



## Relazione fra batteri parodontopatogeni e variabili cliniche parodontali. Analisi esplorativa dei dati clinici e microbiologici in un campione di pazienti italiani

D. Franceschi<sup>1</sup>, F. Cairo<sup>1</sup>, M. Nieri<sup>1</sup>,  
E. Capanni<sup>2</sup>, A. Pini<sup>2</sup>, N. Magnani<sup>2</sup>, J. Hamrilova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Assegnista di Ricerca, Cattedra di Parodontologia, Università di Firenze;

<sup>2</sup>Igienista dentale, libero professionista, Firenze

ATTI DELLA SESSIONE DI RICERCA PREMIO "HENRY M. GOLDMAN" - 2006

### INTRODUZIONE

Negli ultimi anni diversi studi hanno dimostrato come la parodontite sia una malattia a carattere multifattoriale, e come alla sua base ci sia un'alterazione dell'equilibrio tra la risposta dell'ospite e alcuni batteri gram negativi anaerobi (Socransky & Haffajee 1992). Un Consensus report dell' American Academy of Periodontology ha definito le specie *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* come le più importanti fra quelle parodontopatogene (AAP 1996).

Alcuni studi clinici ed epidemiologici hanno evidenziato come la flora patogena possa variare in differenti popolazioni di paesi industrializzati (Colombo e coll. 2002). Lo scopo di questo studio è stato quello di 1) valutare la distribuzione dei batteri parodontopatogeni in una popolazione italiana; 2) analizzare le possibili associazioni causali fra la composizione della microflora sub-gengivale con i parametri clinici parodontali utilizzando un nuovo approccio statistico: le Reti Bayesiane.

### MATERIALI E METODI

Durante un periodo di 18 mesi, pazienti affetti da parodontite sono stati selezionati consecutivamente in uno studio privato di parodontologia. I pazienti erano considerati affetti da parodontite se presentavano almeno due tasche  $\Delta$  5mm, su denti diversi. Sono stati esclusi dallo studio pazienti che erano stati sottoposti a terapia antibiotica e trattamenti parodontali nei 6 mesi precedenti. Per ogni paziente incluso nello studio sono stati raccolti in una cartella computerizzata i dati anamnestici, i parametri parodontali [profondità del sondag-

gio (PD), livello di attacco clinico (CAL), full mouth plaque score (FMPS) e full mouth bleeding score (FMBS), forcazioni (furc), mobilità dentale (Mob) e malposizione dentale]. Sono state inoltre eseguite le radiografie.

L'analisi microbiologica delle specie parodontopatogene è stata effettuata prelevando un campione di placca sub-gengivale dalla tasca più profonda di ogni paziente, inserendo e mantenendo *in situ* per 10 secondi un cono di carta sterile, dopo aver eliminato la placca sopragengivale. Il cono è stato poi inserito in una provetta individuale, inviata poi al laboratorio per l'analisi (LabOral Diagnostics, Houten-Nedeerland).

### Procedure di laboratorio

L'obiettivo dell'analisi microbiologica era valutare la presenza di DNA batterico riconducibile alle seguenti specie: *A. actinomycescomitans* (Aa), *P. gingivalis* (Pg), *P. intermedia*(Pi), *B. forthythus* (Bf), *P. micros* (Pm), *F. nucleatum* (Fn). È stata applicata una PCR standard di tipo multicomplex; i prodotti di amplificazione sono stati individuati tramite una ibridizzazione inversa utilizzando un processore "Personal-LAB ELISA" (Adaltis, Freiburg,Germany). Il disegno dei primer era basato su sequenze geniche specifiche per Pg and Aa. Per le altre specie batteriche il primer era disegnato sulla sub-unità ribosomiale 16S. I primers sono stati marcati con biotina. Le condizioni della reazione PCR erano: 1) iniziale denaturazione (95°C / 5 min); 2) 35 cicli di denaturazione (95°C / 25 sec); 3) reazione di anellamento (60°C / 25sec); 4) reazione di elongazione (72°C / 20 sec); 5) elongazione finale (72°C / 3 min). I prodotti di amplificazione sono stati denaturati (95°C / 5 min) e ibridizzati (30 min / 37°C), utilizzando sonde specifiche su una superficie di polistirene e successivamente visualizzati e fotografati sotto un transilluminatore UV. La sensibilità della reazione di PCR era di circa 3 genomi batterici.

### Analisi statistica

È stata effettuata una statistica descrittiva (media e deviazione standard). La statistica inferenziale è stata realizzata con l'applicazione delle reti bayesiane (structural learning of Bayesian Networks) usando l'algoritmo B (BN Power Constructor - soglia 1). Per questo studio le variabili sono state così ordinate: 1) sesso, età; 2) fumo, malattie sistemiche; 3) mobilità dentale, denti mancanti, tipo di denti (superiori, inferiori, molari), rapporto corona-radice, malposizioni, siti interprossimali, recessioni gengivali), *sito* (profondità di sondaggio, sanguinamento al sondaggio, indice di placca, *A. actinomycescomitans* (Aa), *P. gingivalis* (Pg), *P. intermedia*(Pi), *B. forthythus* (Bf), *P. micros* (Pm), *F. nucleatum* (Fn). Nell'ordine di presentazione le variabili successive non potevano influenzare le precedenti.

## RISULTATI

102 pazienti sono stati inclusi nello studio. Tutti i pazienti sono stati classificati clinicamente come affetti da parodontite moderata o grave.

*Statistica descrittiva:* dei 102 pazienti 71 erano femmine (70%) e 31 maschi (30%). L'età media era 48.48 anni  $\pm$  9.64. 38 pazienti erano fumatori. La profondità di sondaggio media dei siti esaminati era 7.79mm  $\pm$  2.24. Le specie batteriche più rappresentate erano *P. gingivalis* (69%) e il *B. foisthytus* (69%) e *F. nucleatum* (86%). I risultati della statistica descrittiva sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

*Statistica bayesiana:* Il risultati ottenuti dall'algoritmo B sono mostrati nella Fig. 1.

- Il sesso è risultato essere in relazione con il sito del campione microbiologico: le tasche più profonde erano presenti in donne negli spazi interprossimali.
- I molari hanno mostrato sondaggi più profondi. I siti sui molari sono correlati con la presenza di *A. actinimicetemcomitans*, di *F. nucleatum*, con le malattie sistemiche e con il numero dei denti mancanti.
- La presenza di *A. actinimicetemcomitans* non è direttamente correlata con il numero dei denti mancanti.
- L'aumento della profondità al sondaggio è direttamente associata alla presenza di *P. gingivalis*.
- Il sanguinamento al sondaggio è associato alla presenza di *B. foisthytus*.
- La presenza di *B. foisthytus* è correlata alla presenza di *P. gingivalis*, *P. micros* and *P. intermedia*.
- Il fumo è inversamente correlato alla presenza di *P. gingivalis*.

## DISCUSSIONE

Gli obiettivi del presente studio erano quelli di 1) valutare la distribuzione dei patogeni parodontali in un campione di pazienti italiani e 2) analizzare le possibili relazioni causali fra la flora batterica e i parametri clinici parodontali.

**Il profilo microbiologico** di un gruppo di pazienti italiani affetti da parodontite è paragonabile a quello riportato in altri studi in popolazioni di paesi industrializzati (Colombo e coll. 2002). I campioni di placca sub-gengivale contenevano infatti specie come il *P. gingivalis* (69%) e il *B. foisthytus* (69%) e *F. nucleatum* (86%) classificate come patogeni parodontali. La specie *A. actinomycescomitans* è risultata la specie meno frequente (12%).

L'applicazione delle reti Bayesiane è un nuovo mezzo statistico che permette di mettere in luce, al contrario della statistica convenzionale, la possibile causalità delle relazioni esistenti fra le variabili. La sua applicazione potrebbe essere molto utile in argomenti di ricerca la cui complessità è dovuta alla contemporanea presenza di numerosi fattori. La possibile causalità viene messa in luce

nel grafo (Fig. 1) da frecce dirette verso la variabile che viene condizionata dalla presunta causa.

Quest'analisi esplorativa conferma inoltre che la distribuzione dei patogeni non è *random* ma segue una precisa organizzazione ecologica. Il *B. forsythus* nel grafo è al centro di una complessa associazione poli-microbica con *P. intermedia*, *P. micros*, *P. gingivalis*. Questo risultato è in accordo con studi classici che hanno dimostrato con tecniche diagnostiche diverse (ibridizzazione a DNA) che *Pi* e *Pm* sono parte del cosiddetto complesso arancione e *Bf* e *Pg* appartengono invece al complesso rosso.

In questo studio il grafo ha evidenziato diverse relazioni fra i batteri e le variabili cliniche. Le frecce si dirigono dalle variabili cliniche verso i batteri. Per esempio la presenza di *Pg* aumenta all'aumentare della profondità della tasca. Questo potrebbe significare che non sia la presenza di *Pg* a determinare tasche più profonde, ma che probabilmente il *Pg* si trovi più facilmente nelle tasche più profonde. Similmente il *Bf* si associa al sanguinamento al sondaggio, però non sembra causarlo.

La statistica bayesiana evidenzia inoltre una relazione inversa tra il fumo e la presenza di *P. gingivalis*: all'aumentare del fumo si riduce la presenza di *Pg*. Questo risultato differisce da quelli di alcuni studi che riportano invece come il fumo si associ all'aumento di specie batteriche come *B. forsythus*, *P. micros* e il *F. nucleatum* (van Winkeloff e coll. 2001).

In conclusione i risultati di questo studio dimostrano che:

- 1) la distribuzione della flora batterica di un gruppo di pazienti italiani è simile a quelle di pazienti affetti da malattie parodontali di altri paesi.
- 2) La statistica bayesiana conferma alcuni postulati classici ed evidenzia aspetti nuovi fra parametri clinici e microbiologici.

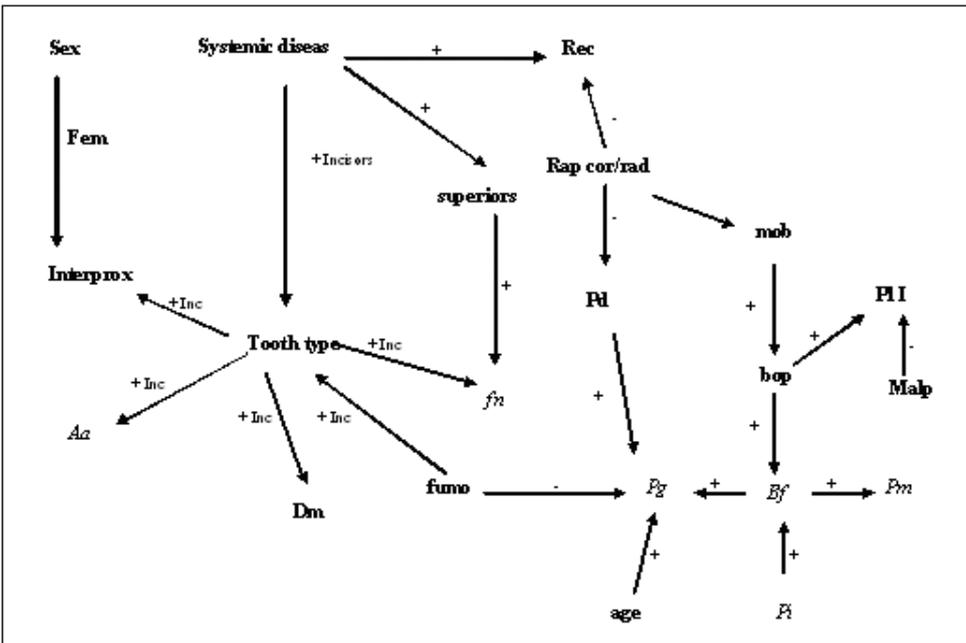
Tabella 1 - Statistica descrittiva dei 102 pazienti analizzati nello studio

Variabile	Mediana	Dev. St.
Età	48.48	9.64
FMPS	15.19%	13.14
FMBS	28.33%	17.47
Percentuale siti con PD >4mm	28.42%	17.08
Media denti mancanti	5.81	4.18
PD medio (sito in esame)	7.79	2.24

Tabella 2 - Presenza in percentuale delle specie parodontopatogene nei siti analizzati

Aa	12%
Pg	69%
Pi	36%
Bf	69%
Pm	48%
Fn	86%

FIGURA 1 - grafo espresso dall' algoritmo B



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Consensus report for periodontal diseases pathogenesis and microbial factors. *Annal Periodontol* 1996; 1: 926-932.
- 2) Colombo A, Teles P, Torres M et al. *J Periodontol* 2002; 73: 360-369.
- 3) Socransky S. & Haffajee, A. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63: 322-331.
- 4) Socransky S, Haffajee A, Cugini M, Smith C, Kent jr RL (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.
- 5) Van Winkeloff A, Bosh-Tijhof C, Winkel E, Van der Reijden W. Smoking affects the subgingival microflora in periodontitis. *J Periodontol* 2002; 72: 666-671.