

DISTRIBUZIONE DI SEI MICRORGANISMI PARODONTO-PATOGENI TRA PAZIENTI ITALIANI ED OLANDESI AFFETTI DA PARODONTITE CRONICA

F. Angelini*, M. Montevecchi*, V. Checchi**, J. den Drijver***, G. Bercovich***, M.R. Gatto*, L. Checchi*

* Reparto di Parodontologia ed Implantologia, DIBINEM, Università degli Studi di Bologna
 ** Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e della Salute, Università degli Studi di Trieste
 *** Libero professionista in Amsterdam (Olanda)

Introduzione

Le malattie parodontali sono la manifestazione patologica della risposta dell'ospite, attivata nei confronti dello stimolo batterico esercitato dal Biofilm dentale a livello dell'interfaccia dento/gengivale¹. Molteplici microrganismi costituiscono il biofilm dentale ma di questi solo alcuni batteri Gram negativi sono direttamente coinvolti nell'eziologia della malattia parodontale². I microrganismi subgengivali correlati alla malattia parodontale sembrano differire significativamente tra localizzazioni geografiche³⁻⁶.

L'obiettivo di questa ricerca è quello di confrontare la prevalenza e la carica microbica di sei principali specie batteriche parodonto-patogene tra pazienti italiani ed olandesi affetti da parodontite cronica.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati e confrontati dati ottenuti da campioni di placca subgengivale prelevata da 352 pazienti italiani e 115 olandesi.

Durante la visita iniziale sono state eseguite radiografie endorali e registrati i seguenti dati: sanguinamento al sondaggio (BOP), suppurazione (pus), profondità di sondaggio (PPD), livello di attacco clinico (CAL), età, sesso ed abitudine al fumo. La presenza e la carica batterica delle specie patogene è stata determinata seguendo un identico protocollo microbiologico mediante real-time Polymerase Chain Reaction.

Criteri di inclusione. Diagnosi di parodontite cronica (Armitage 1999)⁷; presenza di almeno 12 denti (eccetto i terzi molari); età ≥ 20 anni; assenza di trattamenti parodontali nei 6 mesi precedenti allo studio; assenza di patologie sistemiche (quali diabete, artrite, colite ulcerativa, morbo di Crohn, infezioni da HIV, tumori e patologie cardiache); assenza di terapia antibiotica (nei 6 mesi precedenti) e/o assunzione di farmaci anti-infiammatori nel mese precedente al prelievo microbiologico; assenza di gravidanza in atto. Le caratteristiche cliniche e demografiche dei soggetti idonei allo studio sono espresse in *Tabella 1*.

Prelievo microbiologico. La raccolta dati per il campione italiano è avvenuta presso il Reparto di Parodontologia ed Implantologia, Clinica Odontoiatrica - DIBINEM (Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna). I dati utilizzati sono relativi a pazienti che durante il periodo 2006-2007 hanno consecutivamente frequentato il Reparto.

La raccolta dati per il campione olandese è avvenuta all'interno del centro terapeutico privato Tandheekkundig Centrum Ijburg - TCI di Amsterdam (Paesi Bassi). I dati sono relativi a pazienti che durante il periodo 2010-2012 hanno consecutivamente frequentato il Centro terapeutico. I campioni di placca subgengivale sono sempre stati prelevati prima della terapia iniziale ed è stato evitato ogni uso di collutorio o agente disinfettante orale per almeno 10 ore prima del prelievo.

Sono stati selezionati quattro denti parodontalmente compromessi per il prelievo di placca subgengivale, uno per ogni quadrante, tra gli elementi con profondità di tasca maggiore. Prima del prelievo microbiologico, i siti selezionati sono stati isolati con rulli di cotone e asciugati delicatamente con aria. La placca sopragengivale è stata rimossa con una curette di Gracey. Per ogni sito selezionato è stato inserito un cono di carta sterile fino al fondo della tasca e quindi rimosso dopo 10 secondi. Successivamente al prelievo, tutti i coni di carta ottenuti per ogni paziente sono stati inseriti all'interno di una provetta sterile e successivamente inviati ai laboratori di microbiologia per le successive analisi microbiologiche.

Analisi microbiologica. Il DNA genomico dei batteri considerati è stato isolato e purificato (AGOWA® mag DNA Isolation Kit Sputum, AGOWA GmbH, Berlin, Germany). I primer e le sonde genetiche sono state disegnate per abbinarsi in maniera specifica al DNA ribosomiale (rDNA) dei sei batteri patogeni: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. I campioni sono stati inoltre ibridizzati ad una sonda batterica universale. Gli specifici primers e le sequenze delle sonde genetiche sono state selezionate con il software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA; USA) il quale controlla che i primer e le sonde genetiche si abbinino correttamente, in accordo alle linee guida raccomandate per la real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) con sonde TaqMan. La real-time PCR è stata eseguita con un campione di 2 ml di DNA isolato in un mix di reazione contenente gli appropriati modelli di primers e sonde genetiche e la TaqMan Universal PCR Mastermix. La reazione di PCR è stata eseguita con un termociclatore ABI 7900 HT real-time PCR cyclor (Applied Biosystems®, Life Technologies, Glasgow, United Kingdom) e tutte le procedure sono state portate a termine evitando qualsiasi contaminazione dei campioni batterici, seguendo le linee guida e le raccomandazioni delle case produttrici.

Analisi statistica. Nel calcolo della dimensione campionaria si è utilizzata come variabile guida la prevalenza del microrganismo meno frequente: *A. actinomycetemcomitans*. Sulla base di un livello α di 0.05 ed una precisione del 2%, usando come stima della prevalenza di *A. actinomycetemcomitans* un valore del 6% (rilevato da Slots et al.⁹ su di un campione di popolazione svedese, con caratteristiche simili alla popolazione olandese) per l'Olanda e del 3.2% (rilevato da Sanz et al.⁵ su di un campione di popolazione spagnola, con caratteristiche simili alla popolazione italiana) per l'Italia, si è ottenuto un campione costituito da 115 Olandesi ed un campione costituito da 352 Italiani. Il test U di Mann-Whitney, il coefficiente di correlazione rho di Spearman ed il test χ^2 sono stati usati per i confronti uni e bivariati. La regressione logistica lineare non condizionata (metodo backward) è stata impiegata per individuare i fattori di rischio collegati alla presenza dei singoli microrganismi.



Tabella 1. Parametri clinici e demografici delle popolazioni selezionate

	Italiani	Olandesi	Analisi statistica
n	352	115	-
Età (anni) (mean ± SD)	47±12	47±11	T-Student, NS
% Sesso*	58	41	χ^2 , p = 0.001
% Fumatori	29	31	χ^2 , NS
% Caucasici	100	67	-
% Altre etnie [§]	0	33	-
PPD (mm) (mean ± SD)	6±2	7±1	M-W [†] , p = 0.017
CAL (mm) (mean ± SD)	6±2	7±1	M-W [†] , p = 0.017
% Siti con BoP (± SE)	89±0.008	94±0.01	χ^2 , p = 0.002
% Siti con suppurazione (± SE)	4±0.005	3±0.008	χ^2 , NS

* Categoria di riferimento: Femmine.

[§] "Altre etnie" è così composto: 8.7% di soggetti originari del Suriname, 7.8% del Marocco ed il restante 16.5% da Africa, India, Iran, Indonesia.

[†] Mann-Whitney U-test.

NS = non statisticamente significativo (p > 0.05).

SD = deviazione standard.

SE = errore standard.

Risultati

Relativamente alla prevalenza microbica tra le due popolazioni, il campione italiano ha mostrato valori significativamente più elevati sia per *Treponema denticola* che per *Porphyromonas gingivalis* (*Tabella 2*). La carica batterica dei microrganismi considerati, eccetto *Tannerella forsythia*, ha differito significativamente tra i pazienti: *Treponema denticola* e *Prevotella intermedia* sono risultati maggiori negli italiani; *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, ed *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* maggiori negli olandesi (*Tabella 3*). L'aumentare di profondità di tasca accresce significativamente la probabilità di rilevare tutte le specie batteriche nei pazienti italiani. Il fumo aumenta la probabilità di rilevare *Fusobacterium nucleatum* (O.R.=5.29) nei pazienti olandesi, mentre nei pazienti italiani di *Tannerella forsythia* (O.R.=4.64) e *Treponema denticola* (O.R.=2.44).

RISULTATI DELLA PREVALENZA TRA I DUE CAMPIONI

Tabella 2. Confronto della prevalenza di ogni singolo microrganismo tra le due popolazioni

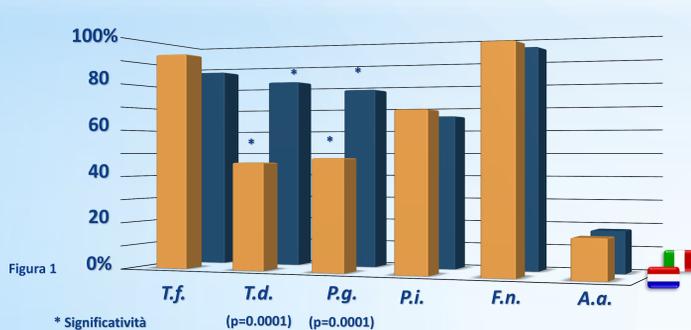
Microrganismi	Italiani	95% IC	Olandesi	95% IC	Statistica χ^2 test p value
	n (%)		n (%)		
<i>T. forsythia</i>	305 (87)	85-89	107 (93)	91-95	NS
<i>T. denticola</i>	290 (82)	80-84	53 (46)	41-51	0.0001
<i>P. gingivalis</i>	275 (78)	76-80	55 (48)	43-53	0.0001
<i>P. intermedia</i>	231 (66)	63.5-68.5	78 (68)	64-72	NS
<i>F. nucleatum</i>	333 (95)	94-96	107 (95)	93-97	NS
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	65 (18.5)	17-21	19 (17)	13-21	NS

Numero (n) e proporzione (%) di soggetti positivi per ogni microrganismo esaminato all'interno della popolazione selezionata.

Soggetti con una carica microbica sotto il livello di sensibilità del test (1.0×10^2) sono stati considerati negativi.

NS = non statisticamente significativo (p>0.05).

CONFRONTO DELLA PREVALENZA TRA ITALIA ED OLANDA



RISULTATI DELLA CARICA BATTERICA TRA I DUE CAMPIONI

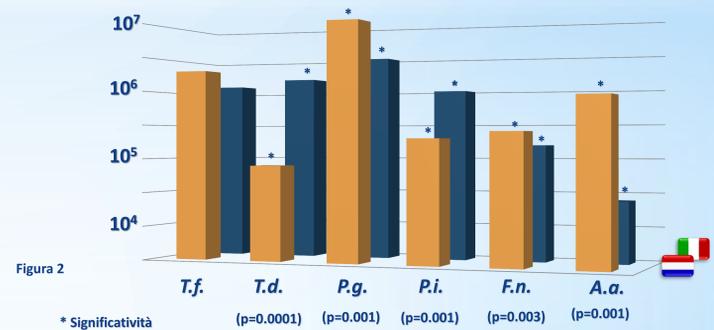
Tabella 3. Confronto della carica batterica mediana delle differenti specie batteriche.

Microrganismi	Carica batterica mediana Italiani	Carica batterica mediana Olandesi	Statistica Mann-Whitney U-test p value
	<i>T. forsythia</i>	1.7x10 ⁶	
<i>T. denticola</i>	1.9x10 ⁶	8.5x10 ⁴	0.0001
<i>P. gingivalis</i>	2.7x10 ⁶	1.1x10 ⁷	0.001
<i>P. intermedia</i>	1.4x10 ⁶	2.2x10 ⁵	0.001
<i>F. nucleatum</i>	1.7x10 ⁵	2.5x10 ⁵	0.03
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	4.5x10 ⁴	1.0x10 ⁶	0.001

Soggetti con una carica microbica sotto il livello di sensibilità del test (1.0×10^2) sono stati considerati negativi.

NS = non statisticamente significativo (p>0.05).

CONFRONTO CARICA BATTERICA TRA ITALIA ED OLANDA



Discussione e Conclusioni

Dai dati ottenuti emergono differenze tra le due popolazioni sia nel profilo microbiologico che nei fattori di rischio ad esso collegati. Il profilo microbiologico dei patogeni parodontali tra pazienti italiani ed olandesi affetti da parodontite cronica differisce significativamente nella prevalenza e nella carica batterica, in accordo con altri studi presentati in letteratura²⁻⁶. In particolare, emerge dai risultati la significativa differenza della carica batterica tra i patogeni indagati nelle due popolazioni. I grafici in *Fig. 1* e *Fig. 2* mostrano chiaramente la diversa distribuzione di prevalenza e carica batterica. Sebbene alcune specie batteriche siano molto diffuse tra i pazienti di entrambi i gruppi, queste risultano numericamente poco rilevanti. Considerando le molteplici variabili che contribuiscono alla patogenesi della parodontite e l'ampia conoscenza sull'aggregazione e struttura del biofilm, la consapevolezza di tali condizioni potrebbe influenzare lo sviluppo di future strategie di trattamento specifiche, mirate ad alterare formazione, ecologia o struttura del biofilm, ad esempio riducendo l'aderenza batterica, introducendo competitori non patogeni, modificando la matrice extracellulare, alterando il quorum sensing, regolando l'espressione dei fattori di virulenza, supportando il mantenimento di una microflora orale salutare⁹⁻¹³.

In conclusione, maggior approfondimento e comprensione di tali aspetti potrebbero influenzare le strategie di profilassi e terapia degli individui che vivono in specifiche regioni geografiche.

1. Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., Bouchard, P., Curtis, M., Dahlén, G., Fabris, S., Feres, M., Figuero, E., Haubek, D., Herrera, D., Indrioli, A., Ketschall, M., Marsh, P., Papapanou, P., Schlegel, U., & Teles, R. (2011) Periodontal infections: understanding the complexity - Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* 38, 3-6.
 2. Socarransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, Jr, R. L. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* 25, 134-144.
 3. Herrera, D., Contreras, A., Gamonal, J., Otero, A., Jaramila, A., Silva, N., Soto, M., Botero, J. E., & Kwon, R. (2008) Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *Journal of Clinical Periodontology* 35, 106-113.
 4. Haffajee, A. D., Bogen, A., Hasturk, H., Feres, M., Lopez, N. J., & Socarransky, S. S. (2004) Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations. *Journal of Clinical Periodontology* 31, 996-1002.
 5. Sanz, M., van Winkelhoff, A. J., Herrera, D., Delemont-Kispuw, N., Simon, H., & Winkel, G. G. (2000) Differences in the composition of subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands. *European Journal of Oral Science* 108, 383-392.
 6. Ali, R. W., Bakken, V., Nissen, R., & Sving, N. (1994) Comparative detection frequency of putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. *Journal of Clinical Periodontology* 45, 1046-1052.
 7. Gary, C. Armitage. (1999) Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology / The American Academy of Periodontology* 4, 1-6.
 8. Slots, J., Bragø, L., Wikström, M. B., & Dalhén, G. G. (1986) The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *Journal of Clinical Periodontology* 13, 570-577.
 9. Jenkinson, H. F. (2011) Mini-review - Beyond the oral microbiome. *Environmental Microbiology* 13, 2977-2987.
 10. Meijndert, L., van der Reijden, W. A., Raghoobar, G. M., Meijler, H. J. A., & Vissink, A. (2010) Microbiota around teeth and dental implants in periodontally healthy, partially edentulous patients: is pre-implant microbiological testing relevant? *European Journal of Oral Science* 118, 357-363.
 11. Bik, E. M., Long, C. D., Armitage, G. C., Loomer, P., Emerson, J., Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Gill, S. R., Fraser-Liggett, C. M., & Relman, D. A. (2010) Bacterial diversity in the oral cavity of ten healthy individuals. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 4, 962-974.
 12. Socarransky, S. S., & Haffajee, H. (2002) Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2002, 38, 135-157.
 13. Muchack, P., Dalle, L., Vinès, E., Berrocal, L., & Bittner, M. (2010) Isolation of a Novel Bacteriophage Specific for the Periodontal Pathogen *Fusobacterium nucleatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 7243-7250.