

STUDIUL MICROBIOLOGIC AL EFECTULUI VACCINULUI STAFILOCOVIC ÎN PARODONTITĂ

Microbiological study regarding the effect of staphylococcal vaccine in periodontitis

Dr. Carmen Georgescu, Dr. T. Georgescu, Prof. Dr. Horia Traian Dumitriu
Universitatea de Medicină și Farmacie „Titu Maiorescu” București

REZUMAT

Scopul studiului a fost evaluarea efectului imunomodulator al vaccinului stafilococic inoculat subcutan la 15 pacienți cu parodontopatie cronică.

Investigațiile bacteriologice ale probelor colectate din pungă parodontală pentru germeni aerobi și anaerobi (120 de analize; 60 pentru germeni aerobi și 60 pentru germeni anaerobi) au fost făcute prin proceduri bacteriologice clasice, înainte și după vaccinare, în laboratoarele I.C. Institutul Național Cantacuzino.

Analizele microbiologice au arătat o frecvență mare a *Staphylococcus* spp alături de agenții bacterieni anaerobi obișnuiți incriminați în boala parodontală ca *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella* spp, precum și reducerea acestei flore din pungă parodontală după tratament.

Datele prezentate în studiul nostru sugerează un efect imunomodulator al vaccinului stafilococic și reducerea stafilococului din pungile parodontale ale subiecților investigați.

Cuvinte cheie: parodontologie, parodontită, tratament imunomodulator, microbiota pungii parodontale, vaccin stafilococic

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the immunomodulatory effect of the staphylococcal vaccine inoculated subcutaneous in 15 patients with chronic periodontitis. Bacteriological investigation of samples collected from the periodontal pocket for aerobic and anaerobic microorganisms was performed by classic bacteriological procedures before and after vaccination.

The microbiological investigations revealed high frequency of *Staphylococcus* spp isolation and the presence of the most common anaerobe agents incriminated in human periodontitis like *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella* spp and the reduction of this flora in the periodontal pocket after therapy.

The data presented in our study suggest an immunomodulatory effect of staphylococcal vaccine therapy in periodontitis and high frequency of *Staphylococcus* spp recovering from the periodontal pocket of investigated subjects.

Key words: periodontology, periodontitis, immunotherapy, microflora of pockets, staphylococcal vaccine

Pe majoritatea suprafețelor dinților sunt o mulțime de bacterii care formează o structură complexă numită biofilm. În timp ce majoritatea lor sunt comensale, o parte din ele sunt patogeni oportuniști, putând fi implicate în infecții orale, cum ar fi cariile și parodontopatia, dar și în boli sistemice.

Studiile epidemiologice arată că 15% din populație suferă de forme moderate sau grave de parodontopatie. Boala cronică parodontală este caracterizată prin infiltrația mononucleară a țesutului gingival urmată de distrucția țesutului conjunctiv și resorbția osului alveolar. Agenții cauzali ai

parodontopatiilor sunt microbieni, dar progresia și severitatea bolii depind de răspunsul imun al gazdei. Terapie actuală a parodontopatiei urmărește supresia sau eradicarea patogenilor parodontali cu menținerea postratament a florei comensale. Administrarea orală a agenților antimicrobieni duce adesea la dezechilibrarea florei microbiene bucale și intestinale. De asemenea, folosirea agenților antimicrobieni duce la creșterea rezistenței medicamentoase, astfel că administrarea produsului „vaccin stafilococic D”, după părerea noastră, reprezintă alternativa oportună de tratament.

Adresă de corespondență:

Dr. Carmen Georgescu, Universitatea de Medicină și Farmacie „Titu Maiorescu”, Strada Gheorghe Petrașcu Nr. 67A, București

Scopul acestui studiu a fost acela de a detecta, prin proceduri microbiologice clasice, prezența *Staphylococcus spp* și a germeilor anaerobi în punga parodontală, precum și de a investiga imunitatea celulară și umorală a pacienților înainte și după administrarea vaccinului. În comunicarea de față sunt prezentate rezultatele bacteriologice ale studiului.

MATERIALE ȘI METODE

Subiecți: au fost luați în studiu 15 subiecți cu parodontopatie, 5 subiecți de sex masculin și 10 subiecți de sex feminin, cu vârste cuprinse între 35-70 ani și 8 voluntari clinic sănătoși, cu igiena orală bună, care au constituit lotul martor. Pacienții n-au folosit antibiotice și au fost tratați numai prin inocularea cu vaccin stafilococic, care conține 15 tulpini de stafilococ auriu, produs de INCDMI sub denumirea comercială de „Vaccin stafilococic D”. Analizele microbiologice și imunologice au fost făcute înainte și la o săptămână după administrarea vaccinului. În total au fost efectuate 120 de analize; 60 pentru germeni aerobi și 60 pentru germeni anaerobi.

Recoltarea probelor

Produsul patologic din punga parodontală de la pacienți s-a efectuat în dublu, cu ansa bacteriologică și cu meșe special pregătite pentru a fi introduse în punga parodontală cu ace Miller. Sângele venos a fost recoltat aseptice pe vacutainere specifice fără anticoagulant pentru ser și cu anticoagulant ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) pentru citometrie în flux.

Izolarea bacteriilor

Din produsul patologic recoltat au fost pregătite frotiuri colorate Gram. Identificarea germeilor din genul *Staphylococcus* și a cocilor gram pozitivi anaerobi sau facultativ anaerobi, a fost realizată prin însămânțarea produsului patologic pe medii selective (mediile hiperclorurat solid și hiperclorurat lichid) și pe mediu agar nutritiv cu adaos de sânge de berbec. Identificarea a fost efectuată prin testul catalazei pentru diferențierea *Fam. Micrococaceae* de *Streptococaceae* (pozitiv pentru *Micrococaceae*). *Staphylococcus aureus* a fost diferențiat de alți *Staphylococcus spp* pe baza testului coagulazei. Pentru diferențierea speciilor de stafilococ au fost utilizat sistemul de galerii API STAPH. Catalogul a ajutat pentru diferențierea următoarelor specii de *Staphylococcus* (2,5,8,9).

Pentru identificarea germeilor anaerobi, însămânțarea a fost efectuată în condiții de anaerobioză

pe medii uzuale neselective (bulion VF cu acid tiogliconic regenerat) și pe medii selective (geloza sânge, Nagler și bila cu antibiotice: Kanamicin 1.000 mg/ml, Neomycin 25 mg/ml, Polymixin 100 U/ml). Germenii strict anaerobi au fost identificați biochimic folosind galeria API 20 A (16,24,26).

REZULTATE

Examinarea bacteriologică a produselor biologice recoltate din punga parodontală de la cei 15 pacienți studiați a fost efectuată înainte și după instituirea tratamentului cu vaccin stafilococic corpuscular. Nu au existat diferențe între probele recoltate cu ansa sau meșa de la același pacient. În Tabelul 1 sunt prezentate rezultatele examinărilor microbiologice.

TABELUL 1. Speciile bacteriene izolate din punga parodontală la subiecții luați în studiu înainte și după tratamentul cu vaccin stafilococic corpuscular

Nr. crt.	Înainte de administrarea vaccinului stafilococic	După
1	<i>Porphyromonas asacharolitica</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
2	<i>Bacteroides fragilis</i>	Nu s-a dezvoltat floră bacteriană
3	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Nu s-a dezvoltat floră bacteriană
5	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
6	Nu s-a dezvoltat floră bacteriană	Nu s-a dezvoltat floră bacteriană
7	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	Nu s-a dezvoltat flora bacteriană
8	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Veillonella parvula</i>	<i>Veillonella parvula</i>
9	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Bacteroides fragilis</i>
10	<i>Staphylococcus capitis</i>	Nu s-a dezvoltat flora bacteriană
11	<i>Bifidobacterium sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>
12	<i>Bifidobacterium sp.</i> <i>Streptococcus viridans</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i> <i>Streptococcus viridans</i>
13	<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Streptococcus viridans</i>
14	<i>Bifidobacterium sp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>
15	<i>Fusobacterium mortiferum</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i> <i>Streptococcus viridans</i>

La un pacient nu s-a dezvoltat floră nici înainte, nici după administrarea tratamentului. Înainte de administrarea vaccinului stafilococic, la majoritatea pacienților (57%) au fost identificați doi germeni fie strict anaerobi, fie în asociere cu coci gram

pozitivi aerobi facultativ anaerobi. Bacterii din genul *Staphylococcus spp.* au fost izolate de la 9 pacienți (64%), fie singuri, fie în asociere cu bacterii anaerobe. *Staphylococcus aureus* a fost identificat la 2 subiecți și la un subiect a fost indentificat numai *Streptococcus viridans*. Tot la 9 dintre pacienți (64%) înainte de tratament au fost izolate bacterii strict anaerobe în majoritatea cazurilor în asociere cu bacterii facultativ anaerobe. După administrarea terapiei cu vaccin stafilococic s-a observat reducerea florei bacteriene izolate din puna parodontală, cu absența dezvoltării florei din speciile izolate la 5 dintre pacienți (33%). *Staphylococcus aureus* nu a mai fost izolat după terapie. La 6 dintre subiecți (40%), flora izolată după vaccinare a fost identică cu cea anterioară, iar la unul dintre pacienți flora identificată a fost diferită de cea anterioară.

DISCUȚII

Parodontopatia este o inflamație cronică declanșată de o infecție bacteriană a cărei terapie se asociază frecvent în timp cu rezistența la antibiotice. Astfel, o modalitate de abordare terapeutică a bolii o reprezintă imunizarea cu vaccin stafilococic corpuscular D, alcătuit din 15 tulpini selectate din specia *Staphylococcus aureus*. Studiile clinice anterioare efectuate au evidențiat eficacitatea acestei terapii după o schemă terapeutică originală.

La pacienții investigați, examenul microbiologic efectuat din puna parodontală înainte de vaccinare a arătat detectarea la majoritatea subiecților a doi

germeni bacterieni preponderent anaerobi în asociere cu germeni aerobi. S-a observat o frecvență crescută a stafilococilor coagulazo-negativi, iar în două cazuri s-a identificat *Staphylococcus aureus*. Flora anaerobă detectată a fost, de asemenea, identificată în majoritatea cazurilor ca fiind din genul *Fusobacterium Bacteroides, Bifidobacterium, Porphyromonas, Peptostreptococcus, Veillonella*, descriși în literatură ca cei mai întâlniți germeni implicați în boala parodontală. Dintre cocii gram pozitivi a fost identificat *Streptococcus viridians*. Aceste date arată o frecvență crescută a bacteriilor din genul *Staphylococcus spp* la subiecții investigați, deși investigații anterioare efectuate în România și în străinătate arătau o frecvență crescută a bacteriilor *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia* și *Fusobacterium nucleatum*.

Administrarea terapiei cu vaccin stafilococic a evidențiat reducerea florei bacteriene izolate din puna parodontală. *Staphylococcus aureus* nu a mai fost izolat, iar la 33% dintre pacienți nu a mai fost izolat flora anterior detectată. Totuși, la 40% din pacienți, flora izolată după vaccinare a fost identică cu cea anterioară.

Precizare

Acest studiu a fost susținut de Ministerul Educației și Cercetării, având ca suport grantul Viasan 333.

Director de program: T. Georgescu

Titular de contract: Universitatea Titu Maiorescu București

Partener: Inst. Cantacuzino. București

BIBLIOGRAFIE

1. Ali R.W., Velcescu C., Jivănescu M.C., Lofthus B., Skaug N. – Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients, *J. Clin., Periodontol.*, 23(2), 133-139, 1996
2. Baird-Parker A.C. – The Staphylococci: In introduction. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, pp. 1s – 8s, 1990
3. Buiuc Dumitru, Neguț Marian – *Tratat de microbiologie clinică*, Ed. Medicală 1999
4. Chung Whasun O., Dale Beverly A. – Innate Immune Response of Oral and Foreskin Keratinocytes: Utilization of Different Signaling Pathways by Various Bacterial Species. *Infect Immun.*, 72(1): 352-358, 2004
5. Codiță I., Dorobăț O. – An update on the antibiotic resistance of staphylococci, *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.*, 43(1-2), 69-79, 1998
6. Consensus report on periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. *Ann Periodontol* 1996; 1:926-932
7. Dahlen G. – Role of suspected periodontopathogens in microbiological monitoring periodontitis. *Adv. Dent. Res.*, 2: 163-174, 1993
8. Dumitriu H.T. – *Parodontologie*, Ed. Viața Medicală Românească, ediția V-a, București, 2009
9. Dumitriu Silvia, Dumitriu H.T. – Etiologia microbiană în parodontitele marginale cronice. Profilaxie și tratament antimicrobian. Ed. Cerna, București, 1996
10. Dumitriu Silvia, Băncescu Gabriela, Skaug N., Zamfirescu M. – Bacili isolated from buccal abscesses. *Abstracts. Intern. Conference on bacilli*, 1997, Lausanne
11. Dumitriu Silvia, Băncescu Gabriela, Murea Anca, Skaug N. – Isolation and speciation of Prevotella strains from periodontal abscesses. *Rom. Arch Microbiol. Immunol.* 1998; 1:5-10
12. Dumitriu Silvia, Băncescu Gabriela, Murea Anca, Dumitriu H., Skaug N. – Specii de Prevotella izolate din abcese parodontale marginale. *Revista Națională de Stomatologie*, 1998; 8: 384-6
13. Dumitriu Silvia, Băncescu Gabriela, Țenea C., Defta Carmen, Alecu S. – Streptococii orali – clasificare, caracteristici, rol în patologie, *Medicina modernă*, 1998: 8:384-6
14. Edlund C., Hedberg M., Nord C.E. – Antimicrobial treatment of periodontal diseases disturbs the human ecology: a review., *J. Chemoter.* 8(5), 331-341, 1996
15. Gafar M., Georgescu T., Dumitriu H., Codiță I., Neguț M. – The role of the staphylococcal infectious-allergic process in chronic marginal periodontal diseases, and specific therapeutic possibilities with staphylococcal vaccine. Preliminary note. *Rev. Chir. Oncol. ORL. Oftalmol. Stomatol., Ser. Stomatol.*, 34, (1), 1-10, 1987
16. Georgescu T. – Modularea răspunsului imun cu vaccin stafilococic în boala parodontală. 96-103;108-126; 187- 193, Ed. Universității din Pitești, 2004

17. Grenier D., Michaud J. – Demonstration of human immunoglobulin G Ec-binding activity in oral bacteria., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1(2), 247-249, 1994
18. Laki D., Georgescu T., Codiță I. – Anatomoclinical and bacteriological study on chronic marginal periodontal disease. Therapy with staphylococccic vaccine, *Rom. J. Morphol. Embryol.*, 42 (3-4), 169-178, 1996
19. Marcotte Harold, Lavoie Marc C. – Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 62(1): 71-109, 1998
20. Moore W.E., Holdeman L.V., Cato E.P., Smibert R.M., Burmeister J.A., Ranney R.R. – Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun.*, 42(2): 510-515, 1983
21. Moore W.E., Holdeman L.V., Smibert R.M., Good I.J., Burmeister J.A., Palcanis K.G., Ranney R.R. – Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect Immun.*, 38(2): 651-667, 1982
22. Nair S.P., Meghji S., Wilson M., Reddi K., White P., Henderson B. – Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun.*, 64(7): 2371-2380, 1996
23. Olinescu A., Radu D.L., Dolganiuc Angela – Immunological studies by phenotyping tests and functional analysis at the cellular level in populations of children from 2 different communities. *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.*, 42:225-228, 1997
24. Page R.C. – Vaccination and periodontitis: myth or reality. *J. Int. Acad. Periodontol.*, 2: 31-43, 2000
25. Paster B.J., Boches S.K., Galvin J.L., Erickson R.E., Lau C.N. Levanos V.L. Sahasrabudhe A, Dewhirst F.L. – Bacterial diversity in human subgingival plaque, *L of Bacteriol*, 183 (12), 3770-3782, 2001
26. Stavaru Crina, Dumitrescu Viorica, Lemeni Daniela, Georgescu T., Codita Irina, Radu D.L. – Microbiological and immunological study of *Staphylococcus* vaccine effects in periodontitis, *Rom. Arch. Microbiol. Immunol*, 11-16, 1-4, (64), 2005
27. Yamazaki K., Ohsawa Y., Tabeta K., Ito H., Ueki K., Oda T., Yoshie H., Seymour J.G. – Accumulation of human heat shock protein 60-reactive T cells in the gingival tissues of periodontitis patients. *Inf. Immun.*, 70: 2492-2501, 2002