

Metodo rapido per antibiogrammi su microrganismi anaerobi nelle malattie parodontali*

R. ZANCHI*, L. BECCARIA*, E. DEL PUPPO*, E. CANZI*,
A. FERRARA**, N. PACINI*, A. PECCHIONI**, A. FERRARI*

* Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche.
Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

** GUSIO, Gruppo Universitario Studi in Odontoiatria, Milano, Italia

La frazione batterica della placca dentale nelle malattie parodontali è costituita da una complessa flora microbica, rappresentata principalmente da microrganismi anaerobi legati tra loro da rapporti di associazione, commensalismo e antagonismo (1, 2).

Lo studio di questi microrganismi è oggi possibile ed è stato operativamente semplificato dalla disponibilità di tecniche di anaerobiosi che sono state perfezionate in questi ultimi anni (3). Nonostante ciò l'isolamento delle varie forme microbiche e lo studio della loro sensibilità ai vari antimicrobici, sono complesse e richiedono lunghi tempi di analisi.

È ormai accertato (4) che l'eziologia delle varie malattie parodontali è imputabile alla presenza di più forme microbiche, piuttosto che all'azione di singoli microrganismi patogeni specifici, nonché allo stato dell'ospite. Infatti nei pazienti affetti da tali malattie sono presenti contemporaneamente e in proporzioni diverse a seconda delle differenti patologie, specie appartenenti a vari generi, perlopiù anaerobi, quali ad es. spirochete, fusiformi, batteroidi, attinomiceti, eubatteri, lattobacilli (Tab. 1, 2).

Alla luce di ciò sembrerebbe quindi più significativo determinare la sensibilità agli antimicrobici delle colture miste piuttosto che dei singoli ceppi in coltura pura.

L'obiettivo primario di questo lavoro è stato quello di mettere a punto un metodo rapido e automatizzato per determinare l'attività di antimicrobici sulla placca batterica di soggetti affetti da malattie parodontali.

* Comunicazione presentata al XXIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Palermo, 26-30 novembre 1990.

TABELLA 1 — *Principali generi ritrovati in alcune malattie parodontali.*

Genere	Gengivite	Gengivite acuta necrotico-ulcerativa	Parodontite cronica adulto
<i>Actinomyces</i>	+++	++	+++
<i>Bacteroides</i>	+	++	+++
<i>Campylobacter</i>	+		
<i>Eubacterium</i>	++		+++
<i>Fusobacterium</i>	++	+++	+++
<i>Haemophilus</i>			+++
<i>Lactobacillus</i>	+++		+++
<i>Peptostreptococcus</i>			+++
<i>Selenomonas</i>	++	++	+++
<i>Spirochaeta</i>	++	+++	++
<i>Staphylococcus</i>			+++
<i>Streptococcus</i>	+++		++
<i>Veillonella</i>	+		
<i>Wolinella</i>			+++

TABELLA 2 — *Principali specie di Bacteroides e di Actinomyces ritrovate in alcune malattie parodontali.*

Specie	Gengivite	Gengivite acuta necrotico-ulcerativa	Parodontite cronica adulto
<i>Bacteroides oralis</i>			+++
<i>B. gingivalis</i>			+++
<i>B. intermedius</i>		++	
<i>B. loescheii</i>			+++
<i>B. melaninogenicus</i>	+		
<i>B. pneumosintes</i>			+++
<i>Actinomyces israelii</i>	+++		+++
<i>A. naeslundii</i>	+++		+++
<i>A. odontolyticus</i>	+++	++	
<i>A. viscosus</i>	+++		

TABELLA 3 — *Patologia dei soggetti esaminati.*

Patologia	Campione n.
Parodontite cronica dell'adulto	1, 2, 3, 4, 6
Parodontite rapidamente progressiva	5
Gengivite incipiente	7
Gengivite conclamata	9
Stomatite pseudo-membranosa	8

METODI

È stata saggiata l'attività di 20 antimicrobici su campioni di placca batterica prelevata da 9 soggetti, dei quali 5 affetti da parodontite cronica, 1 da gengivite

incipiente, I da gengivite conclamata, I da parodontite rapidamente progressiva ed I da stomatite pseudomembranosa (Tab. 3).

La ricerca è stata condotta utilizzando, per la prima volta, uno strumento normalmente impiegato per test diagnostici in serie di batteri aerobi e apportando le necessarie modifiche operative al fine di ottenere condizioni di stretta anaerobiosi.

Si tratta di un autoanalizzatore (Abbott Advantage MS2) che consta essenzialmente di un colorimetro termostato a 35 °C, nel quale è possibile introdurre 7 apposite cartucce di materiale plastico, costituite ciascuna da una camera superiore e da 11 piccole cuvette inferiori: nella camera superiore si introduce inizialmente il terreno inoculato, che viene poi trasferito automaticamente nelle cellette inferiori, quando la coltura batterica entra in fase di crescita esponenziale. Nelle cuvette inferiori è possibile alloggiare 10 differenti dischetti imbevuti con una concentrazione standard degli antimicrobici per i test di sensibilità. Il modulo di analisi, che effettua ogni 5' la lettura automatica della trasmittanza a 670 nm, è collegato ad un computer che registra i dati, permettendo la costruzione di una curva di crescita. Inoltre un apposito programma per antibiogrammi elabora i dati ottenuti, comparando le varie crescite con valori di riferimento contenuti in memoria, dando sia un risultato qualitativo (resistente, intermedio, sensibile) che uno quantitativo (M.I.C.).

Tutte le operazioni di manipolazione dei campioni, dal prelievo sino all'utilizzo dell'autoanalizzatore computerizzato, sono state condotte in modo da ottenere una catena di stretta anaerobiosi.

A tale scopo il trasporto immediato dei campioni, sospesi in soluzione salina preridotta (torbidità 1 Mc Farland), è stato effettuato in contenitori Gas Pak BBL. Si è quindi operato in cabina anaerobica, dove 13,5 ml di terreno preridotto, inoculato in ragione del 6% di sospensione iniziale, era introdotto nella camera superiore delle apposite cartucce (rese prive di ossigeno insufflando una miscela di gas: N₂, H₂, CO₂) e ricoperto con 1,5 ml di olio di paraffina sterile: tale quantità è infatti risultata la minima necessaria a mantenere l'anaerobiosi all'interno delle cartucce senza comprometterne la funzionalità nell'analizzatore. La validità delle condizioni di anaerobiosi così ottenute è stata confermata con un ceppo-test estremamente sensibile all'ossigeno di origine intestinale (*Eubacterium formicigenerans*). Ogni cartuccia, chiusa con l'apposito tappo, era tolta dalla cabina anaerobica e inserita nel modulo di analisi.

Per l'allestimento delle colture è stato utilizzato il terreno Marcus Talalay (addizionato di emina 5 µg/ml e vitamina K 1 µg/ml), risultato idoneo a consentire uno sviluppo equilibrato della microflora presente nei campioni di placca, osservati al microscopio a contrasto di fase al momento del prelievo. Si osservava infatti che i rapporti quali-quantitativi tra le diverse forme microbiche si mantenevano accettabilmente costanti nelle ore utili all'esperimento (3-6 h).

Questo terreno inoltre consente l'esecuzione degli antibiogrammi senza alterarne le risposte e il suo colore non interferisce con le letture della trasmittanza alla lunghezza d'onda utilizzata.

RISULTATI

Su ogni campione di placca è stata saggiata l'attività di 20 antibiotici diversi (Tab. 4). I risultati mettono in evidenza un'analogia di sensibilità agli antimicrobici dei diversi campioni di placca batterica esaminati: amoxicillina, ampicillina, cefamandolo, cefoperaxone, cefotetan, cefoxitina, cefuroxime, cefalotina, cloramfenicolo, imipenem, moxalactame e ticarcillina sono risultati attivi su tutti i campioni, mentre invece colistina, gentamicina, kanamicina e acido nalidixico non sono mai risultati attivi. Inoltre clindamicina e tetraciclina sono risultate at-

TABELLA 4 — Sensibilità dei 9 campioni ai diversi antibiotici.

Antibiotico	N. campioni sensibili	N. campioni resistenti	% campioni sensibili
Amoxicillina	9	—	100
Ampicillina	9	—	100
Penicillina	8	1	89
Ticarcillina	9	—	100
Cefalotina	9	—	100
Cefamandolo	9	—	100
Cefoperaxone	9	—	100
Cefotetan	9	—	100
Cefoxitina	9	—	100
Cefuroxime	9	—	100
Imipenem	9	—	100
Moxalactame	9	—	100
Gentamicina	—	9	—
Kanamicina	—	9	—
Acido Nalidixico	—	9	—
Clindamicina	4	5	44
Cloramfenicolo	9	—	100
Colistina	—	9	—
Eritromicina	6	3	67
Tetraciclina	4	5	44

TABELLA 5 — Specie microbiche isolate dal campione di placca n. 9.

Specie isolate
<i>Actinomyces israelii</i>
<i>A. viscosus</i>
<i>Bacteroides intermedius</i>
<i>B. melaninogenicus</i>
<i>B. oralis</i>
<i>Fusobacterium</i> spp.
<i>Leptotrichia buccalis</i>
<i>Selenomonas sputigena</i>
<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>Streptococcus</i> spp.

tive verso 4 campioni, eritromicina verso 6 e penicillina verso 8. I campioni sensibili provenivano da individui affetti da patologie differenti.

Peraltro amoxicillina, ampicillina, tetraciclina ed eritromicina sono spesso usati in odontoiatria, mentre gli altri antimicrobici testati non vengono generalmente impiegati.

Per verificare se la sensibilità agli antimicrobici riscontrata per la coltura mista, riflettesse effettivamente la sensibilità dei singoli ceppi microbici, si è proceduto all'isolamento dei microrganismi presenti in un campione di placca di un paziente affetto da gengivite conclamata. Le forme microbiche isolate sono risultate rappresentative della patologia considerata, confermando i risultati riportati in letteratura (Tab. 5).

Un ceppo rappresentativo di ognuna delle dieci specie isolate in coltura pura è stato testato con i 20 antimicrobici utilizzati per le colture miste.

L'attività antimicrobica sui singoli ceppi è risultata analoga a quella esercitata sulla frazione batterica della placca nel suo complesso (Tab. 6).

TABELLA 6 — Sensibilità ai diversi antibiotici di 10 ceppi isolati dal campione n. 9, comparata a quella della placca tal quale.

Antibiotico	N. ceppi sensibili	N. ceppi resistenti	% ceppi sensibili	Sensibilità
Amoxicillina	10	—	100	S
Ampicillina	10	—	100	S
Penicillina	10	—	100	S
Ticarcillina	9	1	90	S
Cefalotina	9	1	90	S
Cefamandolo	10	—	100	S
Cefoperaxone	9	1	90	S
Cefotetan	10	—	100	S
Cefoxitina	10	—	100	S
Cefuroxime	9	1	90	S
Imipenem	10	—	100	S
Moxalactame	10	—	100	S
Gentamicina	—	10	—	R
Kanamicina	—	10	—	R
Acido Nalidixico	—	10	—	R
Clindamicina	5	5	50	R
Cloramfenicolo	10	—	100	S
Colistina	—	10	—	R
Eritromicina	10	—	100	S
Tetraciclina	10	—	100	S

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano la validità dell'utilizzo di antibiogramma su colture miste di placca dentale e consentono di considerare valido il metodo messo a punto: esso permette di individuare in 3-6 ore l'antimicrobico attivo sugli anae-

robi, per la profilassi e la cura delle malattie parodontali.

Inoltre, dai nostri risultati sperimentali, gli antibiotici risultati particolarmente attivi sui campioni esaminati si possono considerare quelli appartenenti al gruppo delle penicilline e delle cefalosporine, oltre che il cloramfenicolo.

RIASSUNTO

Si è messo a punto un metodo, rapido e automatizzato, per valutare l'attività di antimicrobici sulla frazione batterica anaerobia della placca dentale di pazienti affetti da diverse malattie parodontali.

I risultati ottenuti dimostrano la validità dell'utilizzo di antibiogramma su colture miste di placca dentale: con questo metodo si individua in 3-6 ore l'antibiotico attivo sugli anaerobi, per la cura delle malattie parodontali.

SUMMARY

A Rapid Method for Antibiograms on Anaerobic Bacteria in Periodontal Diseases

A rapid and automated system has been defined by us to evaluate the activity of antimicrobs on the anaerobic bacteria of the subgingival plaque of individuals with different periodontal diseases.

The results of this research show the validity of antibiograms on mixed culture dental plaque. This method permits to single out in 3-6 hours the antibiotic active against anaerobic periodontal diseases.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Moore W.E.C., Holdeman L.V., Cato E.P., Good I.J., Smith E.P., Ranney R.R., Palcanis K.G.: *Variation in periodontal flora*. Infect. Immun., **46**, 720 (1984).
- (2) Drink J.L., Tanner A.C.R., Haffajee A.D., Socransky S.S.: *Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions*. J. Clin. Periodontol., **12**, 648 (1985).
- (3) Pacini N.: *I microrganismi anaerobi ossigeno non tolleranti e metodi di allevamento colturale*. Ann. Microbiol., **29**, 1 (1979).
- (4) Maiden M.F.J., Carman R.J., Curtis M.A., Gillett I.R., Griffiths G.S., Sterne J.A.C., Wilton J.M.A., Johnson N.W.: *Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases: laboratory markers based on the microbiological analysis of subgingival plaque*. J. Clin. Periodontol., **17**, 1 (1990).