

## UDZIAŁ CZYNNIKÓW WIRULENCJI *ENTEROCOCCUS FAECALIS* W ROZWOJU CHOROÓB MIAZGI I TKANEK OKOŁOWIERZCHOŁKOWYCH

Ewa Prażmo<sup>1</sup>, Renata Godlewska<sup>2</sup>, Mirosław Kwaśny<sup>3</sup>, Agnieszka Mielczarek<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji, Warszawski Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Uniwersytet Warszawski

<sup>3</sup>Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna

Wpłynęło w czerwcu 2015 r.  
Zaakceptowano w kwietniu 2016 r.

1. Wstęp. 2. Znaczenie *E. faecalis* w zakażeniach endodontycznych zębów. 3. Czynniki wirulencji *E. faecalis*. 4. Mechanizmy zjadliwości *E. faecalis*. 5. Podsumowanie

### Virulence factors of *Enterococcus faecalis* in relation to pulp diseases and periapical infections

**Abstract:** Enterococci are Gram-positive, catalase-negative, facultative anaerobic bacteria. They inhabit the oral cavity and gastrointestinal tract in humans as normal commensals. However, they can also cause infections of the urinary tract, surgical wound infections, neonatal sepsis and endocarditis. *Enterococcus faecalis* is associated with great number of refractory endodontic infections. The prevalence of these bacteria ranges from 24 to 77% in teeth with failed endodontic treatment and *E. faecalis* very often coexists with chronic apical periodontitis. Understanding the virulence, ecology and epidemiology of *E. faecalis* is essential for limiting all kinds of diseases caused by this pathogen. This article focuses on the bacterial mechanisms related to endodontic infections and periradicular inflammatory response. The most explored virulence factors are: the aggregation substance, surface adhesins, lytic enzymes, lipoteichoic acid, sex pheromones. All of them are associated with specific stages of tissue invasion. *E. faecalis* has also developed elaborated mechanisms of antibiotic resistance, as well as the ability to organize in a biofilm and overcome low-nutrient conditions. These adaptations help in the modulation of host immune response and make *E. faecalis* very difficult to eradicate by available antibiotics and disinfectants. Recognition and understanding of the nature of this pathogen will help endodontic microbiology to completely eliminate endodontic infections for successful endodontic treatment.

1. Introduction. 2. Importance of *E. faecalis* in endodontic infections. 3. Virulence factors of *E. faecalis*. 4. Virulence mechanisms of *E. faecalis*. 5. Summary

**Słowa kluczowe:** czynniki wirulencji, *Enterococcus faecalis*, oporność

**Key words:** *Enterococcus faecalis*, resistance, virulence factors

### 1. Wstęp

Do rodzaju *Enterococcus* należą Gram-dodatnie ziarniaki, fakultatywnie beztlenowe, które w rozmazach przybierają formę krótkich łańcuchów, bądź występują w parach lub jako pojedyncze kuliste komórki [32]. Znacząca większość jest zdolna do wzrostu w przedziale temperatur 10–45°C, w obecności NaCl o stężeniu 6,5% i szerokim zakresie pH od 4,5 do 9,6. Wykazują także zdolność do przetrwania w ciągu 30 min w temperaturze 60°C. Cechą charakterystyczną enterokoków jest zdolność do hydrolizy esculiny w obecności wysokiego stężenia soli żółciowych. W teście tym stosuje się 40% żółć wołową lub 4% roztwór soli kwasów żółciowych. W tych warunkach wzrost większości bakterii jest hamowany. Enterokoki zaś hydrolizują esculinę z podłoża, co jest widoczne w postaci charakterystycznego zaciemnienia podłoża (czarny strąk wokół kolonii) [42].

Ze względu na zdolność hydrolizy argininy i wytwarzania kwasów podczas rozkładu mannitolu, sorbitolu

i sorbozy rodzaj *Enterococcus* podzielono na pięć grup. Jako drobnoustrój hydrolizujący argininę, wytwarzający kwasy w podłożu z mannitolem a nie posiadający cech kwasotwórczych w obecności sorbozy, *E. faecalis* przyporządkowany został do grupy II.

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* występują w środowisku, np. w wodzie, glebie, roślinach, oraz jako organizmy komensalne występują w przewodzie pokarmowym oraz jamie ustnej człowieka. Jednocześnie są czynnikami etiologicznymi takich chorób jak zapalenie wsierdzia, zakażenie układu moczowo-płciowego, jamy brzusznej oraz ogólne zakażenia pooperacyjne. W większości tych infekcji stwierdza się obecność *E. faecalis* (w około 80% przypadków) oraz *E. faecium* (5–25% zakażeń) [40]. Ponadto uważa się, że enterokoki są jednymi z głównych drobnoustrojów powodujących szpitalne bakteriemie. Z drugiej strony, jako bakterie mlekowe mające zdolność wytwarzania bakteriocyn, są powszechnie wykorzystywane w przemyśle spożywczym i weterynaryjnym, jako probiotyki i kultury starterowe [16].

\* Autor korespondencyjny: Warszawski Uniwersytet Medyczny, Zakład Stomatologii Zachowawczej i Endodoncji, ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa; tel. 22 502 20 26; e-mail: agnieszka.mielczarek@wum.edu.pl

## 2. Znaczenie *E. faecalis* w zakażeniach endodontycznych zębów

Gatunek *E. faecalis* jest jednym ze składników naturalnej mikroflory jamy ustnej. Jednocześnie jest to trudny do eradykacji patogen, odpowiedzialny za niektóre infekcje stomatologiczne. Dominuje we wtórnych przewlekłych stanach zapalnych kanałów korzeniowych. Ponadto wykrywany jest w infekcjach tkanek przyzębia oraz rzadko w przebiegu periimplantitis (zapalenie tkanek wokół implantu). Badania wykazały dodatnią korelację pomiędzy liczbą bakterii w ślinie i na powierzchni błony śluzowej jamy ustnej, a zabiegiem leczenia endodontycznego. Odnotowano wzrost liczby szczepów *E. faecalis* w obrębie jamy ustnej u osób w trakcie lub po chemo-mechanicznym opracowaniu, a następnie wypełnieniu kanałów korzeniowych [41]. U pacjentów, u których nie doszło do utraty żywotności zębów, ich poziom w ślinie i na błonie śluzowej jamy ustnej pozostaje znacząco niższy.

Obecność *E. faecalis* jest ściśle powiązana z występowaniem stanów zapalnych tkanek okolicy wierzchołka korzenia, towarzyszących pierwotnym i przetrwałym infekcjom zlokalizowanym w świetle kanałów zębowych. W przypadku zakażeń pierwotnych wykrywany jest w 4–40% przypadków, którym towarzyszą przewlekłe bezobjawowe zmiany okołowierzchołkowe [38]. Jeżeli w przebiegu pierwotnego zapalenia miazgi dochodzi do ostrego zapalenia tkanek okołowierzchołkowych, z lub bez uformowania ropnia, *E. faecalis* nie jest wykrywany. W przypadku przetrwałych stanów zapalnych endodontium, odsetek wykrywalności tego patogenu jest znacząco wyższy. Z kanałów zębowych wymagających rewizji leczenia endodontycznego *E. faecalis* izolowany jest 9-krotnie częściej niż z pierwotnych infekcji wewnątrzkanalowych [38]. Wyniki badań wykazały, że *E. faecalis* jest wykrywany w 24 do 77% przypadków przetrwałych infekcji endodontycznych, którym towarzyszą zmiany zapalne w tkankach okołowierzchołkowych [34, 38, 45, 20]. Znaczące różnice pomiędzy wynikami mogą być efektem następujących czynników: zastosowanych technik identyfikacji szczepu oraz wielkości badanej grupy [3]. W przypadku badań opartych o metodę posiewu i identyfikacji kultur bakteryjnych, rzadziej wykrywano patogen. Technika PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy), jako metoda szybsza i bardziej czuła, potwierdziła obecność *E. faecalis* w większej liczbie leczonych kanałów.

Najnowsze doniesienia naukowe są źródłem ciekawych informacji o pochodzeniu szczepów enterokoków, wykrytych w przebiegu zakażeń korzeni zębów. W jednym z badań *E. faecalis* wyizolowany ze światła zainfekowanych kanałów nie odpowiadał genetycznie szczepom enterokoków, występujących w naturalnej mikroflorze gospodarza [58]. Obserwacji poddano

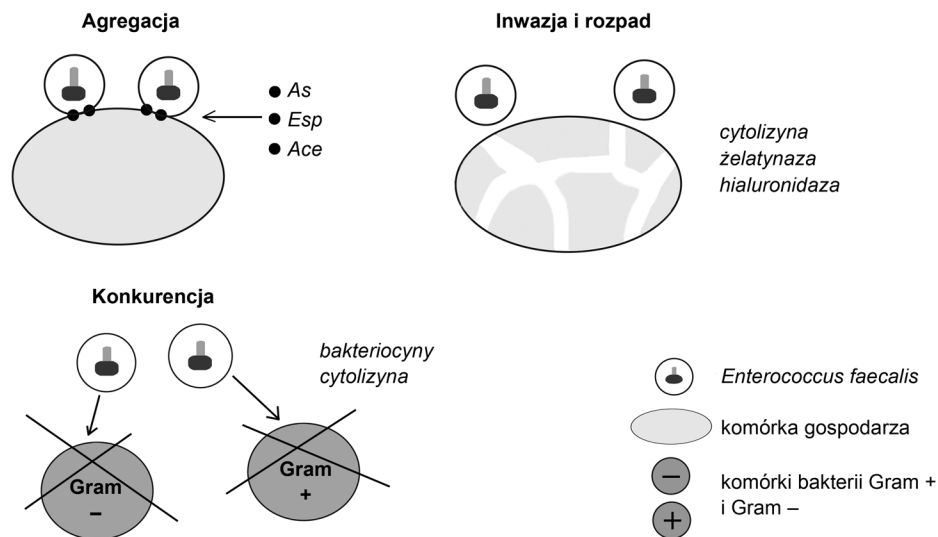
grupę 50 pacjentów. Materiał do analizy mikrobiologicznej pozyskano ze śliny, wnętrza korzeni objętych stanem zapalnym oraz z kału. Szczepy *E. faecalis* odpowiadające za rozwój infekcji endodontycznych nie odpowiadały genetycznie szczepom wyizolowanym z przewodu pokarmowego. Ponadto w żadnej z próbek śliny nie potwierdzono obecności tego drobnoustroju. We wszystkich poddanych obserwacji przypadkach, chorobotwórcze dla pacjentów były tylko bakterie egzogenne. Wniosek jednak wymaga dalszych badań i weryfikacji.

## 3. Czynniki wirulencji *E. faecalis*

*E. faecalis* jest drobnoustrojem o wielu skomplikowanych mechanizmach wirulencji. Ma zdolność adaptacji do warunków środowiska poprzez wytwarzanie szeregu substancji i uruchamianie procesów, które ułatwiają adhezję i inwazję komórek gospodarza, modyfikują jego odpowiedź immunologiczną oraz powodują uszkodzenia w obrębie tkanek (rys. 1).

Do najważniejszych czynników zjadliwości zalicza się:

**AS** (aggregation substance – substancja agregująca) – powierzchniowa adhezyna odpowiadająca za przyleganie enterokoków do komórek eukariotycznych oraz agregację komórek bakteryjnych, co ułatwia wymianę plazmidowego DNA pomiędzy nimi [35]. Białko AS kodowane jest przez geny umiejscowione na wyspie patogenności (PAI) i plazmidach zależnych od feromonów. Najlepiej poznanymi plazmidami zawierającymi geny kodujące białka AS są: pAD<sub>1</sub> – białko Asa1 [51], pPD<sub>1</sub> – białko Asp1 [16] oraz pCF10 – białko Asc10 [24]. Wszystkie białka AS posiadają motyw RGD (Arg-Gly-Asp) w N-końcowej części cząsteczki odpowiadający za wiązanie bakterii do powierzchni komórek eukariotycznych [56]. Ponadto białko AS przypisuje się liczne funkcje wpływające na chorobotwórczość enterokoków. Umożliwia ono enterokokom przyleganie do białek macierzy zewnątrzkomórkowej gospodarza. Jego obecność zwiększa hydrofobowość komórki bakteryjnej oraz hamuje aktywność granulocytów obojętnochłonnych, skierowaną przeciwko tym drobnoustrojom. AS jest także czynnikiem sprzyjającym koniugacji. U bakterii Gram-dodatnich koniugacja jest warunkowana obecnością związków powodujących agregację komórek, a nie wytwarzaniem pili płciowych, jak u bakterii Gram-ujemnych. Koniugacyjny transfer plazmidowego DNA pomiędzy komórkami *E. faecalis*, powoduje rozprzestrzenianie się oporności na antybiotyki wśród szczepów enterokoków. Ponadto, w zakażeniach układów pokarmowego i moczowego AS zwiększa poziom adhezji do komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego i nerek [26]. Substancja agregująca ma także działanie synergistyczne z cytolizyną – innym

Rys. 1. Czynniki zjadliwości *E. faecalis* i ich rola

czynnikiem wirulencji enterokoków [4]. W badaniu przeprowadzonym na królikach oceniano śmiertelność w wyniku zapalenia wsierdza spowodowanego infekcją *E. faecalis*, w zależności od możliwości wytwarzania przez te bakterie substancji agregującej i cytolizyny. Statystycznie znamienne wyższą śmiertelność wykazano w grupie zwierząt, gdzie źródłem infekcji był szczep posiadający geny odpowiedzialne za wytwarzanie zarówno AS jak i cytolizyny [4].

**Ace** (adhesion of collagen from *E. faecalis*) jest białkiem powierzchniowym o masie cząsteczkowej 74 kDa, które wraz z AS bierze udział w kolonizacji tkanek gospodarza. Cząsteczka białka Ace zbudowana jest z: N-terminalnego końca utworzonego z 31 aminokwasów, domeny A o 335 aminokwasach, domeny B składającej się z 4,5-krotnego powtórzenia 47 rodnikowych jednostek, końcowego regionu C zakotwiczonego w ścianie komórkowej przez tzw. motyw LPXTG (leucyna, prolina, X-dowolny aminokwas, treonina, glicyna). Ace należy do grupy powierzchniowych komponentów MSCRAMM (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules), gdyż posiada zdolność wiązania się z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej [25].

Białko Ace posiada zdolność łączenia się z kolagenem typu I i IV. Zawiera motyw homologiczny do domeny wiążącej kolagen, występującej w białku Cna u *Staphylococcus aureus*. Podobną homologię w budowie potwierdzono również w stosunku do białka Acn występującego u *E. faecium* i odpowiedzialnego za wiązanie do kolagenu typu I. Białka Acn *E. faecium* i Ace *E. faecalis* wykazują podobieństwa w budowie domeny A [32].

**Esp** (enterococcal surface protein) jest białkiem o masie cząsteczkowej przekraczającej 200 kDa, związanym ze ścianą komórkową bakterii. Gen *esp* ma specy-

ficzną strukturę, zawiera 3 bloki licznych tandemowych powtórzeń. Znaczenie tych struktur nie zostało jednoznacznie stwierdzone. Podejrzewa się, że umożliwiają one powstawanie różnych wariantów białka Esp, co pozwala na efektywne unikanie mechanizmów obronnych układu odpornościowego gospodarza [36]. Białku Esp przypisuje się również bardzo ważną rolę – udział w procesie tworzenia biofilmu [51]. Szczepy *E. faecalis* z mutacjami w genie *esp* traciły zdolność do tworzenia biofilmu w warunkach doświadczalnych. Wzrost enterokoków w postaci biofilmu pozwala na zwiększenie oporności bakterii na antybiotyki i spadek podatności na fagocytozę i mechanizmy obronne układu immunologicznego [9].

Białka adhezyjne enterokoków biorą udział w kolonizacji, pierwszym stadium inwazji tkanek gospodarza. Szczepy *E. faecalis* wytwarzają także substancje o właściwościach toksycznych oraz destrukcyjnych dla atakowanego organizmu: cytolizyna Cyl, żelatynaza GelE, hialuronidaza Hyl oraz proteaza serynowa SpreE.

**Cytolizyna Cyl** (zwana też hemolizyną) jest jedną z toksyn produkowanych przez enterokoki. Cytolizyna jest bakteriocyną zaliczaną do grupy lantybiotyków. Powoduje rozpad erytrocytów (wywołuje hemolizę typu  $\beta$ ), leukocytów obojętnochłonnych i makrofagów. Posiada także właściwości bójcze w stosunku do wielu bakterii Gram-dodatnich [19]. Szczepy *E. faecalis* wytwarzające cytolizynę charakteryzują się większą zjadliwością w porównaniu do szczepów cytolizynonegatywnych [57]

**Żelatynaza GelE** jest wydzielaną zewnątrzkomórkowo endopeptydazą zależną od jonów cynku. Enzym ten hydrolizuje kolagen, hemoglobinę, kazeinę, żelatynę, w następstwie czego dochodzi do powstawania zmian patologicznych w tkankach [46]. Białko o takiej samej aktywności jest również wytwarzane

w organizmie człowieka przez komórki zapalne, nabłonkowe, fibroblasty oraz osteoklasty, i uczestniczy w procesach przebudowy tkanek. Żelatynaza w podwyższonych stężeniach wykrywana jest w chorobach przyzębia, infekcjach miazgi i zmianach okołowierzchołkowych [43]. Rozpad kolagenu w tych stanach patologicznych ma działanie chemotaktyczne w stosunku do monocytów, makrofagów, neutrofilów, aktywuje produkcję reaktywnych form tlenu i enzymów litycznych, a zatem jest inicjatorem uszkodzeń prozapalnych. Analogiczne znaczenie przypisuje się bakteryjnej hialuronidazie, która poprzez indukcję tych samych mechanizmów może pełnić istotną funkcję w patogenie zapalenia okołowierzchołkowych.

**Hialuronidaza** jest enzymem, który powoduje rozkład kwasu hialuronowego. W następstwie wytwarzania hialuronidazy przez szczepy *E. faecalis*, dochodzi do niszczenia tkanki chrzęstnej i kostnej [25]. Obecność *E. faecalis* w zmianach okołowierzchołkowych może wynikać z właściwości osteolitycznych hialuronidazy [1]. Wytwarzanie hialuronidazy może ułatwiać patogenom migrację z kanału korzeniowego do okolicy okołowierzchołkowej. Jednakże teoria ta, choć pojawia się w piśmiennictwie wielokrotnie, wymaga dalszych badań i potwierdzenia.

W mechanizmach wirulencji enterokoków biorą także udział tzw. **feromony płciowe**. Są to krótkie hydrofobowe peptydy, które pełnią rolę swoistego sygnału w procesie wymiany materiału genetycznego pomiędzy szczepami *E. faecalis* [10]. Komórka bakteryjna potencjalnego biorcy wydziela feromon, który oddziałuje z białkami dawcy kodowanymi plazmidowo, aktywując gen AS, czego następstwem jest rozpoczęcie koniugacji. Wytwarzane feromony są swoiste dla konkretnych plazmidów, np.: feromon cAD1 – plazmid pAD1.

W ten sposób, na drodze horyzontalnego transferu genów, bakterie uzyskują i modyfikują swoją odporność na antybiotyki (plazmid warunkujący oporność na tetracyklinę pCF10, feromon cCF10) [5], możliwość wytwarzania innych czynników wirulencji, np. cytolyzyny (plazmid kodujący aktywność cytolyzyny pOB1, feromon cOB1) [7]. Niektóre feromony płciowe posiadają także właściwości chemotaktyczne dla neutrofilów oraz powodują wzrost wytwarzania przez nie enzymów lizosomalnych oraz zewnątrzkomórkowych nadtlenków [12]. Zwiększone miano enzymów lizosomalnych skorelowane jest natomiast z rozwojem wielu stanów patologicznych zębów i tkanek przyzębia, takich jak przewlekła choroba przyzębia oraz zmiany okołowierzchołkowe związane z zapaleniem miazgi. Enzymy lizosomalne wpływają także na resorpcje kości wyrostka zębodołowego poprzez destrukcję oraz hamowanie tworzenia nowej tkanki kostnej [52].

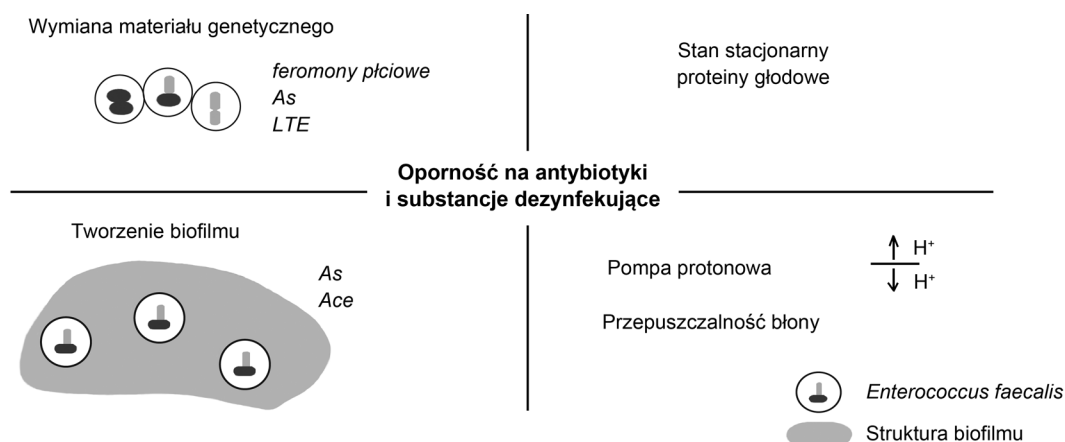
**Kwas lipotejchowy (LTA)** jest związkiem organicznym zawierającym część lipidową diacylglicerolową

oraz powtarzające się jednostki glicerofosforanowe. LTA jest wbudowany w błonę komórkową bakterii Gram-dodatnich. Pełni funkcję receptora w agregacji i koniugacji plazmidów bakteryjnych pomiędzy komórkami enterokoków [11]. Jednak jego zasadniczą rolą jest stymulacja odpowiedzi prozapalnej w reakcji na czynnik infekcyjny. Następuje to poprzez pobudzenie leukocytów do wzmożonego uwalniania cytokin, takich jak: TNF alfa, IL-1beta, IL-6, makrofagów do produkcji prostaglandyny PGE2 oraz monocytów do wytwarzania anionów nadtlenowych [56]. Wszystkie wymienione wyżej czynniki wykrywane są w zmianach okołowierzchołkowych i odpowiadają za uszkodzenia tkanek tej okolicy w przebiegu procesów zapalnych. Inne znaczenie LTA to stymulacja uwalniania mediatorów w fazie ostrej, co powoduje wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych oraz angiogenezę. Natomiast poprzez hamowanie wytwarzania śródbłonkowych czynników wzrostu zaburza angiogenezę, wpływając na powolny rozwój przewlekłych stanów patologicznych okolicy otaczającej wierzchołek zęba [54]. Typowym ich objawem jest rozrzedzenie i zniszczenie struktury kostnej, a LTA może mieć istotny wpływ w przebiegu tego procesu. Badania *in vitro* wykazały ponadto wpływ kwasu lipotejchowego na indukcję apoptozy ludzkich komórek osteoblastycznych [49] oraz wpływ na ekspresję związków regulujących dojrzewanie komórek osteoklastycznych: ligandu RANKL na osteoblastach i osteoprotegryny OPG [59]. Wzrost ekspresji RANKL z jednoczesną redukcją ekspresji OPG stymuluje proces różnicowania, dojrzewania i aktywacji osteoklastów, powodując niszczenie tkanki kostnej w przebiegu chorób przyzębia [59].

Laboratoryjna ocena podatności komórek bakteryjnych na działanie antybiotyków dostarczyła innych ważnych informacji na temat znaczenia cząsteczek LTA. Potwierdzono rolę kwasu lipotejchowego w wytwarzaniu oporności na przenikanie antybiotyków do wnętrza komórek, w zmniejszaniu wrażliwości na działanie detergentów oraz wzmocnienie przeżywalności enterokoków w środowisku pozbawionym składników odżywczych [44]. Kwas lipotejchowy może być tym samym odpowiedzialny za brak skuteczności opatrunków wewnątrzkanałowych, aplikowanych w trakcie leczenia endodontycznego, mających na celu eradykację *E. faecalis*.

#### 4. Mechanizmy zjadliwości *E. faecalis*

Warunkiem uznania bakterii za chorobotwórcze jest posiadanie przez nie zdolności do przylegania, wnikania i wzrostu w tkankach. Zjadliwość bakterii jest ponadto warunkowana przez mechanizmy obronne, pozwalające unikać działania systemu odpornościo-



Rys. 2. Mechanizmy zjadliwości *E. faecalis* warunkujące oporność na substancje dezynfekujące i antybiotyki

wego gospodarza i jednocześnie umożliwić współzawodnictwo o przetrwanie z innymi bakteriami bytującymi w tej samej niszy (Rys. 2).

W obrębie jamy ustnej miejscem bytowania chorobotwórczych szczepów *E. faecalis* jest wewnątrz korzeni zębowych. Po wnikięciu do kanału korzeniowego *E. faecalis* kolonizuje ścianę zębinową. Poprzez kwas lipotejchojowy wiąże się z częścią mineralną zębów, natomiast dzięki adhezynie powierzchniowej Ace przylega do kolagenu. Środowisko to charakteryzuje się szeregiem niesprzyjających czynników bytowych: niedobór składników pokarmowych, obecność innych bakterii i ich toksyn oraz działanie różnego rodzaju chemioterapeutyków. Patogen wytworzył szereg mechanizmów przystosowawczych do bytowania w tych warunkach. Posiada zdolność wnikania do wnętrza kanalików zębiny, gdzie staje się niewidoczny dla immunologicznego układu odpornościowego gospodarza. W środowisku tlenowym, bogatym w składniki odżywcze *E. faecalis* wnika do wnętrza kanalików zębiny na średnią głębokość 1483  $\mu\text{m}$ . W warunkach beztlenowych głębokość wnikania zmniejsza się do 1166  $\mu\text{m}$ , a najmniejszą głębokość kolonizacji kanalików, na poziomie 620  $\mu\text{m}$  osiąga w środowisku beztlenowym, pozbawionym składników odżywczych [22]. Po zaaplikowaniu do światła kanału korzeniowego wodorotlenku wapnia, związku powszechnie stosowanego w leczeniu endodontycznym, pH gwałtownie wzrasta. Jednak w głębi kanalików zębiny, daleko od światła kanału głównego, pH pozostaje na znacząco niższym poziomie, a bakterie bytujące w tym obszarze są mniej narażone na działanie uszkodzających substancji chemicznych [53]. Pomiar wykonany na powierzchni korzenia po dokanałowej aplikacji pasty wodorotlenkowo-wapniowej, wykazywały wartości pH 7,3–8,9, nie wywierające negatywnego wpływu na wzrost bakterii [29, 30]. Utrzymanie odpowiednio niskiego pH jest także możliwe dzięki działaniu pasywnych i aktywnych mechanizmów obronnych bakterii. Mechanizmem pasywnym

jest przepuszczalna błona *E. faecalis* pozwalająca na swobodny przepływ jonów, zaś aktywnym – działanie pompy protonowej, będącej integralną częścią błony. Transport protonów do komórki wspomaga utrzymanie wewnętrznej hemostazy jonowej i odczynu kwasowo-zasadowego na odpowiednio niskim poziomie [47]. Przy pH środowiska przewyższającym 11,5 *E. faecalis* nie jest zdolny do przetrwania [13]. Wyżej opisane kompensacyjne mechanizmy wewnętrzne patogenu pozostają nieaktywne. Jednak zębina kolonizowana przez bakterie, także posiada zdolności buforujące i w warunkach in vivo niemożliwe jest utrzymanie stałego pH na tak wysokim poziomie [18, 53]. Niskie pH, jako jeden z czynników stresowych, wpływa również na zmianę metabolizmu komórki bakteryjnej. Zwiększa się synteza i transport nukleotydów, a zmniejsza ekspresja genów odpowiedzialnych za wytwarzanie energii, metabolizm węglowodanów i aminokwasów [37].

*E. faecalis* wytwarza cytolizynę oraz szereg bakteriocyn o działaniu toksycznym na inne bakterie, zarówno Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne [33]. Dzięki temu, w przetrwałych przewlekłych infekcjach endodontycznych, liczba gatunków bakterii innych niż enterokoki jest niska.

Enterokoki rozwinęły mechanizmy adaptacyjne do życia w środowisku o ograniczonym dostępie do składników odżywczych. Wytwarzana hialuronidaza powoduje depolimeryzację kwasu hialuronowego dostępnego w zębinie. Produkty rozpadu kwasu hialuronowego wykorzystywane są następnie w podstawowych procesach metabolicznych. Innym źródłem bakteryjnych substratów pokarmowych są składniki płynu surowiczego, występujące w kanalikach zębiny. Niedostatecznie szczelne zamknięcie otworu wierzchołkowego w przebiegu leczenia endodontycznego stanowi drogę przepływu dla surowicy i umożliwia dostęp do składników odżywczych. Jednak, gdy źródła energii zostaną drastycznie ograniczone, bakterie przechodzą w tzw. stan stacjonarny [37]. Komórki spowalniają i ograniczają

metaboliczne procesy syntezy oraz zmniejszają swoje rozmiary [27]. Po kilku tygodniach bytowania w warunkach oligotropowych powierzchnia komórki staje się wyraźnie pofałdowana z licznymi zagłębieniami. W odróżnieniu od komórek w fazie logarytmicznej, w fazie stacjonarnej komórki organizują się w pary. W stanie tym utrzymywana jest synteza specyficznych białek głodowych [21]. W jednym z badań podjęto próbę wyizolowania białek wytwarzanych przez komórki bakteryjne w środowisku pozbawionym glukozy oraz substratów pokarmowych. W warunkach oligotrofowych zidentyfikowano 51 białek O (O – oligotrophic proteins), natomiast całkowite ograniczenie dostępu glukozy skutkowało syntezą 42 białek Gls (Gls – glucose starvation-inducible proteins). W obu grupach badawczych stwierdzono występowanie 16 białek o tej samej strukturze. Autorzy badania uznali je za kluczowe w rozwoju stanu stacjonarnej bakterii *E. faecalis* i ich długoczasowej odporności na nieprzystające warunki bytowe. W innym doświadczeniu poddano ocenie wrażliwość komórek bakteryjnych na działanie różnego rodzaju czynników fizycznych i chemicznych, po wcześniejszej inkubacji w środowisku pozbawionym glukozy [17]. Badane szczepy *E. faecalis*, przy braku dostępu do glukozy, wykazały wzrost odporności na następujące czynniki stresowe: wysoką temperaturę, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, odczyn kwaśny, etanol oraz podchloryn sodu stosowany w leczeniu endodontycznym zębów. Zmiany morfologiczne w budowie komórki bakteryjnej i synteza specyficznych białek stresowych (O i Gls), zachodzące w warunkach stresowych, stanowią element mechanizmów obronnych szczepu *E. faecalis*. Mechanizmy te mogą jednocześnie być odpowiedzialne za brak podatności komórek bakteryjnych na terapię stanów zapalnych korzeni zębowych [28].

Gatunek *E. faecalis* posiada zdolność formowania biofilmu. Biofilm definiowany jest jako wysoce zorganizowane skupisko bakterii otoczone białkowo-polisacharydową substancją – macierzą, która stanowi ok. 85% tej struktury [36]. Organizacja komórek bakteryjnych w strukturze biofilmu sprzyja wymianie pomiędzy nimi materiału genetycznego na drodze koniugacji. Ponadto zdolność formowania biofilmu ma kluczowe znaczenie dla rozwoju bakteryjnej odporności na działanie antybiotyków, chemioterapeutyków i substancji dezynfekujących, stosowanych w leczeniu endodontycznym. Istnieje kilka hipotez wyjaśniających to zjawisko. Pierwsza teoria mówi o zwolnionej, utrudnionej penetracji antybiotyków poprzez macierz biofilmu. Środki chemiczne są potencjalnie dezaktywowane w trakcie penetracji biofilmu [2] lub też absorbowane przez macierz otaczającą bakterie [7]. Badania laboratoryjne potwierdziły utrudnioną penetrację tej struktury przez związki chloranu stosowane w trakcie chemo-mechanicznego opracowania kanałów korzeniowych

[8]. Inna hipoteza zakłada zróżnicowanie środowiska chemicznego w obrębie biofilmu. Badania Hu i współpracowników wykazały, że na powierzchni biofilmu dochodzi do całkowitej konsumpcji tlenu, co powoduje zmianę mikrośrodowiska wewnątrz biofilmu na beztlenowe [24] i uniemożliwia tym samym działanie niektórych antybiotyków. Założenie to zostało potwierdzone w laboratoryjnej analizie skuteczności aminoglikozydów, która to była znacząco niższa w warunkach beztlenowych [48]. Wedle innej hipotezy enterokoki zorganizowane w biofilmie przyjmują specyficzny stan fenotypowy cechujący się wysoką odpornością na uszkodzające działanie substancji chemicznych [14]. Wszystkie powyższe hipotezy o roli biofilmu w mechanizmach obronnych enterokoków potwierdzają wysoki stopień zorganizowania i złożoność tej struktury.

## 5. Podsumowanie

*E. faecalis* jest organizmem komensalnym dla człowieka. W warunkach normalnych bytuje w jamie ustnej. W warunkach patologicznych, gdy dojdzie do zakażenia i rozwoju stanu zapalnego, wykrywany jest w przebiegu chorób miazgi i tkanek okołowierzchołkowych, a szczególnie w przetrwałych infekcjach endodontycznych. *E. faecalis* posiada złożone mechanizmy wirulencji umożliwiające kolonizację korzenia zębowego oraz przetrwanie w niesprzyjającym pH, w warunkach o ograniczonym dostępie substratów pokarmowych i glukozy. Białka adhezyjne AS, Ace i Esp umożliwiają enterokokom przyleganie do komórek gospodarza. Enzymy lityczne cytolizyna Cyl, żelatynaza GelE, hialuronidaza Hyl oraz proteza serynowa SpreE mają działanie toksyczne i powodują uszkodzenie atakowanych tkanek. W przebiegu zakażeń korzeni zębowych, po zastosowaniu konwencjonalnej terapii chemo-mechanicznej szczepy *E. faecalis* nie ulegają kompletnej eradykacji. Ze względu na wzrastającą oporność antybiotykowej bakterie są niepodatne na powszechnie stosowane w endodoncji środki do dezynfekcji i chemioterapeutyki. *E. faecalis* posiada także zdolność tworzenia biofilmu oraz zasiedlania wnętrza kanałów zębinowych, w wyniku czego staje się niewidoczny dla systemu odpornościowego gospodarza. *E. faecalis* jest drobnoustrojem, który wytworzył bardzo skomplikowane mechanizmy adaptacyjne. Niewątpliwie mikrobiologia endodontyczna musi skupić się na dokładnym ich zdefiniowaniu i zrozumieniu. Konieczne jest podjęcie nowych strategii leczenia chorób miazgi i tkanek endodontycznych, skierowanych bezpośrednio na zneutralizowanie tych czynników i mechanizmów wirulencji. Tylko dogłębne poznanie patogenu pozwoli na zapobieganie występowania zakażeń oraz minimalizację skutków ich występowania.

## Piśmiennictwo

- Abou-Rass M., Bogen G.: Microorganisms in closed periapical lesions. *Int. Endod. J.* **31**, 39–47 (1998)
- Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S.: Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1818–1824 (2000)
- Baumgartner J.C., Siqueira J.F., Xia T., Rocas I.N.: Geographical differences in bacteria detected in endodontic infection using polymerase chain reaction. *J. Endod.* **30**, 141–144 (2004)
- Chow J.W., Thal L.A., Perri M.B., Vazquez J.A., Donabedian S.M., Clewell D.B., Zerwos J.M.: Plasmid associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 274–277 (1993)
- Chatterjee A., Cook L.C., Shu C.C., Chen Y., Manias D.A., Ramkrishna D., Dunny G.M., Hu W.S.: Antagonistic self-sensing and mate-sensing signaling controls antibiotic-resistance transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7086–7090 (2013)
- Clewell D.B., Weaver K.E.: Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*, **21**, 175–184 (1989)
- Costerton J.W.: Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrobial Agents*, **11**, 217–222 (1999)
- De Beer D., Srinivasan R., Stewart P.S.: Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4339–4344 (1994)
- Distel J.W., Hatton J.F., Gillespie M.J.: Biofilm formation in medicated root canals. *J. Endod.* **28**, 689–693 (2002)
- Dunny G.M.: *Enterococcal* sex pheromones: signaling, social behavior, and evolution. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 457–482 (2013)
- Ehrenfeld E.E., Kessler R.E., Clewell D.B.: Identification of pheromone-induced surface proteins in *Streptococcus faecalis* and evidence of a role for lipoteichoic acid in formation of mating aggregates. *J. Bacteriol.* **168**, 6–12 (1989)
- Ember J.A., Hugli T.E.: Characterization of the human neutrophil response to sex pheromones from *Streptococcus faecalis*. *Am. J. Pathol.* **134**, 797–805 (1989)
- Evans M., Davies J.K., Sundqvist G., Figdor D.: Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int. Endod. J.* **35**, 221–228 (2002)
- Foley I., Gilbert P.: In-vitro studies of the activity of glycopeptide combination against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 667–672 (1997)
- Foulquie M., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L.: The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food. Microbiol.* **106**, 1–24, (2006)
- Galli D.A., Friesenegger A., Wirth R.: Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (ppD1-encoded) aggregation substance. *Mol. Microbiol.* **6**, 1297–1308 (1992)
- Giard J.C., Hartke A., Flahaut S., Benachour A., Boutibonnes P., Auffray Y.: Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Curr. Microbiol.* **32**, 264–271 (1996)
- Haapasalo H.K., Sirén E.K., Waltimo T.M.T., Ørstavik D., Haapasalo M.P.P.: Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int. Endod. J.* **33**, 126–131 (2000)
- Hallgren A., Claesson C., Saeedi B., Monstein H., Hanberger H., Nilsson L.E.: Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein and cytolysin genes and *in vitro* adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**, 323–332 (2008)
- Hancock H.H., Sigurdsson A., Trope M., Moiseiwitsch J.: Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North Am population. *Oral Surg. Oral Med. Oral Radiol. Endod.* **91**, 579–586 (2001)
- Hartke A., Giard J.C., Laplace J.M., Auffray Y.: Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4238–4245 (1998)
- Hedge V.: *Enterococcus faecalis*; clinical significance and treatment considerations. *Endodontology*, **2**, 48–52 (2009)
- Hu K.D., Stewart P.S., Xia F., Huang C.T., McFeters G.A.: Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4035–4039 (1998)
- Kao S.M., Olmsted S.B., Viksnins A.S., Gallao J.C., Dunny G.M.: Molecular and genetic analysis of a region of plasmid pCF10 containing positive control genes and structural genes encoding surface proteins involved in pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **173**, 7650–7664 (1991)
- Kayaoglu G., Ørstavik D.: Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* **15**, 308–320 (2004)
- Kret B., Marre R., Schramm U., Wirth R.: Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.* **60**, 25–30 (1992)
- Kjelleberg S., Albertson N., Flardh K., Holmquist L., Jouper-Jaan A., Marouga R., Ostling J., Svenblad B., Weichart D.: How do not-differentiating bacteria adapt to starvation? *Antonie van Leeuwenhoek*, **63**, 333–341 (1993)
- Laplace J.M., Thuault M., Hartke A., Boutibonnes P., Auffray Y.: Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: influence of antecedent growth conditions and induced proteins. *Curr. Microbiol.* **34**, 284–289 (1997)
- Maniglia-Ferreira C., de Almeida Gomes F., Soares de Lima Guimarães N.L., de Moraes Vitoriano M., Ximenes T.A.: Alves dos Santos R. *In vitro* analysis of the pH alteration of the dentine after using different calcium hydroxide-based pastes. *RSBO*. **10**, 122–127 (2013)
- Montero J.C., Mori G.G.: Assessment of ion diffusion from a calcium hydroxide-propolis paste through dentin. *Braz. Oral. Res.* **26**, 318–322 (2012)
- Murray B.E.: The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **3**, 46–65 (1990)
- Nallapareddy S.R., Weinstock G.M., Murray B.E.: Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSSCRAMM family. *Mol. Microbiol.* **47**, 1733–1747 (2003)
- Nes I.F., Diep D.B., Ike Y.: Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control (w) Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y, Shankar N.: Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, 2014
- Peciulienė V., Reynaud A.H., Balciuniene I., Haapasalo M.: Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int. Endod. J.* **34**, 429–434 (2001)
- Piekarska K.: Enterokoki – czynniki wirulencji i chorobotwórczość. *Post. Mikrobiol.* **45**, 195–207 (2006)
- Portenier I., Waltimo T.M.T., Haapasalo M.: *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and star in post treatment disease. *Endodontic topics*, **6**, 135–159 (2006)
- Ran S., Liu B., Jiang W., Sun Z., Liang J.: Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress. *Front. Microbiol.* **6**, 795 (2015)
- Rocas I.N., Siqueira J.F., Santos K.R.M.: Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J. Endod.* **30**, 315–320 (2004)

39. Rich R.L., Kreikemeyer B., Owens R.T., LaBrenz S., Naraya S.V.L., Weinstok G.M., Murray B.E., HooK M.: Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* **274**, 26939–26945 (1999)
40. Ruoff K.L., de la Maza L., Murtagh M.J., Spargo J.D., Ferraro M.J.: Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 435–437 (1990)
41. Sedgley C.M., Lennan S.L., Clewell D.B.: Prevalence, phenotype, and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**, 95–101 (2004)
42. Sherman J.M.: The Streptococci. *Bacteriol. Rev.* **1**, 3–97 (1937)
43. Shin S.J., Lee J., Baek S.H., Lim S.S.: Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J. Endod.* **28**, 313–315 (2002)
44. Shungu D.L., Cornett J.B., Shockman G.D.: Morphological and physiological study of autolytic – defective *Streptococcus faecium* strains. *J. Bacteriol.* **138**, 598–608 (1979)
45. Siqueira J.F., Rocas I.: Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Radiol. Endod.* **97**, 85–94 (2004)
46. Steck N., Hoffmann N., Sava I.G., Kim S.C., Hahne H, Tonkonogy S.L., Mair K., Krueger D., Pruteanu M., Shanahan F, Vogelmann R., Schemann M., Kuster B., Sartor R.B., Haller D.: *Enterococcus faecalis* Metalloprotease Compromises Epithelial Barrier and Contributes to Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*, **141**, 959–971 (2011)
47. Stuart Ch.H., Schwartz S.A., Beeson T.J., Owatz C.B.: *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J. Endod.* **32**, 293–298 (2006)
48. Tack K.J., Sabath L.D.: Increased minimum inhibitory concentrations with anaerobiasis for tobramycin, gentamycin, and amikacyn, compared to latamoxef piperacyllin, chloramphenicol, and clindamycin. *Chemotherapy*, **3**, 204–210 (1985)
49. Tian Y., Zhang X., Zhang K., Song Z., Wang R., Huang S, Lin Z.: Effect of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on apoptosis in human osteoblast-like cells. *J. Endod.* **39**, 632–637 (2013)
50. Toledo-Arana A., Valle J., Solano C., Arrizubieta M.J., Cuarella C., Lamata M., Amorena B., Leiva J., Penades J.R., Lasa I.: The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4538–4545 (2001)
51. Tomich P.K., An F.Y., Damle S.P., Clewell D.B.: Plasmid-related transmissibility and multiple drug resistance in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes* strain DS16. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**, 828–830 (1997)
52. Torabinejad M., Eby W.C., Naidorf I.J.: Inflammatory and immunological aspects of the pathogenesis of human periapical lesions. *J. Endod.* **11**, 479–488 (1985)
53. Tronstad L., Andreasen J.O., Hasselgren G., Kristerson L., Riis I.: pH changes in dentinal tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J. Endod.* **7**, 17–21 (1989)
54. Wada K., Fujii E., Ishida K., Yoshioka T., Muraki T.: Effect of lipoteichoic acid on dermal vascular permeability in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 280–286 (2000)
55. Wang S., Liu K., Seneviratne C.J., Li X., Cheung G.S., Jin L., Chu C.H., Zhang C.: Lipoteichoic acid from an *Enterococcus faecalis* clinical strain promotes TNF- $\alpha$  expression through the NF- $\kappa$ B and p38 MAPK signaling pathways in differentiated THP-1 macrophages. *Biomed. Rep.* **5**, 697–702 (2015)
56. Waters Ch.M., Wells C.L., Dunny G.M.: The aggregation domain of aggregation substance, not the RGD motifs, is critical for efficient internalization by HT-29 enterocytes. *Infect. Immun.* **71**, 5682–5689 (2003)
57. Van Tyne D., Martin M.J., Gilmore M.S.: Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. *Toxins*, **5**, 895–911 (2013)
58. Vidana R., Sullivan A., Billström H., Ahlquist M., Lund B.: *Enterococcus faecalis* infection in root canals – host-derived or exogenous source? *Lett. Appl. Microbiol.* **52**, 109–115 (2010)
59. Zhao L., Chen J., Cheng L., Wang X., Du J., Wang F., Peng Z.: Effects of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin expression in periodontal ligament fibroblasts. *Int. Endod. J.* **47**, 163–172 (2013)