

METODO RAPIDO PER TESTARE L'ATTIVITÀ DEGLI ANTIMICROBICI SU MICRORGANISMI DELLA PLACCA DENTALE NELLA MALATTIA PARODONTALE

L. Beccaria* - A. Ferrari* - A. Ferrara** - G. M. Bergonzi**

*Università degli studi di Milano

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche

Cattedra di Microbiologia

Dir. Prof. A. Ferrari

**Università degli studi di Parma

Scuola di Specializzazione in Odontostomatologia

Dir. Prof. L. Fiamminghi

INTRODUZIONE

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.

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. Nonostante ciò l'isolamento delle varie forme microbiche, nonché lo studio della loro sensibilità ai vari antimicrobici, è complesso e richiede lunghi tempi di analisi.

Recentemente è stato ipotizzato (Maiden et Al. 1990) che l'eziologia delle varie malattie parodontali possa essere 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 esempio spirochete, fusiformi, bacteroidi, actinomiceti, eubatteri, lactobacilli.

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.

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 (scarsi segni clini-

ci: bleeding on probing), 1 da gengivite conclamata, 1 da paradontite rapidamente progressiva ed 1 da gengivite ulcero-necrotica.

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

Si tratta di un autoanalizzante (Abbott Advantage MS2) che consta essenzialmente di un colimetro 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 curette inferiori: nella camera superiore viene inizialmente introdotto il terreno inoculato, che viene poi trasferito automaticamente nelle cellette inferiori, quando la coltura batterica entra in fase di crescita esponenziale. Nelle 11 curette inferiori è possibile alloggiare 10 differenti dischetti imbevibili con una concentrazione standard degli antimicrobici per i test di sensibilità.

Il modulo di analisi, che effettua ogni 5 s la lettura automatica della trasmittanza a 670 nm, è collegato ad un computer che registra i dati e li elabora, permettendo la costruzione di una curva di crescita.

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 sono state condotte in modo da ottenere una catena di stretta anaerobiosi durante tutte le fasi di manipolazione dei campioni, dal prelievo fino all'utilizzo dell'autoanalizzatore computerizzato.

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 della 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: tal quantità è infatti risultata la minima necessaria a mantenere l'anaerobiosi all'interno delle cartucce senza compromettere la funzionalità delle cartucce stesse. La validità delle condizioni di anaerobiosi così ottenute è stata confermata utilizzando inizialmente un ceppo estremamente sensibile all'ossigeno, di origine intestinale (*Eubacterium formicigerans*).

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 mcg./ml e vitamina K 1 mcg./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 qualitativi tra le diverse forme microbiche si mantenevano accettabilmente costanti nelle ore utili all'esperimento (3-6 h). Questo terreno consente inoltre 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. 1). I risultati mettono in evidenza un'analogia di sensibilità agli antimicrobici dei diversi campioni di placca batterica esaminati: amoxicillina, ampicillina, cefamandolo, cefoperazone, cefotetan, cefoxiti

Tab. 1 - 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	—	—	—
Kanamicina	—	9	—
Acido Nalidixico	9	—	100
Clindamicina	4	5	44
Cloramfenicolo	9	—	100
Colistina	—	9	—
Eritromicina	6	3	67
Tetraciclina	4	5	44

Tab. 2 - Sensibilità ai diversi antibiotici di 10 ceppi isolati dal campione n. 9, comparata a quella della placca

Antibiotico	N. ceppi sensibili	N. ceppi resistenti	% ceppi sensibili	Sensibilità placca
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

tina, cefuxorina, cefalotina, cloramfenico, imipenem, moxalactam, ticarcillina, sono stati attivi su tutti i campioni, mentre invece colistina, gentamicina, kanamicina e acido malidixico non sono mai risultati attivi. Inoltre clindamicina e tetraciclina sono risultate attive verso 5 campioni, eritromicina verso 7 e penicillina verso 8. I campioni sensibili provenivano peraltro da individui affetti da patologie differenti.

Va inoltre preso in considerazione che 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 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 (*Actinomyces israelii*, *A. Viscosus*, *Bacteroides intermedius*, *B. gengivalis*, *B. melanogenicus*, *Fusobacterium*, *Leptotrichina buccalis*, *Selenomas sputigena*, *Streptococcus SPP*, *S. intermedius*).

Dieci ceppi isolati in coltura pura sono stati testati 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. 2).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano la validità dell'utilizzo di antibiogrammi 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 anaerobi, 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 all'acido nalidixico ed al cloramfenicolo.

Bibliografia

- 1) C. armitage, W. R. dickinson, R. S. jenderjeck, B. W. chambers:
«Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease
J. Periodontol. 53, 550, 1982
- 2) J. L. bzink, A. C. R. tanner, A. D. haffajee, S. S. socransky:
«Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions J. Clin. Periodontol. 12, 648, 1985
- 3) G. greenstein, A. polson:
«Microscopic monitoring of pathogens associated with periodontal disease
J. Periodontol. 56, 740, 1985
- 5) W. J. loesche, B. laughon:
«Role of spirochetes in periodontal disease Host Parasite Interactions in Periodontal Disease.
Washington DC, American Society of Microbiology, p. 46, 1982
- 6) B. liljenberg, J. lindhe:
«Juvenile periodontitis. Some microbiological, histopatological and clinical characteristics
J. Clin. Periodontol. 7, 48, 1980