

Giulio Pacini<sup>1</sup>  
Federico Foschi<sup>1</sup>  
Francesca Cavrini<sup>2</sup>  
Antonella Marangoni<sup>2</sup>  
Vittorio Sambri<sup>2,3</sup>  
Carlo Prati<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Alma Mater Studiorum-  
Università degli Studi di Bologna  
Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche  
Direttore: Prof. Carlo Prati  
Reperto di Endodonzia  
<sup>2</sup> Università degli Studi di Bologna,  
Ospedale S. Orsola,  
Sezione di Microbiologia, DMCS.  
Direttore: Prof. C. Varotti  
<sup>3</sup> Insegnamento di Microbiologia Clinica  
<sup>4</sup> Insegnamento di Endodonzia

Corrispondenza:  
Prof. Carlo Prati  
Dipartimento di Scienze  
Odontostomatologiche  
Via S. Vitale, 59  
40125 Bologna.  
E-mail: prati@alma.unibo.it

## Identificazione di *Treponema denticola* nelle patologie endodontiche periapicali mediante tecnica di reazione di polimerizzazione a catena (PCR)

Detection of *Treponema denticola* in endodontic periapical diseases with technique of polymerase chain reaction (PCR)

### RIASSUNTO

Gli agenti eziologici delle patologie endodontiche periapicali sono un gruppo di batteri ristretto e selezionato, tra i quali sono prevalenti anaerobi obbligati Gram-negativi.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare, tramite PCR, la presenza in corso di patologia endodontica di uno dei batteri maggiormente patogeni: *Treponema denticola*. Un altro scopo è stato quello di correlare la dimostrazione di tale batterio a manifestazioni cliniche, endodontico-periapicali, distinte in base alla presenza di sintomatologia acuta e di lesione radiografica. Nello studio sono stati inclusi un totale di 33 campioni di 26 differenti pazienti (età compresa tra 17 e 68 anni).

I risultati hanno sottolineato come *T. denticola* sia presente nel 27.3% dei prelievi eseguiti; inoltre si è riscontrata una notevole associazione (88.9% dei casi positivi) tra la presenza del microrganismo e la manifestazione clinica di parodontite apicale acuta.

**Parole chiave:**

*Treponema denticola*, PCR, parodontite apicale acuta.

### ABSTRACT

The bacteria species involved in the pathogenesis of endodontic periapical diseases are a restrict group, among which Gram-negative anaerobe species are prevalent.

The aim of this study was to evaluate the pre-

sence of *Treponema denticola* in acute or chronic apical periodontitis (AAP, CAP) and to assess the correlation between the presence of this bacteria and clinical signs. Microbial samples were obtained after introduction of a sterile paper point inside endodontic space. Clinical data were evaluated and recorded: pain, swelling, positive Rx. A total of 33 teeth from 26 patients (age 17-68) were included in the study. Microbiological analysis was performed by PCR, using pairs of primers to amplify bacterial DNA sequences specific to *T. denticola*. The present study demonstrated that *T. denticola* is present in infected root canal (27.3 % of all samples) and resulted strongly associated with symptomatic (88.9% among positive samples).

**Key words:**

*Treponema denticola*, PCR, acute apical periodontitis.

### INTRODUZIONE

Sebbene più di 300 specie batteriche vengano considerate normali commensali del cavo orale, quelle coinvolte nelle patologie di tipo pulpare e periapicale sono un gruppo decisamente più ristretto, selezionato (1) e non ancora ben conosciuto e definito. Alcune recenti ricerche hanno dimostrato la presenza di *Treponema denticola* all'interno del canale endodontico, suggerendone un ruolo eziologico nella patologia pulpare e periapicale (2, 3).

In questo studio è stato preso in considerazione il ruolo eziologico di *T. denticola*, un batterio Gram-negativo, anaerobio obbligato, di forma allungata e con il corpo avvolto a spirale. Esso appartiene all'ordine *Spirochaetales*, con una lunghezza compresa tra i 5 e 15 µm

e un diametro mai superiore a 0,2 µm. Una caratteristica peculiare è rappresentata dall'apparato locomotore batterico formato da una serie di endoflagelli, che sono dislocati all'interno della cellula e scorrono lungo il corpo batterico nello spazio periplasmico.

È difficile stabilire se sia un endopatogeno o un microrganismo opportunisto che cresce come risultato di una necrosi pulpare, tuttavia possiede diversi fattori di virulenza che hanno permesso di ipotizzare il suo ruolo patogeno in molte malattie orali e nella patogenesi delle lesioni periradcolari (2). I principali fattori di virulenza a livello morfologico sono l'espressione delle proteine di superficie, le adesine, in particolare la Msp (proteina maggiore di superficie) che è in grado di stabilire un legame specifico e selettivo fra i substrati mucosi degli epiteli e la membrana esterna della spirocheta. È stato ipotizzato che l'LPS (lipopolisaccaride), il principale fattore virulento dei batteri Gram-negativi, presenti in *T. denticola* delle caratteristiche biologiche differenti, che lo rendono resistente ad alcuni peptidi antimicrobici come le α e β defensine, presenti a livello degli epiteli mucosi (4). Un'ultima importante caratteristica dell'infezione da *T. denticola* è l'associazione batterica evidenziata tra *T. denticola* e altre due specie batteriche: *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus*. È stata ipotizzata la presenza di un sinergismo batterico, per cui il potere patogeno di *T. denticola* è incrementato dalla contemporanea presenza di uno degli altri due batteri (5). Questa associazione batterica denominata *red complex* (6), inizialmente isolata a livello parodontale, negli ultimi anni è stata messa in evidenza nelle patologie endodontiche periapicali.

A partire dagli anni '70 sono state utilizzate come tecniche di isolamento e identificazione dei batteri patogeni endodontali le coltu-

re in anaerobiosi. Tuttavia gli eccessivi costi di tale metodologia e la difficoltà di coltivare batteri estremamente sensibili all'ossigeno hanno impedito spesso di ottenere risultati soddisfacenti. In seguito all'introduzione della tecnica di reazione di polimerizzazione a catena (PCR) da parte di K. Mullis si è potuto disporre di una metodica di identificazione dei patogeni endodontici con aumentata sensibilità (7).

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la presenza di *T. denticola* in corso di patologia periapicale mediante PCR.

## MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati analizzati 33 prelievi microbiologici, ottenuti da 26 pazienti, con età compresa tra i 19 e 68 anni, che erano in cura presso il reparto di Endodonzia del Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche dell'Università di Bologna.

Tutti i casi presi in considerazione erano primi trattamenti endodontici. In 16 elementi dentari è stata diagnosticata una parodontite apicale acuta (PAA), diagnosi basata sulla presenza di dolore localizzato alla percussione; in 17 casi, invece, è stata diagnosticata una parodontite apicale cronica (PAC), con una perdita marcata di osso a livello apicale, con indice periapicale > 3 (8), evidenziabile all'Rx endorale pre-operatoria.

L'elemento dentario interessato al prelievo è stato isolato con diga di gomma (Hygienic, Mahwah, NJ, USA); quindi sono state utilizzate frese sterili, con le quali è stato rimosso il tessuto cariato, o l'eventuale materiale da otturazione già presente. Sono state disinfettate la corona e la cavità d'accesso del dente fino all'imbocco dei canali radicolari, con un pellet di cotone imbevuto di ipoclorito di sodio al 5% (Nicol 5, Ogna, MI, Italia) per 1 minuto. Questa procedura ha permesso di limitare il più possibile il trasporto di batteri all'interno dei canali durante il prelievo, evitando possibili falsi positivi. Prima di effettuare il prelievo microbiologico è stato eseguito un controllo della pervietà con K-File n° 10 sterile; il canale non è stato trattato con irriganti. Non sono stati inclusi nello studio casi in cui la terapia canalare dovesse essere eseguita attraverso restauri protesici, ponti o corone singole, per l'impossibilità di eseguire una sufficiente decontaminazione, che poteva indurre falsi positivi dovuti alla presenza di batteri esterni allo spazio endodontico.

Il prelievo è stato eseguito mediante cono di carta assorbente sterile di diametro "fine" (Mynol, USA), che è stato inserito all'interno del sistema canalare e lasciato per 40 secondi, tempo che consente di assorbire l'eventuale essudato. È importante che almeno 7 mm del cono assorbente vengano impegnati all'interno del canale, in modo che la procedura successiva di laboratorio, mediante PCR, possa avvenire in maniera corretta (2). I coni di carta sono stati disposti all'interno di provette Eppendorf da 500 µl per PCR, contenenti 300 µl di soluzione fisiologica, al fine di conservare il campione in sospensione fluida. Le provette Eppendorf sono state poste immediatamente a -20 °C ed entro poche ore inviate al laboratorio che le ha conservate a -80 °C fino al momento dello studio microbiologico.

Per ogni prelievo effettuato, è stata compilata una scheda di accompagnamento con le opportune informazioni cliniche relative al paziente e all'elemento dentario.

### Estrazione del DNA

Il DNA genomico batterico è stato estratto dai coni di carta in soluzione fisiologica allo 0,9%, utilizzando il QIAmp DNA MiniKit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) secondo le istruzioni del produttore.

Nella reazione di PCR sono stati utilizzati *primer* per 16S rDNA di *T. denticola*: 5'-TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T-3' e 5'-TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTA-3'.

### Preparazione della "mix" di reazione

L'allestimento della "mix" di reazione è avvenuto sotto cappa sterile a flusso laminare.

Prima della fase di amplificazione del DNA, i campioni sono stati preparati utilizzando il *primer* per 16S rDNA in accordo con Saiki e coll. (9). Sono state allestite una serie di provette Eppendorf sistemate in un blocco universale; sono stati aggiunti 9 µl di acqua sterile in ciascuna provetta e 11 µl di "mix" di reazione per ogni campione, composta da cloruro di magnesio (MgCl<sub>2</sub>), il *primer* specifico, la TaqDNA-polimerasi (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), i nucleotidi e il *buffer*. La TaqDNA-polimerasi è una DNA-polimerasi ricombinante ultrapura e termostabile, codificata dal gene modificato di *Thermus aquaticus* ed espresso in *E. coli*. Il *primer* è l'innesco per permettere la duplicazione delle sequenze scelte del DNA. Infine sono stati posti in reazione 10 µl di estratto del DNA. Sono stati allestiti, inoltre, altri due campioni di controllo, uno positivo e uno negativo per *T. denticola*.

I campioni preparati sono stati amplificati mediante un ciclo di reazione così composto:

1. denaturazione iniziale a 95 °C per 2 minuti;
2. denaturazione a 95 °C per 30 secondi;
3. innesco a 60 °C per 1 minuto;
4. estensione a 72 °C per 1 minuto;
5. passaggio finale 72 °C per 2 minuti.

Il ciclo delle reazioni al punto 2, 3 e 4 è stato ripetuto 36 volte.

### Elettroforesi su gel per visualizzare gli amplificati mediante PCR

L'elettroforesi su gel è una tecnica di impiego comune per la separazione in alta risoluzione delle proteine e degli acidi nucleici. Il frammento di DNA specificamente ottenuto è del peso molecolare equivalente a 316 bp (5) (Fig. 1).

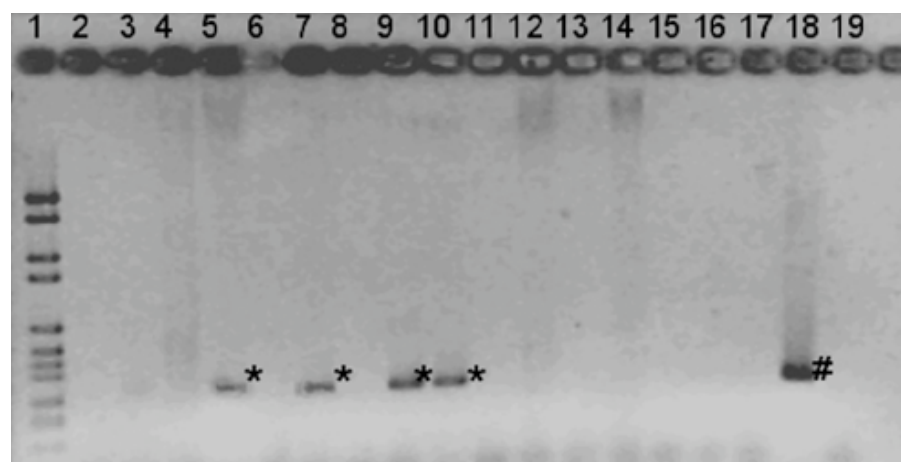


Fig. 1 - Immagine UV di un gel elettroforico agarosio 2% realizzato nel corso del presente studio. Si possono osservare, nei pozzetti 5, 7, 9 e 10, le bande positive per *T. denticola*, e nel pozzetto 18 la banda # per il controllo positivo, il peso molecolare degli amplificati e di 316 bp come evidenziato dal marker del pozzetto 1.

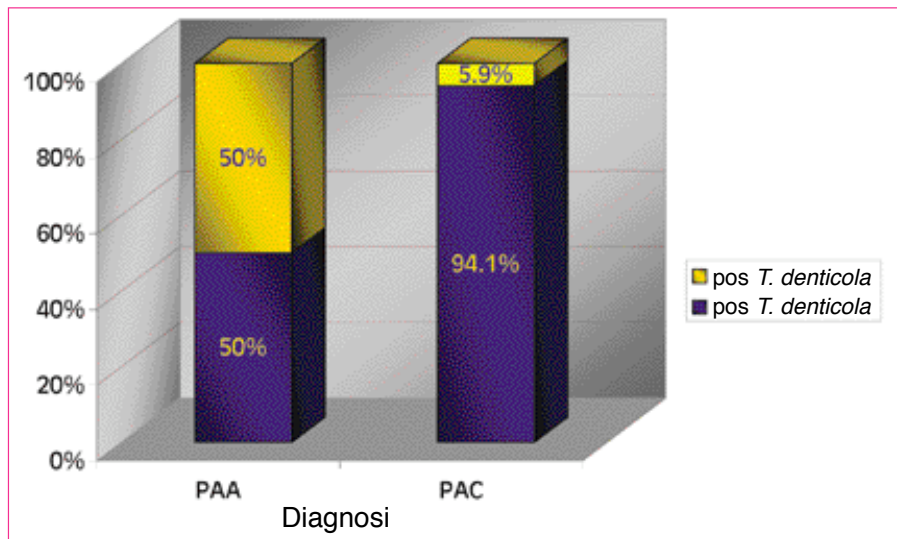


Fig. 2 - Il 50% (n=8) dei prelievi eseguiti in elementi dentari con diagnosi di parodontite apicale acuta (PAA) sono risultati positivi per *T. denticola*, mentre nel gruppo con diagnosi di parodontite apicale cronica (PAC) i campioni positivi erano il 5.9% (n=1).

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante test del chi-quadrato, per verificare la significatività statistica: in particolare si è impiegato il test di Fischer, valido per un numero di osservazioni superiori a 30, ma con valore atteso inferiore a 5 per almeno una delle categorie.

## RISULTATI

Tra i 33 prelievi microbiologici effettuati, 9 campioni (27.3 %) sono risultati positivi per *T. denticola*. In particolare, occorre segnalare che uno dei 9 casi positivi per *T. denticola* risultava asintomatico (11.1%) ed era diagnosticato come PAC, mentre i restanti 8 presentavano dolore alla percussione e segni clinici di parodontite apicale acuta PAA (88.9%) (Fig. 2).

Il test del chi-quadrato ha dimostrato, inoltre, come la percentuale di campioni positivi a *T. denticola* nel gruppo con diagnosi di PAA (n=8; 50%) sia statisticamente differente ( $p<0.05$ ) dalla percentuale di campioni positivi nel gruppo con PAC (n=1; 5.9%)

## DISCUSSIONE

Il presente studio ha confermato innanzitutto come l'amplificazione del DNA mediante la reazione di polimerizzazione a catena (PCR), partendo da una sequenza nucleotidica ribosomiale, sia un metodo specifico, con un'alta sensibilità, utilizzabile per l'individuazione di microrganismi. A partire dalla metà degli anni '80, quando K. Mullis introdusse tale metodologia, le ricerche hanno evidenziato la sua specificità particolarmente elevata per alcuni batteri, tra i quali *T. denticola*, soprattutto a livello parodontale (10, 11). Le conoscenze apprese nel campo della microbiologia endodontica sono sicuramente inferiori; proprio per questo motivo tale campo è attualmente oggetto di molti studi. Non solo, ma attraverso la PCR si è riusciti a superare la difficoltà o l'impossibilità di identificare attraverso tecniche colturali molte specie batteriche con metabolismo anaerobio obbligato.

Uno dei problemi messi in evidenza anche dalla letteratura è la contaminazione durante il prelievo microbiologico del campo operatorio da parte di batteri presenti nel paro-

donto. I diversi studi pubblicati dimostrano come non ci sia un consenso generale sui protocolli di decontaminazione utilizzati (12, 13). Tuttavia, l'isolamento del campo operatorio con la diga e l'utilizzo di disinfettanti ad ampia azione battericida (come l'ipoclorito di sodio) riducono sensibilmente il rischio di contaminazione.

Questo studio ha confermato come i batteri giochino un ruolo primario nell'eziologia delle patologie endodontico-periapicali. In particolare *T. denticola* si è rivelato presente nelle patologie periapicali acute caratterizzate da dolore alla percussione, in accordo con gli studi di Rôças e coll. (6). Come abbiamo visto dai risultati, il 50% dei casi di PAA sono risultati positivi per la presenza di *T. denticola*. In letteratura studi condotti con la stessa metodologia (6,14) hanno riportato percentuali similari.

I risultati evidenziano che potrebbe esserci una correlazione tra la presenza di *T. denticola* e la manifestazione acuta a livello endodontico; tuttavia, viste le percentuali e il limitato numero di campioni analizzati, questa associazione è solo ipotizzabile. I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono comunque il ruolo primario che ricopre tale microrganismo nella patogenesi delle lesioni periapicali in fase acuta e con sintomatologia presente. Tale batterio, invece, si rivela scarsamente presente nei casi asintomatici di parodontite apicale cronica con lesione periapicale confermata radiograficamente.

Lo studio ha dimostrato, quindi, che lesioni apico-periapicali in fase acuta si correlano frequentemente con la presenza di *T. denticola*. Tale microrganismo si è dimostrato estremamente virulento e in grado di indurre necrosi cellulare e apoptosi (15), e sembra coinvolto nella formazione di danni vascolari su lesioni aterosclerotiche (16). Per tale motivo futuri studi dovranno valutare le potenzialità di *T. denticola* nell'indurre danni ossei locali, a livello periapicale, e danni sistemici di tipo vascolare. Deve essere inoltre sottolineata l'importanza della rimozione di *T. denticola* dal sistema di canali laterali e dai tubuli dentinali in quanto possibili luoghi di colonizzazione e crescita batterica. Le tecniche di strumentazione e soprattutto d'irrigazione si dovranno rivelare efficaci nel rimuovere completamente tale microrganismo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Landini MP. Microbiologia Odontoiatrica. So - cietà editrice Esculapio 1992: 211.
2. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Favieri A, Santos KRN. Detection of *Treponema denticola* in endodontic infections by 16S rRNA gene directed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 335-337.
3. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod* 2003; 29(12):794-7.
4. Schultz CP, Wolf V, Lange R, Mertens E, Wecke J, Naumann D, Zahring U. Evidence of a new type of outer membrane lipid in oral spirochete *Treponema denticola*. Functioning permeation barrier without lipopolysaccharides. *J. Biol Chem* 1998; 273: 15661-6.
5. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumat* 1990; 6: 142-149.
6. Rôças IN, Siqueira Jr JF, Santos KRN, Coelho AMA. "Red Complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91:468-471.
7. Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Ame* 1990; 262: 36-43.
8. Ørstavik D, Kerekes K, Eriksen HM. The periapical index: a scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1986; 2: 20-34.
9. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.
10. Slots J, Ashimoto A, Flynn MJ, Li G, Chen C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 304-307 (suppl 2).
11. Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11: 266-273.
12. Debelian GF, Olsen I, Tronstad L. Profiling of *Propionibacterium acnes* recovered from root canal and blood during and after endodontic treatment. *Endod Dent Traumat* 1992; 8: 248-254.
13. Conrads G, Gharbia SE, Gulabivala K, Lampert E, Shah H. The use of 16S rDNA PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *J Endod* 1997; 23: 433-438.
14. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Favieri A, Oliveira JCM, Santos KRN. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. *Int Endod J* 2001; 34: 280-284.
15. Leung WK, Wu Q, Hannam PM, Mc Bride BC, Uitto VJ. *Treponema denticola* may stimulate both epithelial proliferation and apoptosis through MAP kinase signal pathways. *J Periodontol Res* 2002; 37(6): 445-455.
16. Okuda K, Ishihara K, Nakagawa T, Hirayama A, Inayama Y, Okuda K. Detection of *Treponema denticola* in atherosclerotic lesions. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1114-1117.