

# ACUMULAREA PLACII BACTERIENE IN PUNGILE PERI-IMPLANTARE LA IMPLANTURILE NOU INSERATE

## SUMMARY

### ACCUMULATION OF BACTERIAL PLAQUE IN PERI-IMPLANTARY POCKETS AT NEWLY INSERTED IMPLANTS

The same as the periodontal disease, peri-implantitis are associated with the presence of some key pathogens. The present study tried to identify the patterns of bacterial colonization in periodontal pockets at newly installed implants, in patients with history of periodontal disease.

**Material and methods:** In this study the colonization of newly created peri-implantary pockets was followed in 22 patients treated by implant surgery. For each patient, 4 probes of subgingival plaque were taken from shallow and medium pockets around implants (test sites) and teeth from the same quadrant (control sites) at 1, 2, 4, 12 and 74 weeks after connection to prosthetic fix elements. The probes were analyzed either through DNA hybridization methods, or through cultivation methods.

**Results:** DNA hybridization revealed a complex microbiota in peri-implantary pockets in the first 2 weeks after connection to prosthetic fix elements. After 7 days, the detection frequency for most species was already almost identical in the fresh peri-implantary pockets when compared with probes from the reference teeth.

**Conclusions:** The study actually indicates that, initially, the colonization of fresh peri-implantary pockets with bacteria associated to periodontal disease takes place in the first 1—2 weeks and afterwards it remains constant.

**Key words:** colonization, peri-implantitis, periodontitis

Valerian Nicolaescu,  
Conf. Dr. Univ. „Petre  
Andrei“ Iași, Facultatea  
de Medicină Dentară  
„Apollonia“

Miruna Damian,  
Doctorand UMF  
„Gr. T. Popa“ Iași,  
Parodontologie

Silvia Mârțu  
Prof. Dr. UMF  
„Gr. T. Popa“ Iași,  
Facultatea de Medicină  
Dentară, Parodontologie

## Rezumat

Scop La fel ca și boala parodontala, peri-implantitele sunt asociate cu prezenta unor patogeni cheie. Studiul de față a încercat să identifice tiparul colonizării bacteriene în șanțurile peri-implantare la implanturile proaspat instalate, la pacienți cu istoric de afectare parodontala.

**Material și metoda:** În acest studiu s-a urmărit colonizarea sulcusurilor nou create la 22 de pacienți edentați prin chirurgia implantară. Pentru fiecare pacient, au fost luate 4 probe de placă subgingivală din pungile superficiale și medii din jurul implanturilor (situri test) și dinții din același cadran (situri de control) la 1, 2, 4, 12 și 74 de săptămâni după conectarea la elementele protetice fixe. Probele au fost analizate fie prin metoda de hibridizare ADN, fie prin tehnici de cultivare.

**Rezultate:** Hibridizarea ADN a relevat o microbiotă complexă în pungile peri-implantare în primele 2 săptămâni după conectarea la elementele protetice fixe. După 7 zile, frecvența detectării pentru majoritatea speciilor era deja aproape identică în probele de la pungile peri-implantare proaspete atunci când erau comparate cu probele de la dinții de referință.

**Concluzii:** Studiul indică faptul că, inițial, colonizarea pungilor peri-implantare cu bacterii asociate cu boala parodontală are loc în timp de 1—2 săptămâni, după care rămâne constantă.

**Cuvinte cheie:** colonizare, peri-implantita, parodontita

## Introducere

Șanțurile peri-implantare sănătoase sunt caracterizate printr-o proporție crescută de atliif cocoide, un procent scăzut de specii anaerobe/aerobe, un număr scăzut de specii gram negative și o detectare scăzută de bacterii atliif z cu boala parodontală (Adell și col., 1986). Implanturile cu peri-implantită relevă o micro-

biotă complexă care include patogenii parodontali convenționali. Specii cum ar fi *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium* și *Capnocytophaga* sunt frecvent izolate din situsurile care eșuează, dar pot fi de asemenea detectate în jurul implanturilor stabile (Leonhardt și col., 2002, 2003).

La pacienții parțial edentați, a putut fi observată o similaritate izbitoare în compoziția microbiotei subgingivale între dinți și implanturi (Lekholm și col., 1986). Bazat pe această similaritate, a fost sugerat că, cel puțin la pacienții parțial edentați, dinții pot acționa ca un rezervor pentru (re)colonizarea regiunii subgingivale din jurul implanturilor.

Acest studiu prospectiv, longitudinal, a comparat, la pacienții parțial edentați, microbiota pe cale de maturare în sulcusurile peri-implantare proaspete (situsuri test) cu placă subgingivală nemodificată a dinților din același cadran (servind ca situsuri de referință/control), utilizând fie hibridizarea ADN (până în săptămâna 12), sau cultivarea. Probele la intervale de timp mai lungi (de ex., săptămâna 74 după intervenția chirurgicală) au fost incluse pentru a verifica stabilitatea pe termen lung a microbiotei subgingivale.

### Material și metode

22 de pacienți parțial edentați (10 femei, 4 fumatori) s-au încadrat voluntar în acest studiu. Aceștia primiseră anterior cel puțin 2 implanturi de două stadii, sistemul Branemark (Nobel Biocare, Gothenburg, Suedia) pentru tratarea edentației parțiale fie de la mandibulă (n=17), fie de la maxilar (n=25). Toți subiecții aveau o stare generală bună și nici unul dintre ei un folosise substanțe antimicrobiene în cele 3 luni înaintea intervenției chirurgicale.

Majoritatea pacienților aveau un istoric de gingivită sau de boală parodontală cronică a adultului în forma ușoară până la moderată care fusese tratată prin metode de îmbunătățire a igienei orale (în special controlul plăcii interdentală), detartraj și dacă era necesar surfasaj radicular (n=15 pentru cel din urma). Unii pacienți primiseră tratamente de chirurgie parodontală (n=4), majoritatea (n=3) cu mai mult de 2 ani înaintea acestui studiu.

Toți pacienții și-au dat consimțământul scris.

La 3 până la 8 luni după inserarea implantului, au fost inserate cape de cicatrizare, utilizând fie o incizie crestală, fie alta tehnica. Capele de cicatrizare, realizate din titan pur comercializat, erau sterile la instalare și aveau o lungime de la 4 la 7 mm, în funcție de grosimea țesuturilor moi. Elementele de agregare fie nu au fost încărcate în prima lună, fie au avut microproteze sau lucrări provizorii. Doar în a doua sau în a treia lună au fost plasate elementele de agregare definitivă și microprotezele și aparatele gnato-protetice finale, astfel încât formarea plăcii subgingivale în prima lună a rămas nemodificată. La 2, 4, 12 și 64 de săptămâni (la toți subiecții) au fost luate probe de placă bacteriană

de la implanturi (situsuri test) și dinți (pungi parodontale de referință/situsuri de control cu placă nemodificată) în cadrul aceiași maxilar.

### Parametri parodontali

Situsurile dentare au fost selectate în funcție de adancimile de sondare de la ultimul control cu câteva luni înainte de chirurgia implantară. Valorile adâncimilor pungilor parodontale, ca și tendința de sângerare la sondare (1 dacă era prezentă sau 0 dacă era absentă) au fost verificate în săptămânile 2 și 64 pentru dinți și săptămâna 64 pentru implanturi. Adancimea pungilor parodontale a fost înregistrată până la cel mai aproape milimetru cu sonda Merrit B (Hu-Freidz, Chicago, IL). Sondarea a fost realizată după prelevarea de placă.

După curățarea supragingivală amănunțită și izolarea situsurilor, placa subgingivală a fost colectată utilizând conuri de hârtie, cu două conuri de hârtie per pungă pentru fiecare analiză microbiologică. Conurile de hârtie au fost inserate pentru 10 secunde în fiecare situs test selectat. Primele două erau întotdeauna utilizate pentru analiza de hibridizare, următoarele două pentru cultivare. În această investigație au fost utilizate conuri de hârtie în locul instrumentelor de detartraj datorită preocupării de a nu leza țesuturile cu implanturi plasate recent și datorită dificultății de abordare a zonei subgingivale a implanturilor cu instrumentele de detartraj.

Conurile de hârtie pentru analiza de hibridizare I de detectare a nivelului celor 40 de specii microbiene subgingivale (Socranski și col., 1994) au fost plasate în tuburi Eppendorf separate conținând 0,15 ml TE (10mM Tri-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,6) la care s-au adăugat 0,15ml de NaOH 0,5M pentru fixare.

Conurile de hârtie au fost dispersate în Fluid de Transport Redus (Syed și Loesche, 1973), omogenizate prin centrifugare pentru 30 de secunde și procesate în 24 de ore. Diluțiile  $10^{-1}$  —  $10^{-5}$  au fost aplicate pe plăci de cultură agar-sânge neselectiv (Blood Agar Base II, Oxoid, Basingstoke, Anglia), suplimentate cu hemină (5 mg/l), menadionă (1mg/l) și 5 % sânge de cal steril. După 7 zile de anaerobioză (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> și 10% H<sub>2</sub>) și atliiff ze incubare aerobă la 37°C, numărul total de unități formatoare de colonii (UFC/ml) a fost determinat. Pentru fiecare tip de colonie pe plăcuțele reprezentative anaerobe, fiecare a treia colonie a fost subcultivată și identificată. De pe plăcuțele originale agar-sânge, numărul de UFC/ml de *P. micros* a fost de asemenea atliiff în funcție de morfologia tipică a coloniei. Diluția de  $10^{-1}$  —  $10^{-5}$  a fost de asemenea realizată pe 3 medii selective: un mediu Hammond pentru detectarea *C. rectus* (Hammond 1998), un mediu CVE pentru detectarea *Fusobacterium nucleatum* (Walker și col. 1979) și un mediu înalt atliiff z pentru detectarea *A. actinomycetemcomitans* (Alsina și col. 2001).

Odată ce testul Perio Diagnostics (Meridol, Gaba Dental, Münchenstein, Elveția) a putut fi comercializat, au fost colectate probele (de la ultimii 9 pacienți) pentru testul PCR în timp real, identificând prezența *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *Treponema denticola*, *F. nucleatum* și *P. intermedia*.

## Rezultate:

### Parametri clinici parodontali

Majoritatea parametrilor au rămas nemodificați în timp ( $P > 0,10$ ). Între pungile superficiale și medii, în cadrul situsurilor dentare și la un nivel mai redus în cadrul situsurilor atlif ze, atlif mai mari au fost frecvent înregistrate pentru situsurile mai adânci, în special sângerarea la sondare, indicele de placă și adâncimea pungilor parodontale ( $P \leq 0,005$ ); ultimul parametru putând fi explicat, evident, prin valorile limită considerate în selecția diferitelor situsuri.

### Observații microbiologice pe termen lung

Diferențele între implanturi și dinți au fost reduse, indiferent de adâncimea punții și momentul temporal. Modificările în timp a numărătorii pentru pungile peri-implantare au fost neglijabile.

Datele pentru situsurile dentare s-au modificat puțin în timp, pungile moderate arborând mai multe membre ale complexelor roșu și portocaliu decât pungile superficiale ( $P < 0,01$ ). Diferențele în compoziția pungilor peri-implantare atlif ze și moderate au fost reduse. Ambele, totuși, indicau o creștere a numărului multor specii aparținând complexelor roșu și portocaliu în timp, pentru a ajunge la valorile obținute în pungile parodontale atlif ze în săptămâna 12. După ajustare pentru comparații multiple, s-au găsit diferențe semnificative între probele diferitor locații pentru subspeciile *F. nucleatum*, *T. forsythia* și *P. gingivalis* în săptămânile 2 și 4, dar nu în săptămâna 12. Când s-a făcut o comparație pentru punți  $\geq 5$  mm în dentiția atlif ( $n=7$ ), nu au putut fi detectate diferențe evidente în microbiota pungilor peri-implantare.

În săptămâna 2, placa subgingivală în pungile peri-implantare nou create a manifestat atli o microfloră atlif cu proporții mari ale membrilor complexelor roșu ( $\pm 7\%$ ) și portocaliu ( $\pm 26\%$ ). Proporția pentru complexe diferite a arătat doar modificări minore în timp. Proporția relativă a complexelor diferite pentru implanturi seamănă cu microbiota stabilită în jurul dinților cu punți  $\leq 4$  mm. Dinții cu punți mai adânci au arborat totuși o proporție mai mare a speciilor din complexul roșu ( $\pm 16\%$ ). Numărători  $\geq 105$  pentru membrii complexelor roșu și portocaliu au rămas stabile în jurul dinților (22% și 15% pentru pungile superficiale, 40% și respectiv 27% pentru pungile moderate), dar au arătat o creștere clară în timp pentru probele de la implanturi (3% vs.12% vs.15% și 4% vs.9% vs.15% pentru pungile superficiale; 8% vs.12% vs.21% și 11% vs.12% vs.13% pentru punți moderate în săptămânile 2, 4 și 12 pentru complexul roșu și respectiv complexul portocaliu).

Numărul patogenilor cheie în pungile superficiale din jurul dinților și implanturilor a fost comparat unul cu celălalt pe interval de timp, utilizând analiza de regresie. În săptămânile 2, 4 și 12, corelația a fost slabă ( $r^2=0,35$ ). În săptămâna 13, totuși, numărul patogenilor cheie din jurul implanturilor s-a apropiat de valoarea corespunzătoare dinților (implanturile au arborat 50% din nivelul de placă în jurul dinților,  $r^2=0,35$ ).

Numărul bacteriilor cultivate în condiții de aerobioză sau anaerobioză în probele din pungile peri-implantare au demonstrat doar o creștere minoră între săptămânile 2 și 3 ( $P > 0,05$ ). Ulterior, modificările au fost neglijabile. Diferența dintre pungile peri-implantare cu adâncimi reduse sau medii a fost minimă, acestea din urmă arborând mai multe bacterii, cu excepția săptămânii a doua, unde diferența a fost ușor mai mare ( $P < 0,01$ ). În general, încărcătura microbiană în jurul implanturilor a corespuns bine cu aceea din jurul dinților cu punți atlif ze, dar a fost întotdeauna mai mică decât încărcătura microbiană din jurul dinților cu punți mai adânci. Raportul specii anaerobe/aerobe a fost atlif constant ( $\leq 3$ ) pentru ambele tipuri de punți peri-implantare ca și pentru dinții cu punți reduse. Pentru dinții cu punți mai adânci, această valoare a fost ușor mai mare ( $\leq 6$ ).

### Observații microbiologice: pe termen scurt

*Hibridizarea ADN: colonizarea precoce: I săptămână vs. Săptămâna a 2-a (19 pacienți)*

În săptămânile 1 și 2, pungile peri-implantare proaspete arborau deja membri ai complexelor roșu ( $\pm 5\%$ ) și portocaliu ( $\pm 20\%$ ). Numărători  $\geq 105$  pentru membrii complexelor roșu și portocaliu au fost mai frecvent observate în jurul dinților (15% și 12% pentru pungile superficiale, 40% și 22% pentru pungile moderate), dar au rămas relativ scăzute pentru probele de la implanturi (0-0% și 0-2% pentru pungile superficiale, 2-2% și 4-5% pentru pungile moderate în săptămânile 1—2, pentru complexul roșu și portocaliu).

### Discuții:

În acest studiu s-a demonstrat că în prezența dinților (edentație parțială), se stabilește o microbiotă subgingivală complexă în pungile peri-implantare proaspete până într-o săptămână. Într-adevăr, după 7 zile de colonizare (chiar și când se utilizează clătiri orale cu clorhexidină) hibridizarea ADN, a relevat proporții mari ai patogenilor cheie în pungile peri-implantare proaspete. Această microbiotă a apărut în situsurile peri-implantare, fie că erau superficiale sau adânci. Începând cu săptămâna a 2-a, au fost observate doar creșteri minore ale numărului total de specii, cu o compoziție proporțională aproape neschimbată, cu excepția membrilor complexelor roșu și portocaliu, pentru care a putut fi observată o creștere ulterioară până în săptămâna 12. În săptămâna 12, pungile peri-implantare au arborat aproape 50% din cantitatea patogenilor cheie (ca număr) observați în jurul dinților.

Din moment ce majoritatea patogenilor dispar spontan după extracția tuturor dinților, este sugerat că dinții servesc drept rezervor „primar” pentru bacteriile asociate cu boala parodontală în cavitatea orală, de la care sunt colonizate și alte nișe (Quinrynen și col. 2001). Similaritatea pregnantă dintre profilele microbiologice din jurul dinților și a implanturilor întăresc ipoteza că dinții acționează ca rezervoare pentru colonizarea implanturilor. Într-adevăr, studii

de la începutul anilor '90, ale lui Apse și col (1989) și Quirynen & Listgarten (1990) au ilustrat faptul că încărcătura microbiană din jurul implanturilor este dependentă de prezența dinților. Similaritatea în microbiota între dinți și implanturi la pacienții edentați parțial a fost confirmată prin câteva studii în comparație cu microbiota între ambele tipuri de stâlpi la 6 luni sau mai târziu după conectarea elementului de agregare. Au putut fi detectate doar modificări minore ale frecvențelor de detectare ale speciilor patogene între ambele tipuri de stâlpi. Sumida și col. (2002) au comparat microbiota de la implanturi și dinți la pacienții edentați parțial și au găsit similarități intra-subiect marcante în electroforeza cu gel în câmp pulsat a patogenilor cheie, dar variații mari intra-subiect.

Prezența patogenilor cheie nu pune neaparat în pericol viitorul implanturilor. Hultin și col (2002) au concluzionat că în legătură cu peri-implantita este cantitatea relativă și nu simpla prezență a acestor patogeni. Într-adevăr, nici unul dintre situsurile implantare sănătoase nu a atins un nivel >106 pentru patogenii cheie individuali în contrast cu situsurile cu peri-implantită (35—88% din situsuri pozitive pentru diferite specii țintă). Observații similare au fost făcute și de Leonhardt și col (2002), care au urmărit pacienții edentați parțial reabilitați cu implanturi Brånemark, pentru o perioadă de până la 10 ani. Nici ei nu au putut să observe o diferență în rezultatele clinice între implanturile pozitive sau negative pentru bacteriile patogene cheie asociate cu boala parodontală.

În această investigație, observația colonizării unei suprafețe dure sterilă plasată subgingival de către o microbiotă complexă în câteva zile a fost neașteptată. Dacă aceasta a fost legată de mediul special oferit de cheagul sanguin, o situație similară aceleia de după detartrajul mecanic al pungilor parodontale, necesită cercetări ulterioare.

#### **Concluzii:**

Acest studiu a arătat că bacteriile asociate cu boa-

la parodontală pot coloniza pungile peri-implantare într-o săptămână. Numărul lor a fost relativ scăzut inițial, dar a apărut a avea un nivel stabil după 3 luni.

#### **Bibliografie:**

1. Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B., Brånemark, P.-I., Lindhe, J., Eriksson, B., Sbordone, L. (1986) Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (I). A 3-year longitudinal prospective study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 15: 39-52
2. Alsina M., Olle E., Frias J. (2001). Improved low-cost selective culture for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 509-513.
3. Apse, P., Ellen, R.P., Overall, C.M. & Zarb, G.A. (1989) Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *Journal of Periodontal Research* 24: 96-105
4. Hammond B. F. (1988) A selective/differential medium for *Wolinella recta*. *Journal of Dental Research* 67: 327.
5. Hultin, M., Gustafsson, A., Hallstrom, H., Johansson, L.A., Ekfeldt, A. & Klinge, B. (2002) Microbiological finding and host response in patients with peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research* 13: 349-358.
6. Leonhardt, A., Bergstrom, C & Lekholm, U. (2003) Microbiologic diagnostics at titanium implants. *Clinical Implant Dental Related Research* 5: 226-232.
7. Leonhardt, A., Grondahl, K., Bergstrom, C. & Lekholm, U. (2002) Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters. *Clinical Oral Implants Research* 2: 127-132.
8. Lekholm, U., Adell, R., Lindhe, J., Brånemark, P.-I., Eriksson, B., Rockler, B., Lindvall, A.-M., Yoneyama, T. (1986) Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II). A cross-sectional retrospective study *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 15: 53-61
9. Quirynen, M., De Soete, M., Dierickx, K., van Steenberghe, D. (2001) The intra-oral translocation of periodontopathogens after the outcome of periodontal therapy. *Journal of Clinical Periodontology* 28: 499-507.
10. Quirynen, M. & Listgarten, M.A. (1990) The tribution of bacterial morpho types around na teeth and titanium implants ad modum Br-mark. *Clinical Oral Implants Research* 4: 8-12.
11. Walker, C.B., atliff, D., Muller, D., Mandell R., Socransky, S.S. (1979) Medium for selective isolation of *Fusobacterium nucleatum* from human periodontal pockets. *Journal of Clinical Microbiology* 10: 844-849.

*Prezentat la 28.06.2007*