

## Variation of perimplant biofilm induced by non surgical periodontal therapy and the use of probiotics

Marcello Gatti, Giovanna Costa, Tatiana Giulia Rizzati, Francesca Scandurra, Maria Sofia Rini, Pasqua Schiavone

Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche, Sezione di Microbiologia Alma Mater Studiorum, Università degli Studi di Bologna

**Key words:** Perimplantitis, Implant dentistry, Cultural, rRNA ibridization test, Probiotics

**Variazione del biofilm perimplantare indotto da terapia parodontale non chirurgica e uso di probiotici**

### SUMMARY

Thanks to improved surgical techniques the use of dental implants has increased greatly.

However, high rates of osseointegrated correctly implants, over the years are undermined by disease of bacterial etiology in the perimplant zone, especially by Gram negative anaerobes such as in gingivitis and periodontitis, in particular: *Fusobacterium spp.* (F.), *Treponema denticola* (T.d.), *Tannerella forsythensis* (T.f.), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Prevotella intermedia* (P.i.) e *Porphyromonas gingivalis* (P.g.). The mechanic treatment (MS) results in a reduction of the total bacterial count (TBC) and a slight change in the subgingival bacterial microflora towards the less pathogenic species and more like those of a healthy periodontium. Also the use of a probiotic in the form of buccal tablets of *Lactobacillus reuteri* (L.r.), as demonstrated in this study, is thought to improve and modulate the composition of plaque, as it is able to exert an inhibitory effect on oral bacteria that support caries, gingivitis, periodontal and perimplant disease with a combination of different mechanisms.

### Aims

The purpose of this study was to evaluate the effect of MS associated with the use of local probiotic on variations in the composition of the subgingival microbial population in patients with perimplantitis using a microbiological quantitative test for direct rRNA hybridization of commerce and culture.

### INTRODUZIONE

Negli ultimi vent'anni è aumentato sempre di più l'utilizzo della metodica implantare e le previsioni, vista anche la crescita dell'aspettativa di vita, sono di un alto numero di pazienti che dovranno essere tenuti in terapia di supporto. Controllare adeguatamente la qualità e la quantità del biofilm colonizzante i siti significherà garantire successo, dal momento che la scarsa igiene orale è stata considerata uno dei fattori di rischio più evidenti per la malattia perimplantare. Su questo fattore di rischio come del resto sull'abitudine di fumare si può agire, mentre le possibilità di controllo sono purtroppo nulle per fattori indipendenti dai nostri comportamenti come il polimorfismo genetico, l'età, la progressiva parodontopatia, la malattia metabolica.

Grazie al miglioramento delle tecniche chirurgiche negli ultimi venti anni è aumentato moltissimo l'utilizzo della metodica implantare. I dati provenienti dal Consensus Report del 2008 indicano alte percentuali di impianti inizialmente correttamente osteointegrati (11), ma nel corso degli anni minati da malattie a eziologia batterica nella zona perimplantare, soprattutto Gram negativi anaerobi come nella gengivite e parodontite (5, 6, 10), in particolare *Fusobacterium spp.*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythensis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* in alte cariche (4, 7, 9, 10, 12).

Studi microbiologici hanno dimostrato che la strumentazione meccanica (SM) determina una riduzione della conta batterica totale (CBT) e un viraggio della microflora sottogengivale verso le specie meno patogene e più simili a quelle di un parodonto sano (3).

La rimozione regolare della placca sopragengivale non ha solo l'effetto di migliorare i parametri associati all'infiammazione gengivale, ma anche quello di modulare la composizione della placca sottogengivale. Oggi si ritiene che l'introduzione di un probiotico sottoforma di compresse orosolubili a base di *Lactobacillus reuteri* possa migliorare e modulare la composizione della placca, in quanto la sua azione viene attribuita alla capacità di esercitare un effetto inibitorio sui batteri orali che sostengono carie, gengivite e malattia parodontale (2, 1, 5, 8, 12) con una combinazione di diversi me-

canismi, inclusa la produzione di acido lattico, perossido di idrogeno, sostanze antimicrobiche e batteriocine. L'attività antimicrobica ad ampio spettro di *L. reuteri* è considerata un'importante caratteristica che conferisce potenziale terapeutico per la prevenzione o il trattamento delle infezioni anche a livello del cavo orale in quanto converte il glicerolo in un potente composto antimicrobico ad ampio spettro, la reuterina (3-idrossi-propionaldeide), in grado di inibire la crescita di batteri Gram positivi e Gram negativi.

È un batterio ampiamente usato per le sue proprietà probiotiche, come trattamento per il riequilibrio della flora batterica gastrointestinale.

L'analisi microbiologica si avvale dell'uso dell'esame colturale tradizionale che, consentendo l'identificazione delle specie batteriche implicate, rimane il *gold standard* per evidenziare la presenza dei microrganismi nell'infezione perimplantare, anche se oggi è possibile utilizzare metodiche nuove come le tecniche di biologia molecolare di maggiore utilità soprattutto per ricercare alcune specie batteriche di difficile coltivazione.

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'effetto di SM associato all'uso di probiotico locale sulle variazioni della popolazione batterica sottogengivale in pazienti con perimplantite utilizzando sia un *test* commerciale basato sull'ibridizzazione diretta dell'rRNA per la quantificazione dei batteri vitali ed esame colturale.

### MATERIALI E METODI

Sono stati studiati 24 pazienti (14 donne e 10 uomini) di età compresa, le donne fra 43 e 76 anni, con una media di 63.8 +/- 10.9 anni, gli uomini tra 45 e 88 anni, con una media di 64.3 anni +/- 12.5 anni. Tutti i pazienti avevano perso elementi dentari per parodontopatia (parodontiti ripetute fino alla perdita dell'elemento) e sostituiti con implantoprotesi. La media temporale degli impianti e della loro attività era di 11.5 anni nelle donne e di 10.7 anni negli uomini. Con l'utilizzo della sonda parodontale PCP 15 della Hu-Friedy sono stati valutati parametri clinici come BOP (sanguinamento al sondaggio), la presenza di essudato, la profondità delle tasche parodontali (PPD), il livello di attacco clinico (CAL), la mobilità (MOB). Sono stati valutati dati anamnestici come

### Corresponding author: Marcello Gatti

Università degli Studi di Bologna, Dipartimento di Scienze Odontostomatologiche, Sezione di Microbiologia  
Via San Vitale, 59 - 40125 Bologna - Tel.: 39 051 2088156 - Fax: 051 225208;  
E-mail: [marcello.gatti@unibo.it](mailto:marcello.gatti@unibo.it); [marcello.gatti.bo@alice.it](mailto:marcello.gatti.bo@alice.it)

la familiarità per la malattia parodontale, la condizione di fumatori, la presenza di malattie metaboliche, di ipertensione o di altri problemi sistemici. È stata considerata la frequenza abituale della terapia di supporto (per tutti > di un anno) e l'utilizzo domiciliare dei presidi per l'igiene degli spazi interprossimali.

I criteri per la non inclusione nello studio sono stati: avere assunto antibiotici nei tre mesi precedenti il prelievo, avere utilizzato collutori antibatterici nell'ultima settimana prima del prelievo, essersi sottoposti a terapia di supporto (causale) durante i tre mesi precedenti il prelievo e presenza di gravidanza.

Il campionamento microbiologico della placca sottogengivale è stato effettuato prima della SM, dopo 5, e 12 mesi.

I pazienti, dopo il primo campionamento, sono stati divisi casualmente in 2 gruppi: al gruppo A è stata effettuata solo la SM (controllo), al gruppo B (*test*) è stato inoltre fatto assumere giornalmente un probiotico mediante una compressa orosolubile a base di *L. reuteri* (GUM).

### Modalità di prelievo

Le modalità utilizzate per il prelievo del materiale patologico sono state: isolare il campo operatorio, asciugare il sito individuato per il prelievo, inserire 2 coni di carta sterili (uno per l'esame colturale e l'altro per la tecnica di ibridizzazione dell'rRNA), nei siti con sondaggio > 4 mm per 60', inserire i coni nelle provette eppendorf sterili con terreno di trasporto per l'esame colturale e con soluzione tampone per il *test* molecolare.

### Test molecolare

È stato utilizzato un *test* commerciale (PerioCheck Gum-Sunstar) basato sull'ibridizzazione diretta dell'rRNA per la quantificazione dei batteri vitali appartenenti alle specie patogene parodontali e perimplantari: *A. actinomycetemcomitans* (*A.a.*), *P. gingivalis* (*P.g.*), *T. forsythensis* (*T.f.*), e *T. denticola* (*T.d.*). Il limite di rivelazione per ciascuna specie patogena è di 200 cellule batteriche. I campioni per l'analisi molecolare sono stati inviati, all'istituto IAI (Instut fur Angewandte Immunologie), presso Zuchwil, in Svizzera.

### Esame colturale

Per l'esame colturale i campioni sono stati osservati al microscopio a fresco per evidenziare batteri mobili, cocchi, bacilli filamentosi, ecc... e in campo oscuro per evidenziare le spirochete con ingrandimento 400x. Successivamente i campioni sono stati seminati in piastre di: *Herellea* agar (Biolife), Mannitol salt agar (Biolife), Blood agar horse (Biolife), *Brucella* agar (Biolife), CNA agar (Biolife), Schaedler selective blood agar (Biolife), Trypticase soy agar addizionato con siero di cavallo, bacitracina e vancomicina (Biolife), Gc-Lect agar (BD), MTS agar (Biolife), Chromoagar (Alfa - Wasserman) e/o altri terreni selettivi preparati in laboratorio. I terreni, per la crescita di batteri aerobi, venivano poi incubati a 37°C per 48 ore, mentre per i batteri anaerobi i terreni venivano incubati a 37°C per 5 giorni in anaerobiosi utilizzando il sistema GENbag anaer (bioMérieux). Per la semina è stata utilizzata un'ansa calibrata monouso sterile da 0.10µl. L'ansa veniva strisciata sulle piastre in 4 settori diversi, per ottenere una conta semiquantitativa finale di  $\geq 10^5$  cfu. Le colonie sono state isolate utilizzando gli stessi terreni di crescita ed identificate con i sistemi Api (bioMérieux): Rapid ID 32, per bacilli anaerobi obbligati sia Gram negativi che Gram positivi, Rapid ANA II, per cocchi anaerobi obbligati Gram positivi, API Staph. per stafilococchi e micrococchi, Rapid ID32 Strep per streptococchi, RapID NH per *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Aggregatibacter* e API C Aux per i lieviti.

### RISULTATI

Prima del trattamento tutti i pazienti studiati sono risultati positivi all'indagine microbiologica con cariche batteriche

>10<sup>5</sup> cfu. In particolare, l'esame colturale, con cfu/ml >10<sup>5</sup>, è risultato positivo nel primo prelievo per: *A. actinomycetemcomitans* nel 41%, *T. forsythensis* nel 69%, *P. gingivalis* nel 79%, *Treponema denticola* (*T.d.*) non è stata cercata con l'esame colturale, ma nel 63% dei preparati microscopici in campo oscuro sono risultati positivi per spirochete.

L'indagine molecolare ha permesso di identificare batteri con una carica che oscillava tra 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> cfu/ml, evidenziando, nel primo prelievo, una positività per: *A. actinomycetemcomitans* nel 21%, *T. forsythensis* nel 83%, *P. gingivalis* nel 71% e *T. denticola* nel 67%.

Suddividendo i pazienti casualmente in 2 gruppi dopo SM: gruppo A (controllo) e gruppo B (*test*) e ripetendo i prelievi a distanza di 5 e 12 mesi si è visto, con l'esame colturale, che: il gruppo A è risultato positivo per *A. actinomycetemcomitans* nel 17% nel secondo prelievo e nel 28% nel terzo prelievo, *T. forsythensis* nel 34% nel secondo prelievo e 45% nel terzo prelievo, *P. gingivalis* nel 28% nel secondo prelievo e nel 60% nel terzo prelievo, le spirochete sono state osservate al microscopio in campo oscuro, nel 33% nel secondo prelievo e 65% nel terzo prelievo.

Il gruppo B è risultato positivo per *A. actinomycetemcomitans* nel 2% nel secondo prelievo e nel 12% nel terzo prelievo, *T. forsythensis* nel 14% nel secondo prelievo e 25% nel terzo prelievo, *P. gingivalis* nel 14% nel secondo prelievo e nel 40% nel terzo prelievo, le spirochete sono state osservate al microscopio in campo oscuro, nel 3% nel secondo prelievo e 48% nel terzo prelievo.

L'indagine molecolare condotta sui 2 gruppi di studio A (controllo) e B (*test*) ha evidenziato nel gruppo A: *A. actinomycetemcomitans* nel 22% nel secondo prelievo e 32% nel terzo prelievo, *T. forsythensis* nel 44% nel secondo prelievo e nel 70% nel terzo prelievo, *P. gingivalis* nel 48% nel secondo prelievo e nel 65% nel terzo prelievo, *T. denticola* nel 45% nel secondo prelievo e nel 70% nel terzo prelievo; nel gruppo B: sono state evidenziate percentuali più basse: *A. actinomycetemcomitans* nel 12% nel secondo campione e nel 25% nel terzo, *T. forsythensis* nel 30% nel secondo prelievo e nel 55% nel terzo prelievo, *P. gingivalis*, nel 38% nel secondo prelievo e 58% nel terzo prelievo, *T. denticola* nel 33% nel secondo prelievo e nel 65% nel terzo prelievo.

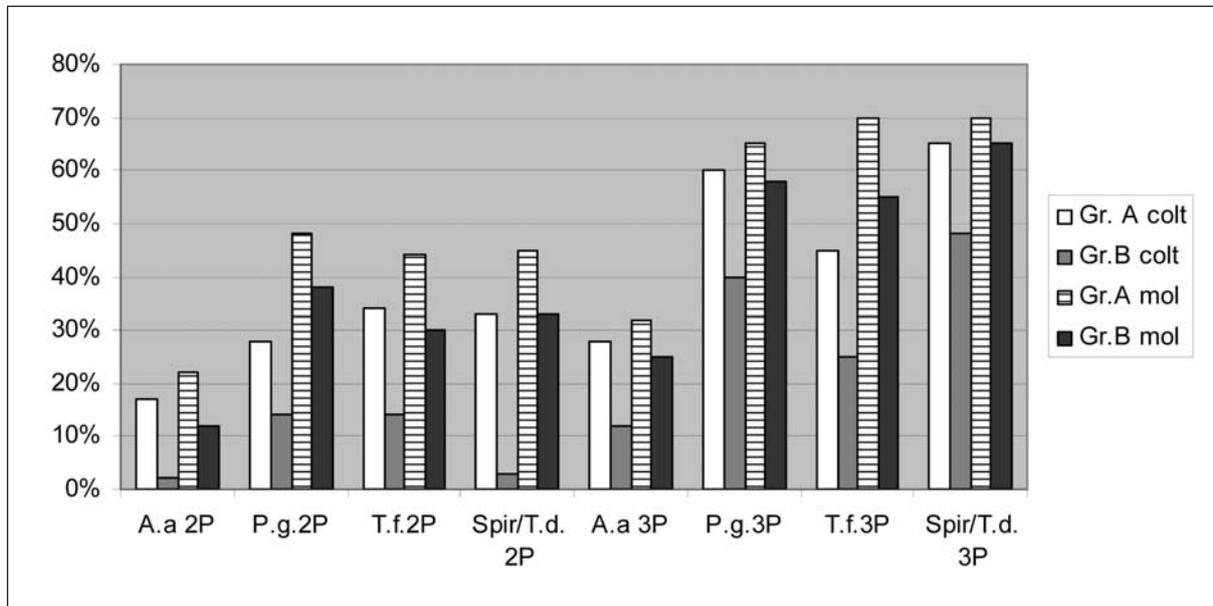
Tali risultati sono riportati nella Figura I.

Le conte batteriche totali (CBT) del *test* molecolare rilevate a cinque mesi da pre-SM hanno mostrato un aumento del 19% nel gruppo A, mentre sono diminuite del 2% per il gruppo B; a 12 mesi da pre-SM la CBT per il gruppo A è aumentata del 14%, mentre per il gruppo B è diminuita del 14%.

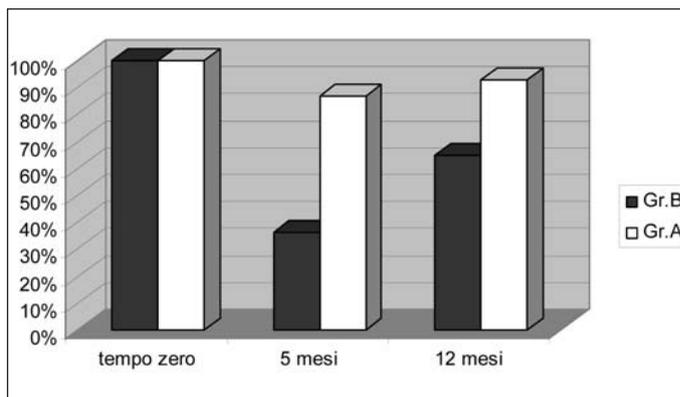
Le CBT, espresse in percentuali, dei 4 batteri parodontopatogeni trovati con il *test* molecolare, a cinque mesi da pre-SM sono diminuite del 64%, a 12 mesi del 35% per il gruppo B. Nel gruppo A, invece, a 5 mesi da pre-SM si nota una riduzione del 13% e a 12 mesi del 10%, come riportato nella Figura II.

L'esame colturale per *A.a.*, *T.d.*, *P.g.* e *T.f.* ha avuto lo stesso andamento di quello molecolare, ma con percentuali più basse. Prendendo in considerazione solo i pazienti del gruppo B, l'esame colturale ha messo in evidenza altre specie microbiche aerobie nel primo, secondo e terzo prelievo: *P. aeruginosa* (rispettivamente 12%, 9% e 7%), *K. pneumoniae* (rispettivamente 15%, 10% e 6%), *E. coli* (rispettivamente 20%, 15% e 5%), *Enterobacter* spp. (rispettivamente 10%, 8% e 4%), *S. epidermidis* (rispettivamente 7%, 5% e 5%), *S. aureus* (rispettivamente 10%, 9% e 8%), *Streptococcus* spp. (rispettivamente 25%, 22% e 20%), *C. albicans* (rispettivamente 5%, 3% e 1%), come riportato nella Figura III.

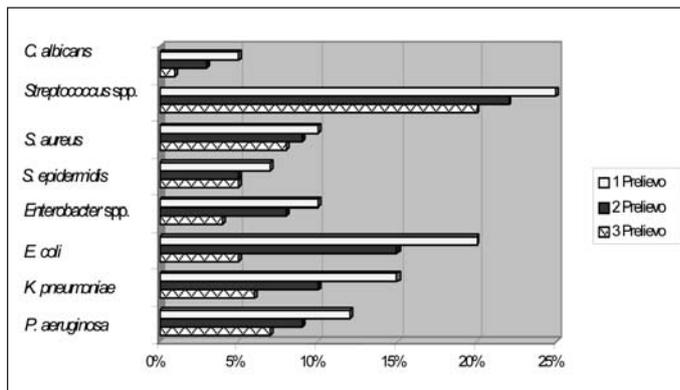
L'esame colturale per batteri anaerobi ha evidenziato anche la presenza, nei tre campioni dei pazienti del gruppo B di: *L. reuteri* (rispettivamente 0%, 50% e 30%), *Capnocytophaga* spp. (rispettivamente 10%, 4% e 8%), *Campylobacter* spp. (rispettivamente 12%, 6% e 9%), *P. intermedia* (rispettivamente 25%, 10% e 16%), *Actinomyces* spp. (rispettivamente 22%, 8% e 12%), *Fusobacterium* spp. (rispettivamente 20%, 12% e 15%), come riportato nella Figura IV.



**Figura I.** Percentuali di presenza dei 4 batteri parodontopatogeni trovati nel secondo (2P, dopo 5 mesi da SM) e terzo prelievo (3P dopo 12 mesi da SM), nei due gruppi di studio (A controllo e B test) con il test molecolare ed esame culturale.



**Figura II.** Confronto delle percentuali delle CBT dei 4 batteri parodontopatogeni trovati con il test molecolare a tempo zero, dopo 5 e 12 mesi da pre-SM sia nel gruppo di controllo A che nel gruppo test B.



**Figura III.** Percentuali di specie microbiche aerobie facoltative trovate nei tre prelievi dei pazienti di gruppo B.

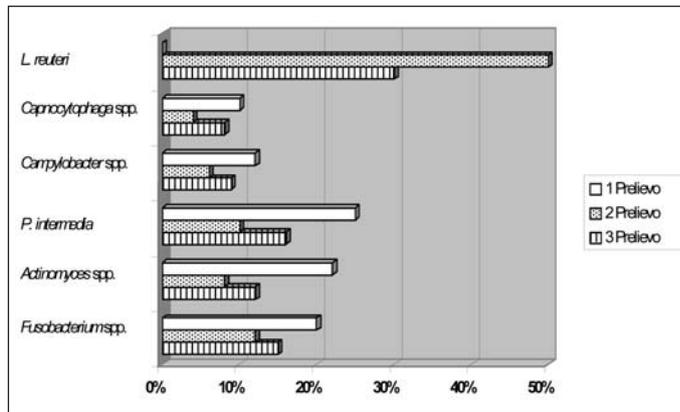
**DISCUSSIONE**

I risultati, ottenuti con il test molecolare, dimostrano che *T. denticola*, *P. gingivalis*, e *T. forsythensis* sono batteri etiopatogeneticamente correlati con tale malattia. I risultati del-

l'esame culturale hanno dimostrato la presenza di 18 specie microbiche diverse, ma le percentuali trovate sono inferiori a quelle del test molecolare. In particolare le spirochete, sono state osservate al microscopio in campo oscuro e successivamente identificate come *T. denticola* con il test di ibridizzazione nel 63% dei pazienti oggetto del presente studio. I dati ottenuti indicano che il test molecolare è risultato più sensibile e specifico rispetto all'esame culturale. La diagnosi molecolare risulta particolarmente importante per *T. denticola*, microrganismo di difficile coltivazione.

Da questi dati preliminari si mette in evidenza che l'esame culturale, con tutti i suoi limiti, evidenzia la composizione polimicrobica presente nella zona perimplantare dei pazienti studiati ed alcuni microrganismi che in certe situazioni possono essere responsabili di infezioni acute e/o croniche. Il test molecolare ha il vantaggio di fornire risultati in tempi brevi nonché precise conte e percentuali. La placca dentale, se non attentamente controllata, può provocare condizioni patologiche. Avere la possibilità di agire sulla modulazione dell'associazione batterica è molto importante, specialmente nella zona perimplantare che strutturalmente è più aggredibile e meno duttile di quella parodontale. L'indagine microbiologica, se correttamente interpretata, può intercettare dei parametri che rappresentano segnali di situazioni cliniche più o meno conclamate. Avere a disposizione i risultati microbiologici può aiutare l'intero team odontoiatrico nella motivazione del paziente per seguire un corretto stile di vita che unito ad adeguate manovre igieniche domiciliari e al rispetto delle scadenze individualizzate della terapia di supporto (dettate da conte e percentuali batteriche reperite) conduce ad un miglioramento della salute non solo orale, ma anche generale. Alla luce degli incoraggianti risultati, microbiologici e clinici, ottenuti nel gruppo B (assunzione di probiotico) più che in quello di controllo, sembrerebbe opportuno continuare la sperimentazione adoperandosi nella ricerca di strategie che portino, quando necessario, ad un sovvertimento dei rapporti di forza all'interno della comunità batterica.

I risultati ottenuti indicano che dopo cinque mesi la CBT risa-



**Figura IV.** Percentuali di specie batteriche anaerobie trovate nei tre prelievi dei pazienti di gruppo B.

le del 50%. L'uso del probiotico, utilizzato giornalmente nei pazienti del gruppo B, riduce la crescita da parte dei batteri anaerobi, favorendo il mantenimento di batteri aerobi/anaerobi non coinvolti direttamente nella malattia. *L. reuteri* si è dimostrato efficace se assunto in modo costante a media distanza (5 mesi) in quanto mantiene i batteri parodontopatogeni intorno al 40%, diversamente dal gruppo di controllo. Prolungando nel tempo l'assunzione giornaliera del probiotico a 12 mesi si vede che il valore dei batteri parodontopatogeni, nel gruppo B aumenta fino ad arrivare al 60%, mentre nel gruppo A, di controllo, raggiunge circa il 90%. In conclusione, l'igiene domiciliare continua in associazione con il probiotico, somministrato a cicli regolari di cinque mesi possono garantire il controllo della gengivite/perim-

plantite. Si può ipotizzare, inoltre, che l'igiene professionale a cinque mesi in corso di terapia probiotica possa consentire il contenimento della popolazione parodontopatogena.

## BIBLIOGRAFIA

- Asikainen O, et al. *In vitro* growth inhibition of periodontitis-associated species by *Lactobacillus reuteri*. Presented at the Anaerobes Congress. July 2006, USA.
- Cagliar E, et al. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis* 2005; 11: 131-7.
- Costa G, Rizzati TG, Scandurra F, Comastri C, Gatti M. Esame culturale e RT-PCR nella valutazione della modulazione del biofilm perimplantare indotta da terapia parodontale non chirurgica e probiotici. Atti del XVI Congresso Nazionale di Parodontologia SIDP. Bologna 4-6 marzo 2010.
- Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM. *A. Actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol* 2002; 51 (12): 1013-20.
- Krasse P, et al. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J* 2006; 30: 55-60.
- Mombelli A. Microbiology of the dental implant. *Adv Dent Res* 1993; 7 (2): 202-6.
- Mombelli A, Van Oosten MAC, Schürch E, Lang NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2, 145-51.
- Nikawa H, et al. *Lactobacillus reuteri* in fermented bovine milk decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol* 2004; 95: 219-23.
- Rodemburg JP, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, et al. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *A. actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol* 1990; 17 (6): 392-9.
- Slots J, Ting M, Adams DA, et al. *A. actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000. 1999; 20: 82-112.
- Smith DE, Zarb G. Criteria for success of osseointegrated endosseous implants. *J Prosth Dent* 1989; 62: 567-72.
- Van Winkelhoff AJ, Wolf JW. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated peri-implantitis in an edentulous patient. A case report. *J Clin Periodontol* 2000; 27 (7): 531-5.