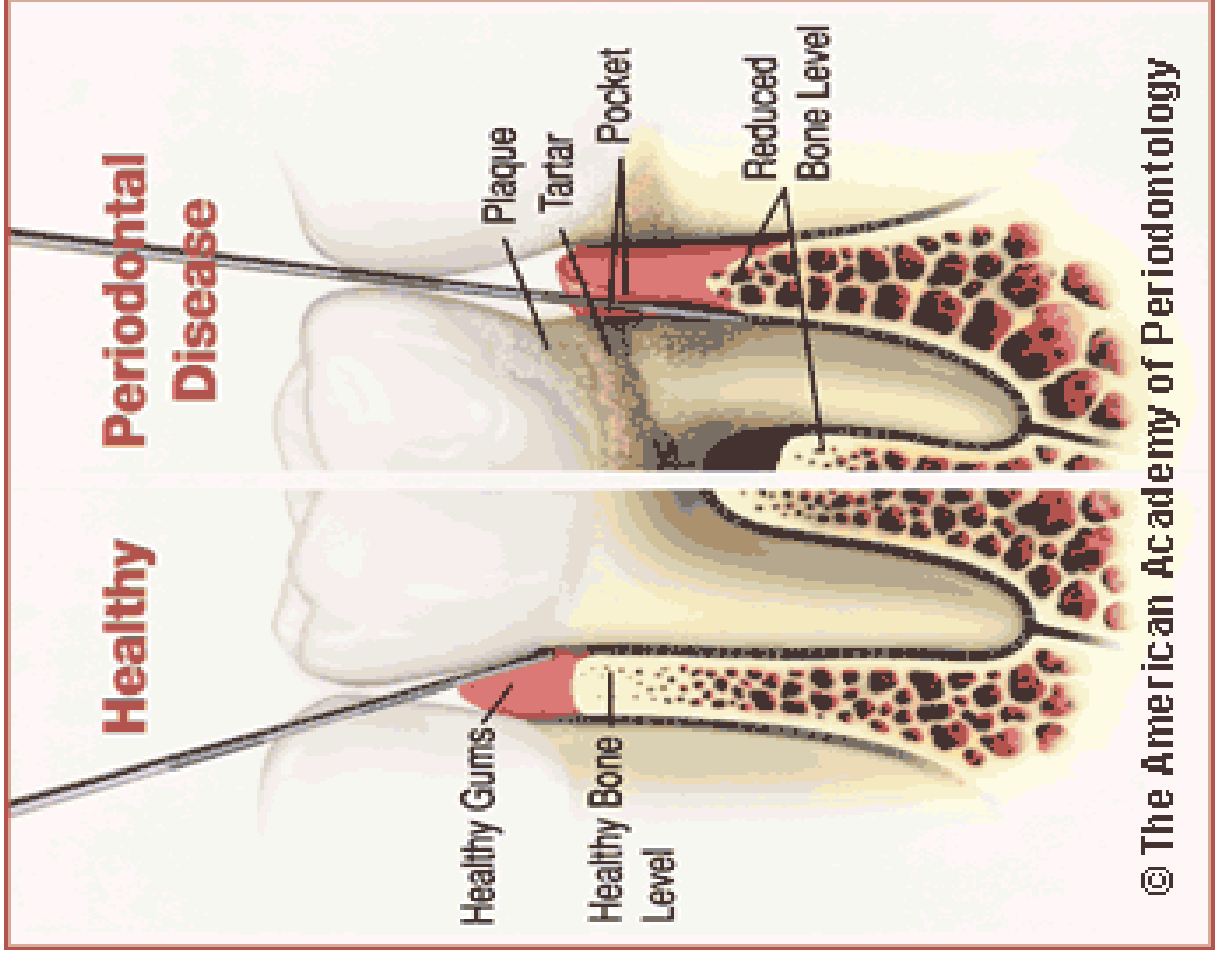
Změny v parodontálním chobotu

Redoxní potenciál	KLESÁ
Tvorba chobotové tekutiny	ROSTE = živné médium pro růst anaerobů vybavených proteolytickými enzymy, proteinové složky štěpeny proteolytickými bakteriemi
pH	ROSTE z normálních neutrálních hodnot stoupá na 7,4 – 7,8 - podpora růstu bakterií (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)
Mikroflóra	ROSTE G- anaerobní tyčinky = <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>T. denticola</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> a <i>C. sputigena</i>

Parodontitida

- Až 80 % dospělých
- Zánět dásní, **ústup dentogingiválního spojení**
- **Odbourávání alveolární kostní tkáně**
- Na místě dásňových sulků vzniká dásňový **chobot, krvácivý**, s hnisavým obsahem
- Na **obnaženém povrchu krčku** se usazuje zubní plak a kámen
- Zuby se začínají **viklat a posouvat**





© The American Academy of Periodontology

© Original Artist
Reproduction rights obtainable from
www.CartoonStock.com



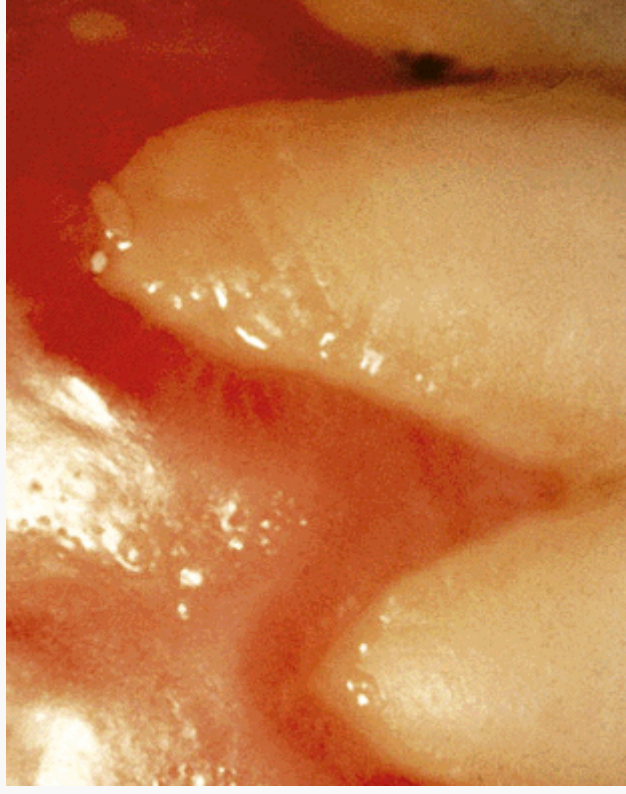
This may hurt, so I'm going to sedate your wallet.

Důkazy vlivu subgingiválního plaku - studie

- Těsná korelace mezi rozsahem plaku, prevalencí a závažností parodontálních onemocnění
- **Studie na dobrovolnících** - zanechání péče o chrup = nárůst plaku a gingivitida, po odstranění plaku zmizí
- Lokální aplikace např. chlorhexidinu potlačuje plak a brání gingivitidě
- **Bezmikrobní zvířecí modely** - bakterie „red complex“ z lidského plaku navodí onemocnění parodontu a imunoinflamatorní resorpci kosti (Kesavalu 2007)

Etiologie parodontitidy

- specifická plaková hypotéza
- nespecifická plaková hypotéza
- ekologická plaková hypotéza



Specifická plaková hypotéza

- **Etiologie parodontitidy = specifické mikroorganismy**
- Nekrotizující ulcerativní gingivitida - klíčovým etiologickým agens fusobakteria a spirochety
- Terapeutické výsledky s antimikrobiálními látkami působícími na anaeroby - např. metronidazol
- Rychle progredující juvenilní parodontitida - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - citlivý na tetracyklin - vede k rychlému zvládnutí onemocnění

Nespecifická plaková hypotéza

- Jen **velké bakteriální společenství** vyvolá **koncentraci** všech faktorů virulence nutných k destrukci tkání
- Specifická úloha druhů neexistuje, jen nahrazují jiné, náhodou ve společenství nepřítomné
- **Plak** šířící se pod úroveň gingivy **způsobí onemocnění vždy**, bez ohledu na složení
- Podporují nálezy různých bakteriálních druhů v parodontálních chobotech

Ekologická plaková hypotéza

- **Endogenní infekce vyvolaná oportunními druhy** = parodontitida způsobena poruchou složení mikroflóry dásňového sulku vyvolanou změnou ekologie
- Na počátku **tvorba plaku a šíření do sulcus gingivalis** = organismus reaguje zánětem
- Zvýšená **produkce tkáňové tekutiny** přináší do sulku zvýšené množství bílkovin - snadno katabolizovány proteolytickými G- anaeroby
- **Změna v zastoupení bakteriálních druhů:**
 - roste počet G- anaerobů na úkor fakultativně anaerobních G+ druhů
 - produkují faktory virulence v dostatečném množství - překonají obranu hostitele - destrukce

Terapeutické strategie

- **Specifická plaková hypotéza** - léčba by měla být zaměřena na odstranění specifického patogena např. **podáváním antibiotik**
- **Nespecifická i ekologická hypotéza** - parodontální onemocnění lze úspěšně léčit zásahy namířenými na **redukci rozsahu plaku**

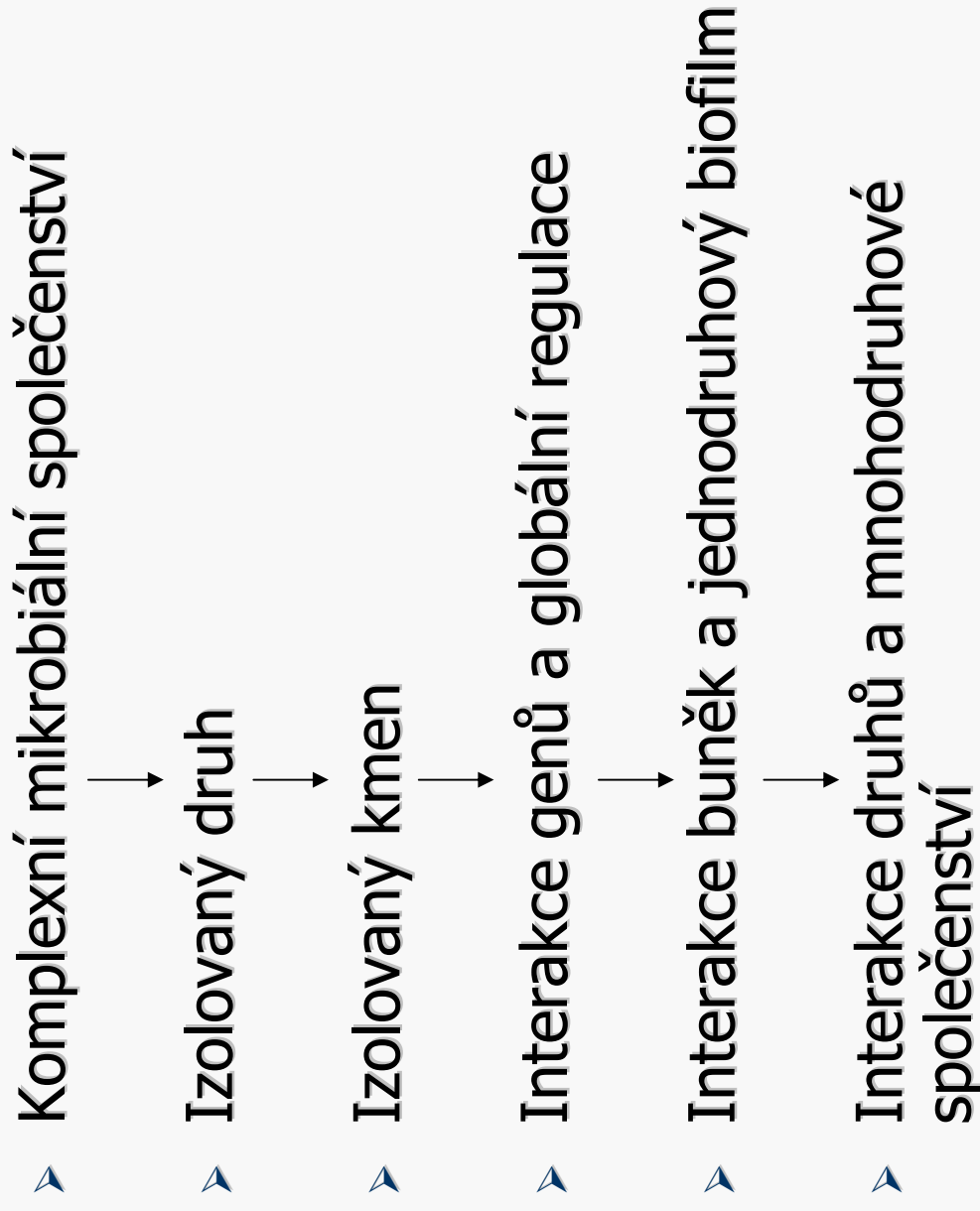


Prevence

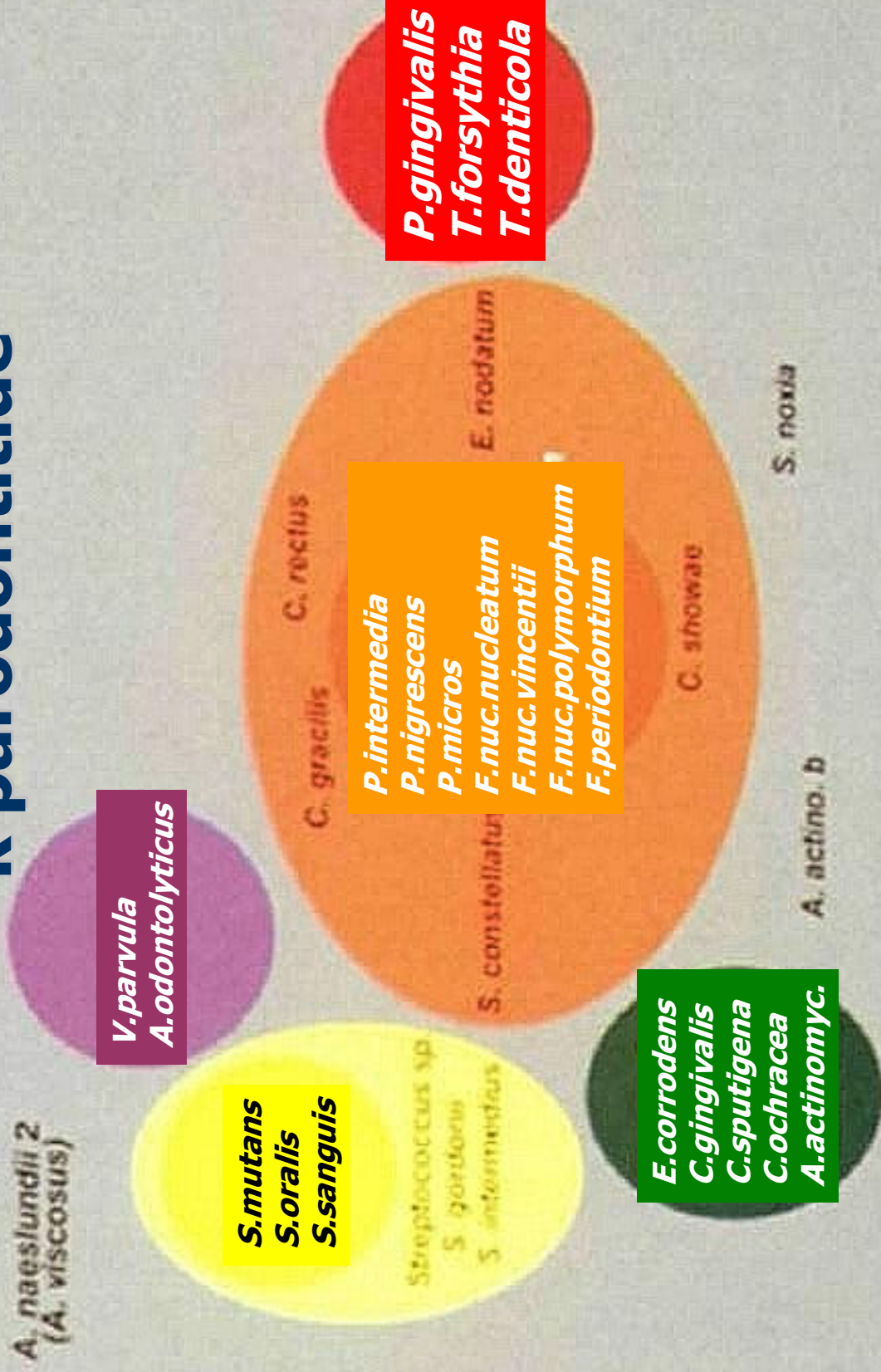


- **Soustavné odstraňování zubního plaku** pravidelným a správným čištěním zubů
- **Dokonalé odstranění zubního kamene**
- **Úprava exogenních faktorů** (.. vadné protetické náhrady, převislé výplně atd.)

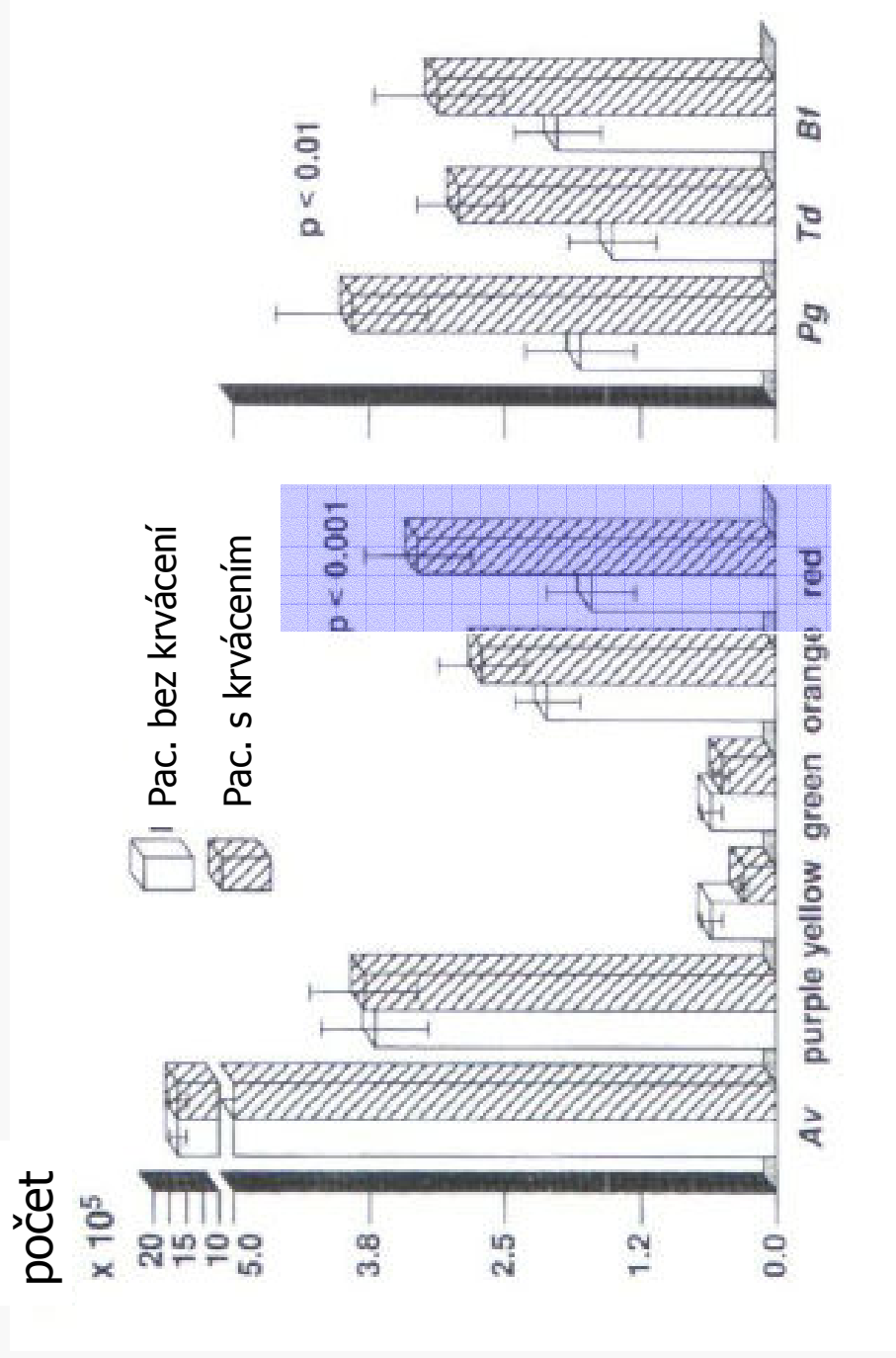
Úhel pohledu na ústní biofilm



Vztah bakteriálních společenství k parodontitidě

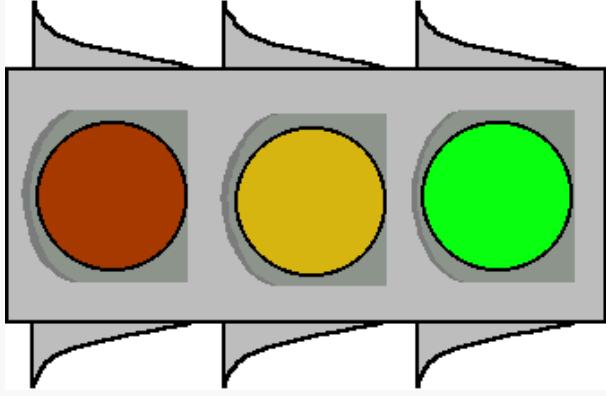


Krvácivost jako odraz mikroflóry



Zdroj: Socransky et al. 1998

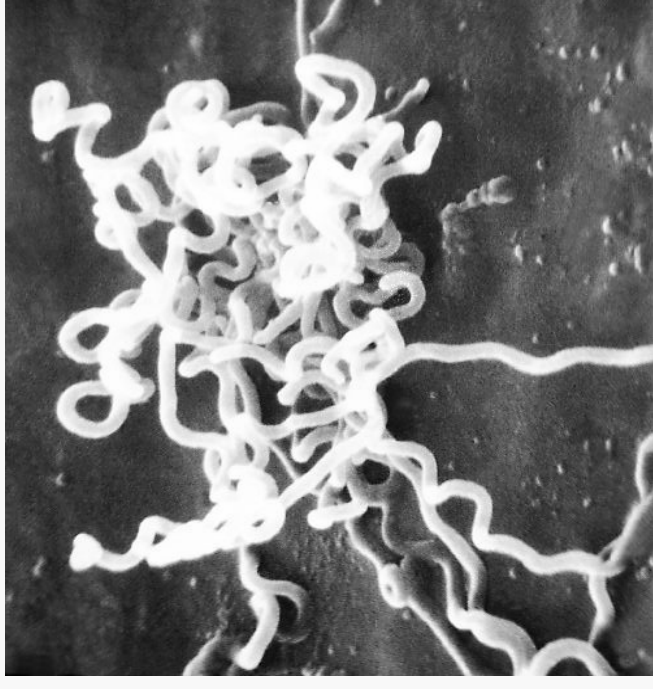
Co předurčuje bakterie „red complex“ k podílu na parodontitidách?



- **Faktory virulence**
- **Agregace bakterií**
- **Interakce bakterií**

***Treponema denticola* - vlastnosti**

- Spirochéta (příbuzná *T.pallidum*)
- Silně proteolytická
- Kolonizuje až starší děti (6 – 12 let 50 %, ale jen 0,5 % mikrob. populace) a dospělé
- Schopnost koagregace jen s některými bakteriemi – fusobacteria, porfyromonády
- Úzký vztah k *P. gingivalis* – růstové faktory



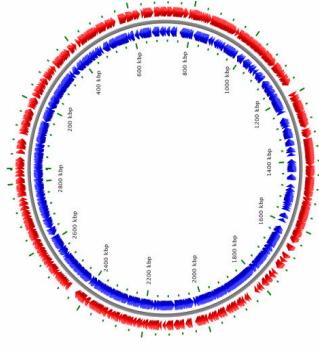
Zdroj: fr. wikipedia.org/wiki/Treponema

T. denticola – faktory virulence

Kompletní genetická sekvence (Fraser et al., 1998)

- **Motilita** – v experimentu průchod břišní stěnou myši
- **Chemotaxe** - sulkární tekutina
- **Adheziny** – specifická nika - blízkost junkčního epitelu
- **Invaziny** - leucine-rich repeat protein (LrrA)
- **Ekvivalent „LPS“** – únik před imunitou, odbourávání kosti (bičičky)
- **Proteázy** – degradace bariér, buněk a protektivních makromolekul
- **Hemolyziny** – získ železa pro metabolismus
- **Spouštěče zánětu** – navozuje sekreci prozánět. cytokinů a chemokinů

Treponema denticola ATCC 35405, complete genome



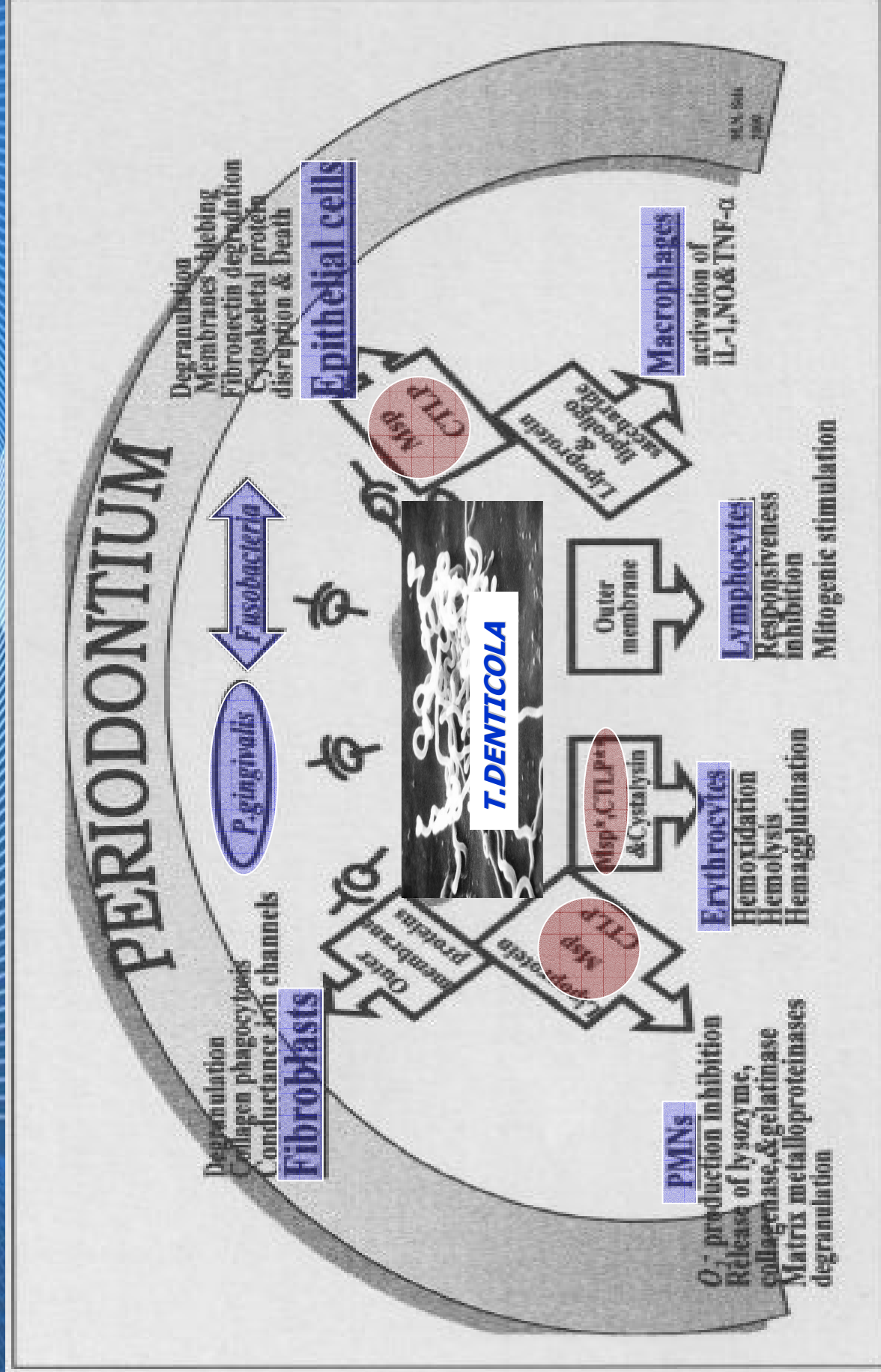
Accession: NC_002367

Length: 2,845,201 bp, Gense: 2,767



**Šipky:
Extracelulární měchýřky
naplněné enzymy**

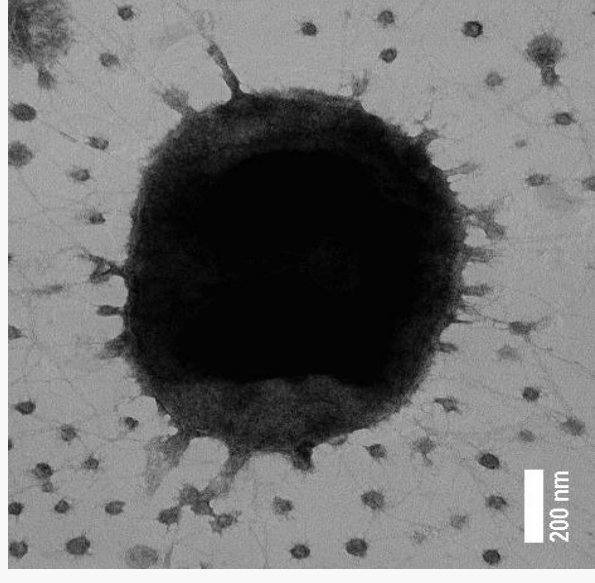
Zdroj: Sela 2001, Crit Rev Oral Biol Med



Msp – major surface protein, **CTLP** – chymotrypsin-like protease

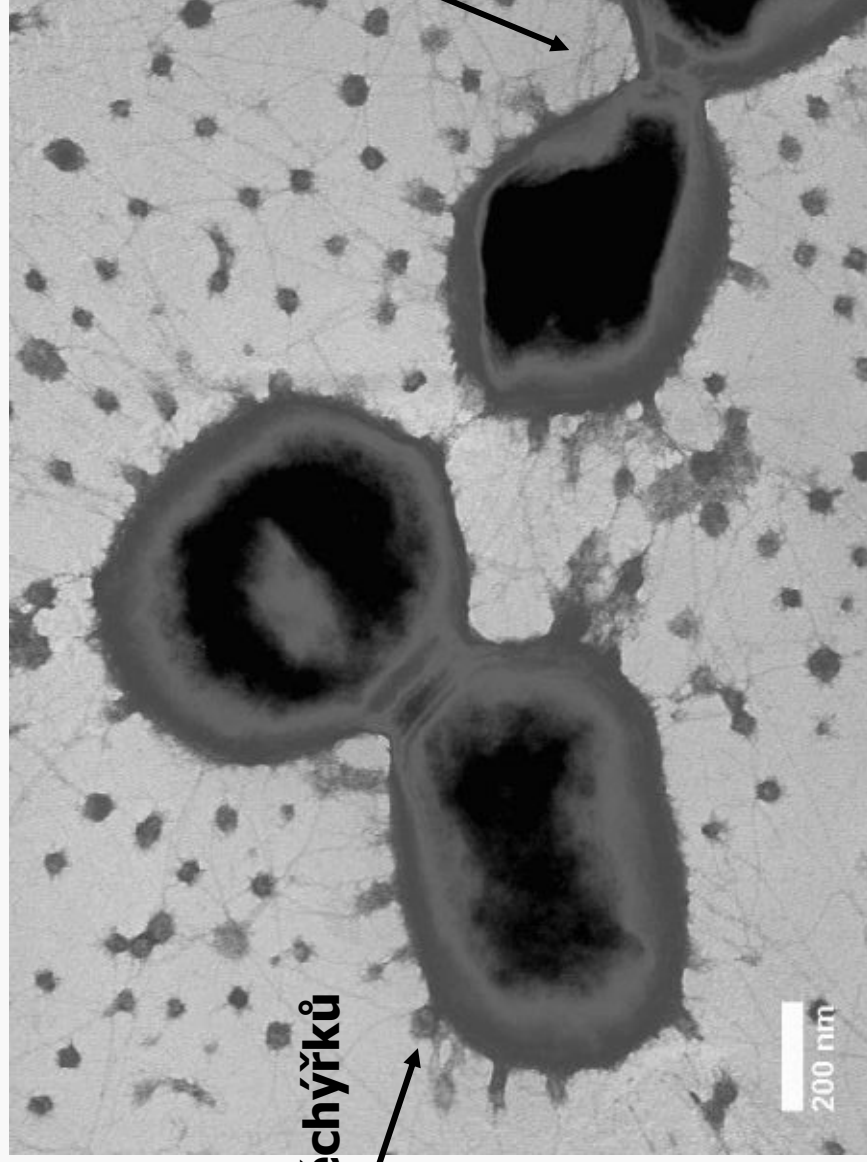
Porphyromonas gingivalis

- **Vysoce proteolytická**
- **Fimbrie** – slouží adhezi a kolonizaci
- Uvolňuje **měchýřky** obsahující kompletní složky zevní membrány - proteiny, LPS, kys. muramovou, pouzdro a fimbrie
- Měchýřky - transport toxinů a enzymů, adherence a agregace bakterií, shlukování destiček
- Černá pigmentace díky akumulovanému heminu – zdroj železa (růstový faktor)



Zdroj: www.pgingivalis.org

P.gingivalis



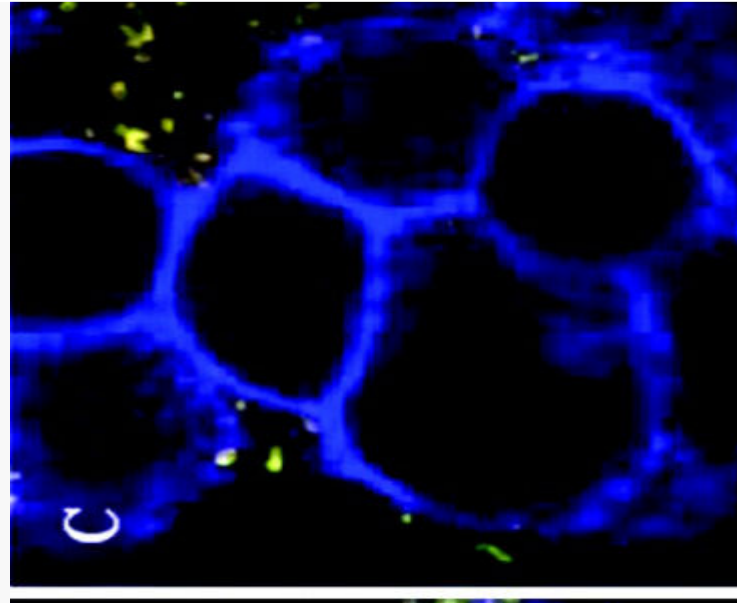
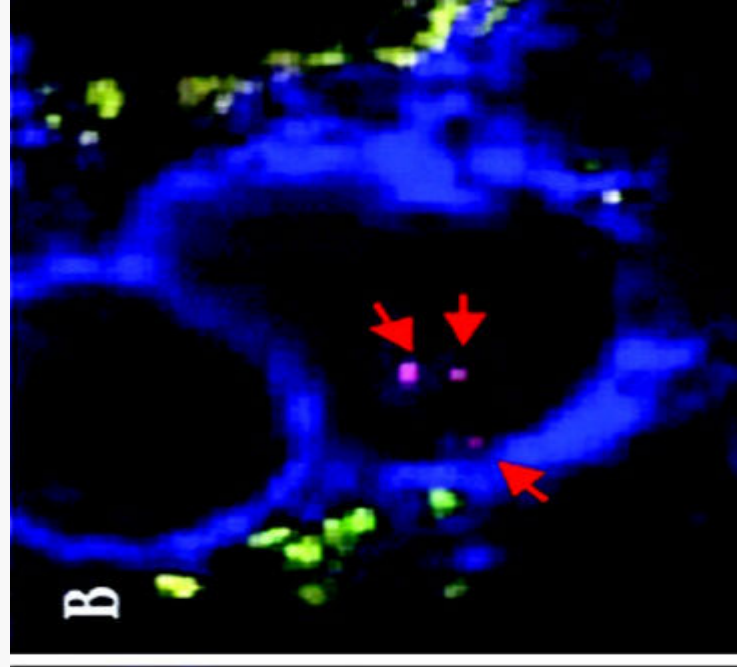
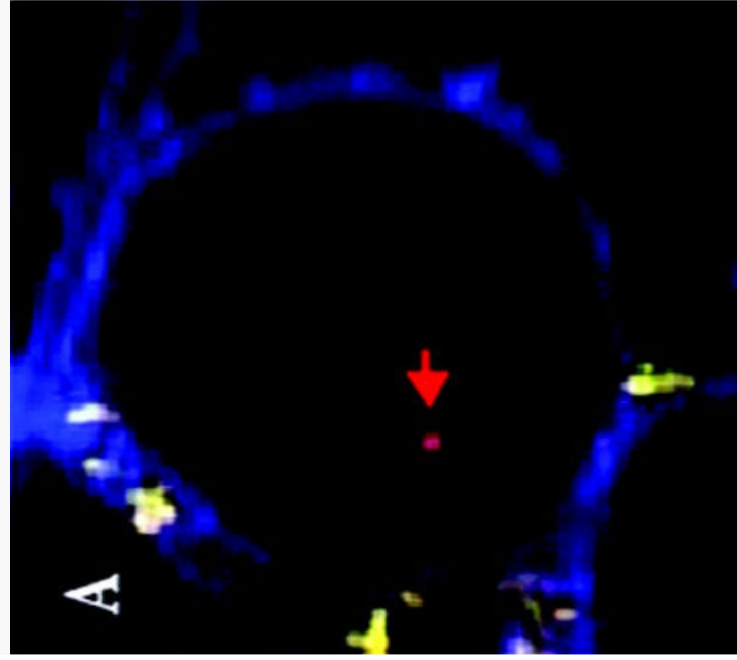
Zdroj: www.pgingivalis.org

Tannerella forsythia

- Přilnutí a invaze *T. forsythia* závisí na proteinu zevní membrány **BspA**
- **Interakce mezi *T. forsythia* a *P. gingivalis***
- *P. gingivalis* nebo její membránové měchýřky podpora **adheze k hostitelským buňkám a invaze**
- **Epitelie** s invadujícími bakteriemi jsou **rezervoárem rekurentní infekce**

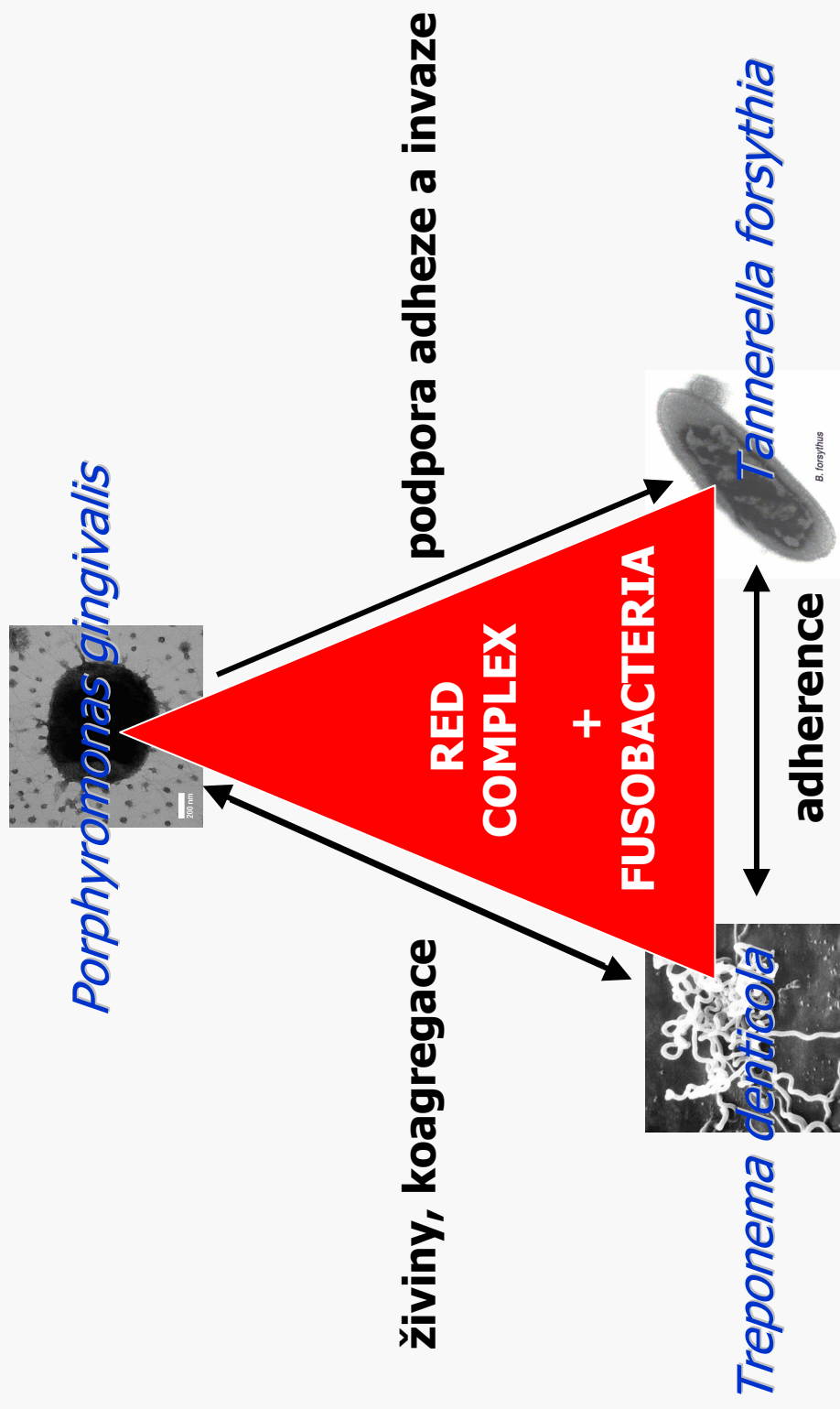


Zdroj: www.acsu.buffalo.edu



**Invaze *T. forsythia* do buněk (šipky), Inagaki 2006,
konfokální laserová mikroskopie**

Vzájemné vztahy bakterií „red complex“



Interakce mikroorganismů

- **Živiny – „crossfeeding“** - *P. gingivalis* metabolizuje sukcinát produkovaný *T. denticola* a poskytuje jí kys. isobutyrovou, nebo kompetitivní výhoda **proteolytických** mikroorganismů – rychleji osidlují sulcus gingivalis
- **Produkty metabolismu** – *P. gingivalis* citlivá na pokles pH a na O₂ chráněna produkty *Fusobacterium nucleatum*
- **Bakteriociny – přirozená antibiotika**, kompetice s blíže příbuznými mikroorganismy, např. *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *F.nucleatum*, *P.intermedia*.....

Důsledky interakce mikrobů

- **Lokalizace** rezidentní flóry – distribuce není náhodná (*P.gingivalis* – *S.gordonii*)
- **Koagregace** a lokalizace v biofilmu – např. *Treponema denticola* vázaná na *P. gingivalis* (schopná adherovat na inertní povrchy), *T. forsythia* na *F. nucleatum*
- **Rezistence na antibiotika** vč. přenosu na transientní flóru
- **Genetické výměny** mezi rezidenty – ostrůvky patogenity *P.gingivalis*
- **Modulace faktorů virulence** – quorum sensing
- **Ovlivnění hostitele** - krev (hemin) posun od G+ ke G-

Specifické (agresivní) typy parodontitid

- **HIV** – kvasinky a oportunní patogeny
- **Těhotenství** – steroidní hormony posilují množení *Prevotella intermedia*
- **Diabetes I.typu** – *S. aureus*
- **Akutní nekrotizující ulcerativní gingivitida (ANUG)** a noma - Plautova-Vincentova fusospirochetální flóra (*F. nucleatum* + *T. denticola*)
- **Rychle progredující parodontitida** – nápadně vysoká koncentrace Treponemat
- **Lokalizovaná juvenilní parodontitida** – *A. actinomycetemcomitans*
- **Prepubertální parodontitida** - na podkladě dědičného defektu leukocytů

Účast ústní mikroflóry na systémových onemocněních

Parodontitida má vztah k patogenezi systémových chorob:

- **kardiovaskulární choroby** - bakteriální endokarditida, ateroskleróza - zvl. koronárních cév (Gotsman et al. 2007)
- **cévní mozkové příhody** (Pussinen et al. 2004)
- **pneumonie**
- **diabetes mellitus** (Mealey, Rethman 2003)
- **předčasný porod a nízká porodní váha** (Lin et al. 2007)
- **karcinom jícnu** (Narikiyo et al. 2004)

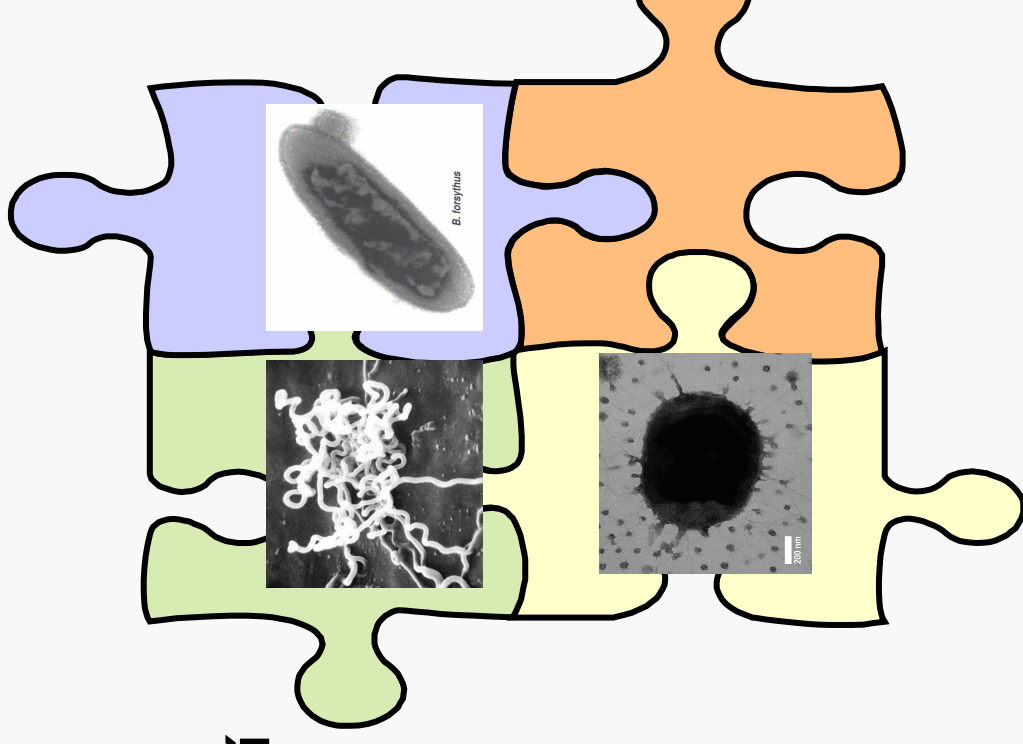
Mechanismy

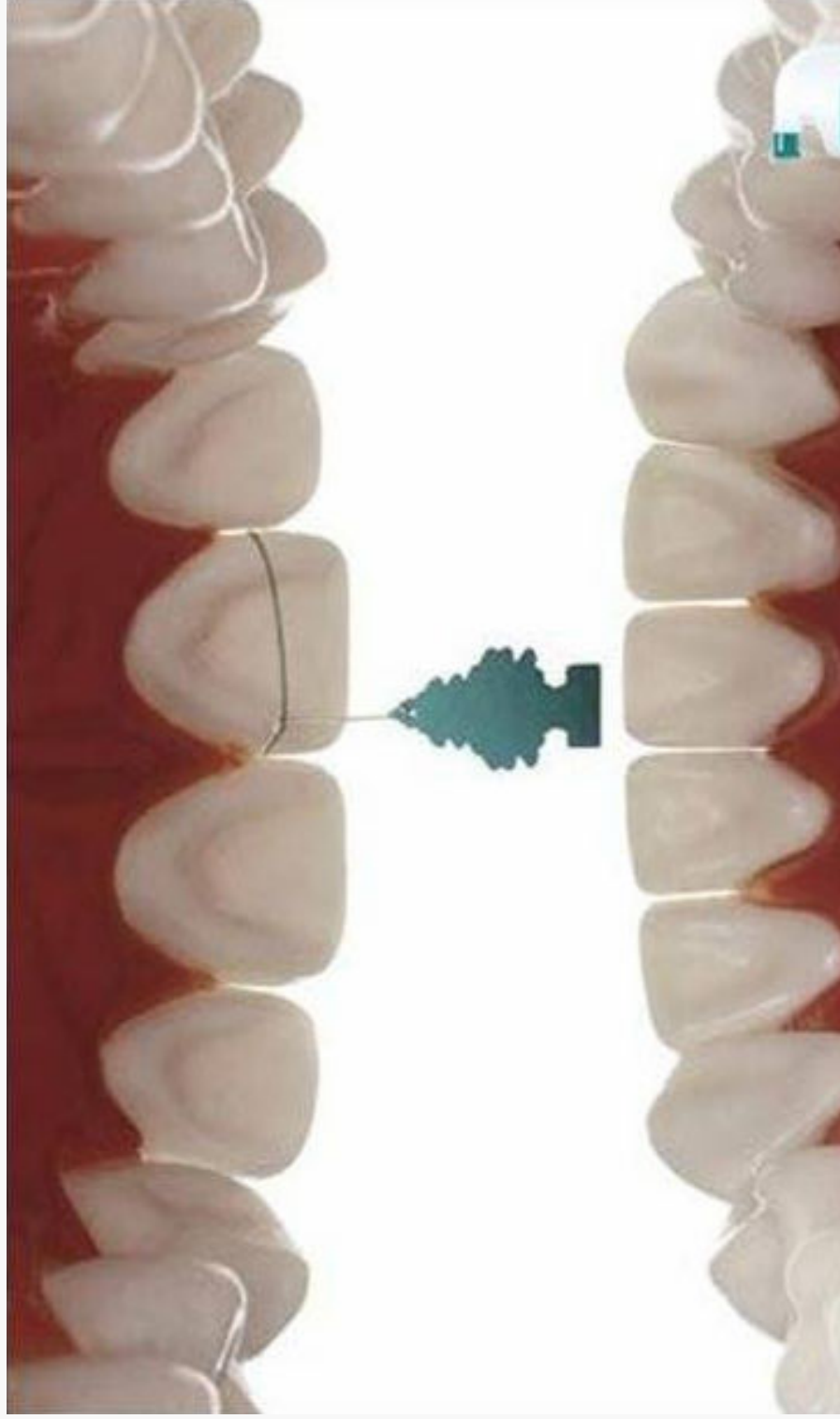
Do krevního oběhu pronikají:

- **Mikroby z úst** = metastatická infekce (bakteriémie po extrakci zubů - bakteriální endokarditida)
- **Bakteriální enzymy a toxiny** z parodontických ložisek = metastatické poškození (např. endotoxin G- bakterií ze subgingiválního biofilmu)
- **Antigeny ústních bakterií a prozánětlivé cytokiny** ze zaníceného parodontu = metastatický zánět (reakce Ag s protilátkami tam, kde se usadí imunitní komplexy)

Parodontitida - souhrn

- Modelové polymikrobiální onemocnění
- Ústní biofilm a interakce bakterií
- *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*
- Ovlivnění zdraví v širokém rozsahu





Děkuji a těším se na přednášky v jarním semestru!