



CARATTERIZZAZIONE SIEROTIPICA DI *AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS* E IDENTIFICAZIONE DELL'OPERONE CDT IN PAZIENTI SPAGNOLI

Characterization of Serotypes and Identification of the Cytolethal Distending Toxin (CDT) Operon in Spanish Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Vignoletti F, Leon R, Pousa X, Herrera D, Sanz M.

Graduate Program in Periodontology, Facoltà di Odontoiatria, Univesità Complutense di Madrid (U.C.M.), Spagna - Graduate Program in Periodontology, Dental School, Complutense University of Madrid (U.C.M.)

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "H.M. GOLDMAN" / PROCEEDINGS BOOK RESEARCH SESSION "HENRY M. GOLDMAN" PRIZE - 2007

RIASSUNTO

Il lavoro è uno studio sulle caratteristiche genetiche di *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. L'obiettivo specifico è la differenziazione sierotipica del microrganismo e identificare la presenza/assenza dell'operone CDT in campioni di placca subgingivale di pazienti spagnoli. I risultati riportano la presenza di tre sierotipi, *a*, *b* e *c* e l'identificazione dell'operone CDT.

SUMMARY

This research is an ongoing study on the genetic characteristics of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The specific objective is to study the periodontal pathogen different serotypes and the presence/absence of the CDT operon in clinical samples from Spanish patients. The results report the identification of serotypes *a*, *b* and *c* as well as the CDT operon.

INTRODUZIONE

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*) fu descritto per la prima volta in letteratura da Klinger nel 1912. Nel 1975 si identifica in placca dentale¹.

M. Newman e S. Socransky² negli Stati Uniti e J. Slots³ in Europa, associano questo patogeno alla parodontite giovanile localizzata nel 1976.

Da allora, *A. actinomycetemcomitans* ha ispirato molte linee di ricerca di base e innumerevoli studi clinici e microbiologici hanno confermato il concetto che questo microorganismo sia coinvolto nella patogenesi della Malattia Parodontale.

Nel 1996, nel World Workshop di Parodontologia⁴ si conclude che tre periodontopatogeni, *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* dimostrano un alto livello di associazione con la etiologia della parodontite.

Recentemente, *A. actinomycetemcomitans* è stato associato con la patogenesi di malattie cardiovascolari. Haraszthy et al.⁵ sono stati i primi a identificare DNA di *A. actinomycetemcomitans* in placche di ateroma, apportando evidenza scientifica che giustifica una possibile relazione tra malattia parodontale e malattie cardiovascolari.

Diversi Autori hanno osservato l'alto grado di polimorfismo di *A. actinomycetemcomitans*; si sono differenziati 6 sierotipi associati a 3 diversi geni⁶. Alcuni di questi sierotipi si sono associati a differenti condizioni razziali o geografiche così come a diversi stati di malattia o di salute.

A. actinomycetemcomitans inoltre possiede, così come altri batteri gram-, alcuni fattori di virulenza come la leucotossinaA (LtxA) che è attiva su cellule linfoidi e mieloidi. Negli ultimi anni, ha destato particolare interesse un'altra tossina chiamata Cytolethal Distending Toxin (CDT). CDT è capace di interrompere il crecimiento cellulare nella fase G2, costringendo la cellula all'apoptosi. I target di questa tossina sono cellule del sistema immunitario, fibroblasti e cellule epiteliali. La regione genomica o operone che codifica la tossina CDT, una porzione di DNA composta da tre geni (*cdtA*, *cdtB* e *cdtC*), ha suscitato particolare interesse per essere altamente polimorfica. La prevalenza di questi geni in Europa, Asia e Cile, è dell'86%, 89%⁷ and 68%⁸, rispettivamente.

Studi clinici e microbiologici hanno riportato differenze geografiche, in termini di prevalenza e resistenza antibiotica, al comparare campioni di placca subgingivale di pazienti spagnoli e olandesi. È risultata una maggior prevalenza di *A. actinomycetemcomitans* (23.3% vs. 3.2%) nel campione di pazienti olandesi⁹.

Non esistono studi che caratterizzano *A. actinomycetemcomitans* da un punto di vista genetico. Con questo obiettivo abbiamo iniziato uno studio nel nostro laboratorio con lo scopo principale di descrivere la differenziazione sierotipica di *A. actinomycetemcomitans* e come scopo secondario verificare la presenza/assenza dell'operone CDT.

L'obiettivo di questa presentazione è riportare i risultati preliminari relativi alla differenziazione sierotipica e all'identificazione dell'operone CDT in ceppi di *A. actinomycetemcomitans* di pazienti spagnoli.

Ipotesi: esistono ceppi di *A. actinomycetemcomitans* di pazienti spagnoli con malattia parodontale che presentano una caratterizzazione sierotipica diversa e che possiedono o no i geni che compongono l'operone CDT.

MATERIALI E METODI

I. Selezione del campione da analizzare

Si selezionano campioni di *A. actinomycetemcomitans* provenienti dalla banca di ceppi

batterici del laboratorio di Microbiologia della Facoltà di Odontoiatria dell'Università Complutense di Madrid. I ceppi di A.a. isolati, appartengono a pazienti della Specialità di Parodontologia della stessa Facoltà che rientravano nei seguenti criteri di inclusione:

- diagnosi di Parodontite cronica o aggressiva,
- non aver ricevuto trattamento parodontale previo,
- non presentare malattie sistemiche,
- non aver ricevuto terapia antibiotica negli ultimi sei mesi.

Selezione dei pazienti

Esame parodontale

Si realizza un esame parodontale clinico completo, comprensivo di profondità di sondaggio, recessione, livello di attacco clinico, mobilità, indice di placca, indice gengivale e sanguinamento al sondaggio.

Esame microbiologico: prelievo del campione

Selezione del sito:

si preleva un campione di placca sottogengivale in 4 siti per paziente, scegliendo la localizzazione con maggiore profondità di tasca e sanguinamento al sondaggio in ciascun quadrante.

Tecnica di prelievo:

dopo aver asciugato e isolato accuratamente l'area sopragengivale con un rullo di cotone, si prelevarono campioni di placca subgingivale inserendo due coni di carta sterili N° 30 per localizzazione durante 15 secondi ciascuno. I campioni si collocano in una provetta contenente 2 ml di mezzo di trasporto RTF per essere poi analizzati nel Laboratorio di Microbiologia della Facoltà di Odontoiatria della Università Complutense di Madrid.

II. Analisi microbiologico dei campioni di placca subgingivale

I campioni di placca sottogengivale si coltivano in ambiente Dentaid-1 e dopo 10 giorni di incubazione anaerobia, si realizza la diagnosi di *A. actinomycetemcomitans* in base alla morfologia tipica della colonia e alla reazione della catalasa. Una volta realizzata la diagnosi, le colonie si archiviano nella banca di ceppi batterici del laboratorio a -80°C.

III. Estrazione del DNA genomico

Brevemente si raccolgono cellule previamente cresciute in ambiente Dentaid-1. Si risospendono in una soluzione di 0.3 ml di Tris-HCl 10mM, EDTA 1,0mM (pH 8,0) e lisozima 5 mg/ml. Si lisano le cellule aggiungendo 30 µl of 10% di dodecilsolfato di sodio. Posteriormente si aggiunge la proteinasa K (1,0 mg/ml) e si incubano i tubi a 37 °C per 4 ore. Si realizza una serie di lavaggi consecutivi con una miscela di Fenol: Cloroformio: alcohol isoamílico (25:24:1) e di cloroformio: isoamyl alcohol (24:1), si precipita il DNA, aggregando 2 volumi di etanolo assoluto freddo. Si risospende in un tampone TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1,0mM pH 8,0) con RNAsa.

IV. Analisi del DNA genómico

Per valutare la quantità e la qualità del DNA estratto si realizza un'elettroforesi in gel di agarosa al 0.8 % in un tampone TAE 1X con bromuro di etidio a concentrazione 0.5 ug/ml.

La dimensione delle bande ottenute si compara con lo standard di peso molecolare che corrisponde al DNA genómico del batteriofago lambda (λ /HindIII). I risultati dell'estrazione si visualizzano e fotografano sotto un transilluminatore a raggi UV.

V. Amplificazione del DNA genómico

Per determinare i sierotipi di A.a. si utilizzano i primers descritti previamente da Kaplan et al¹⁰. Per amplificare i geni che codificano la proteina CDT si usano primers disegnati mediante il software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), basandosi nella sequenza dell'operone *cdt* (numero di accesso AF102554) ottenuta a partire dalla base di dati del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Caratteristiche della PCR

Master mix

Si prepara il master mix in un volume di 25 μ l composto di tampone PCR 1X, 2,0 mM di $MgCl_2$, 0,2 mM di dNTP e 0,5 unità di *Taq* polimerasa, al quale si aggregano 10 nanogrammi di DNA e 1mM di primer.

Caratteristiche dell'amplificazione

La reazione in catena della polimerasa si realizza in tubi eppendorf da 0,2 ml in una termociclatrice Eppendorf con i seguenti parametri. Un ciclo a 96°C per 3 min. Posteriormente una serie di 35 cicli ciascuno di: 95°C durante 30 secondi, per denaturare la doppia elica di DNA, 55°C durante 30 secondi per l'allineamento e 72°C durante 3 minuti per iniziare l'amplificazione del DNA.

Analisi dei prodotti della PCR

Si realizza un'elettroforesi in gel di agarosa al 2% in un tampone TAE (TRIS-acido acetico-EDTA) 1X con bromuro di etidio a concentrazione 0.5 μ g/ml.

Si prelevano 15 μ l dei prodotti della PCR e si aggregano 2 μ l di tampone GLD. Si compara la dimensione dei frammenti di DNA con una scala standard di peso molecolare di 100 bp (Invitrogen, Lifetechnology).

RISULTATI

Il lavoro riporta i risultati relativi alla differenziazione sierotipica e all'identificazione dell'operone CDT in ceppi di *A. actinomycetemcomitans* di 12 pazienti spagnoli (Tabella 1). L'analisi con PCR dimostra la presenza di 6 sierotipi *a*, 2 sierotipi *b* e 7 sierotipi *c*. Si è osservata coinfezione con due sierotipi (*a* e *c*) in tre pazienti.

Si è identificato inoltre l'operone CDT che codifica la Cytolethal Distending toxin in tutti i ceppi analizzati.

Tabella 1: Risultati dell'analisi con PCR relativi alla differenziazione sierotipica e l'identificazione dell'operone CDT. In rosso i tre pazienti con coinfezione con sierotipi *a* e *c*

Patients	Serotype <i>a</i>	Serotype <i>b</i>	Serotyp <i>c</i>	Serotype <i>d</i>	Serotype <i>e</i>	Serotype <i>f</i>	CDT operon
F215(2)	+	-		-	-	-	+
M529(2)	-	-	+	-	-	-	+
F210(2)	+	-		-	-	-	+
M531(1)	+	-		-	-	-	+
A637	+	-	+	-	-	-	+
1210	-	-	+	-	-	-	+
M529(1)	-	-	+	-	-	-	+
M541(1)	-	+		-	-	-	+
513(2)	-		+	-	-	-	+
AZ30	-	+		-	-	-	+
531(2)	+	-	+	-	-	-	+
F215	+	-	+	-	-	-	+

DISCUSSIONE

I dati preliminari di questo studio confermano l'alto grado di variabilità genetica riportata in letteratura. Abbiamo osservato la presenza di tre sierotipi *a*, *b* e *c*, essendo maggiore la prevalenza dei sierotipi *a* e *c*. È importante sottolineare che abbiamo trovato coinfezione con due sierotipi diversi (*a* e *c*) in tre pazienti. Questo è un dato rilevante, raramente riscontrato in letteratura.

Abbiamo riscontrato l'operone CDT in tutti i pazienti. La prevalenza di questa regione genomica in Europa, Asia e Chile è del 86%, 89%⁷ e 68%⁸ rispettivamente. Un confronto con questi risultati è prematuro, per il numero limitato di pazienti, però possiamo anticipare una diversa prevalenza dell'operone CDT in Spagna.

Questo studio rappresenta il primo lavoro che realizza una caratterizzazione genetica di *A.a.* in pazienti spagnoli con malattia parodontale. È implicita la necessità di ampliare il numero di pazienti e poter correlare i risultati di variabilità genetica con diversi stati di malattia o salute.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Newman MG, Socransky SS, Savitt ED, Propas DA, Crawford A. Studies of the microbiology of periodontitis. *J Periodontol* 1976; 47: 373-379.
3. Slots J. The predominant cultivable organism in juvenile periodontitis. *Scand J Dent Res* 1976; 84: 1-10.

4. Proceedings of the 1996 World Workshop in Periodontics. Lansdowne, Virginia, July 13-17, 1996.
5. Haraszthy, V.I., et al. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*, 2000. 71(10): p. 1554-60.
6. Gmur R, McNabb H, van Steenberg TJ, Baehni P, Mombelli A, van Winkelhoff AJ, Guggenheim B. Seroclassification of hitherto nontypeable *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains: evidence for a new serotype e. *Oral Microbiol Immunol*, 1993 Apr; 8(2): 116-20.
7. Fabris A.S, DiRienzo J.M, Wikstrom M, Mayer M.P.A. Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolates from geographically diverse populations. *Oral Microbiol Immunol*, 2002, 17: 231-238.
8. Leon. R. Oral Communication. *Europerio 5*. Madrid, Spain. June, 2006.
9. Sanz M, Van Winkelhoff AJ, Herrera D, Dellempjn-Kippuw N, Simón R, & Winkel E. Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and Netherlands. *European Journal of Oral Sciences*, 2000, 108, 383-392.
10. 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 Sep; 69 (9): 5375-5384.