

Stefano Accorsi
 Giorgio Lavagnoli
 Stefano Frigeri
 Luigino Fiamminghi

Università degli Studi di Parma
 Corso di laurea in Odontoiatria e
 Protesi Dentaria
 Cattedra di Odontoiatria Conservatrice
 Prof. L. Fiamminghi

L'infezione mista: aspetti specifici a livello canalare

The mixed infection in the root canal system and its particular characteristics

RIASSUNTO

Caratteristica fondamentale dell'infezione endodontica è di esser costituita da flora mista.

La presenza di flora mista ha dimostrato sperimentalmente maggiore capacità di dare luogo a reazioni infiammatorie sia acute che croniche.

La convivenza di diverse specie batteriche nello stesso ambiente segue le regole dettate dai vari tipi di relazione interbatterica: il mutualismo (simbiosi e commensalismo) l'antagonismo ed il sinergismo.

Le specifiche necessità metaboliche (nutritive e respiratorie) delle varie specie batteriche coinvolte nell'infezione endodontica le rendono strettamente interdipendenti, sia dal punto di vista della sopravvivenza nel sistema dei canali radicolari che da quello della patogenicità.

Parole chiave: Batteriologia.

Infezione endodontica

SUMMARY

The fundamental feature of the bacteriologic flora that causes endodontic lesions is its mixed nature. It has been demonstrated that a mixed flora can more easily give rise to both acute and chronic inflammatory reactions. The coexistence of different families of bacteria within the same environment is based upon a very delicate balance given by the interplay of the various mechanisms of bacterial relationships: mutualism (symbiosis and commensalism), antagonism and synergism.

The metabolic needs (nutritive and respiratory) of the different types of bacteria which cause endodontic infections are so specific that these organisms are strictly dependent on each other for their own survival in the radicular canal system and for their pathogenicity.

Key words: Bacteriology.

Endodontic infection.

I dati emersi dall'analisi della letteratura a proposito delle caratteristiche quantitative e qualitative delle infezioni endodontiche, come del resto quelli relativi alle singole specie batteriche esposti in precedenti comunicazioni (1, 2), evidenziano in modo abbastanza netto il posto fondamentale che occupa l'infezione mista nell'eziopatogenesi delle periodontiti apicali. I risultati delle ricerche sono a questo proposito precisi e costanti a tal punto da non ammettere la formulazione di ipotesi alternative.

Il lavoro di Sundqvist del 1976 (3) evidenzia la presenza di flora mista in tutti i canali radicolari di quei denti che dimostravano radiologicamente segni di flogosi periapicale. I dati forniti da Williams e coll. (4) e da Ogunleby e coll. (5) relativi rispettivamente a prelievi eseguiti da ascessi odontogeni di origine endodontica e da periodontiti apicali di tipo purulento, evidenziano anch'essi la presenza di una flora di tipo misto. Altrettanto dicasi per i risultati del lavoro di Zavistoski e coll. (6) in cui i prelievi microbiologici furono eseguiti nei canali radicola-

ri di denti con necrosi pulpare, in presenza o meno di lesioni periapicali.

Si rende quindi evidente come esperienze condotte con metodiche simili ma differenti nelle zone di prelievo microbiologico, abbiano dimostrato una costante: la presenza di un'infezione di tipo misto. Questo dato si è dimostrato costante anche a prescindere dalla via di arrivo dei batteri, sia essa quella coronale o quella anacoretica.

Le ricerche ora rapidamente elencate costituiscono tuttavia soltanto un primo approccio alla conoscenza dell'infezione mista, nei confronti della quale non erano peraltro state intraprese in modo specifico.

Una più esauriente risposta ai postulati di Kock in tema di relazione tra flora batterica mista e reazioni infiammatorie di tipo acuto e cronico viene da due brillanti esperienze condotte pochi anni or sono.

Una di queste è stata condotta dal gruppo di Fabricius e Moller nel 1982 (7). Il lavoro si proponeva principalmente di verificare la capacità da parte di determinati gruppi di microrganismi, di causare periodontiti apicali; lo studio fu eseguito su 7 scimmie Ma-

caca *fascicularis*, delle quali vennero utilizzati 75 denti monoradicoliati completamente erotti. La preparazione del campo operatorio ed il controllo della sterilità venivano eseguiti con tecniche appropriate e la contaminazione poteva considerarsi nulla. Le specie batteriche utilizzate per la contaminazione dei 75 canali esposti erano state originariamente isolate, in una precedente esperienza condotta sempre su *Macaca fascicularis*, da canali naturalmente infettati dalla flora orale. La loro identificazione era avvenuta in base a: morfologia, reazione alla colorazione di Gram, sensibilità all'O e tests biochimici. I batteri vennero inoculati in diverse combinazioni ed in alcuni casi anche singolarmente, dopo di che furono eseguite otturazioni il più possibile ermetiche.

Trascorsi 6 mesi si eseguirono prelievi batteriologici dai canali, esame clinico ed esame radiografico (eseguito direttamente su tutte le regioni periapicali prelevate chirurgicamente dopo l'uccisione dell'animale). I risultati ottenuti sono descritti nella Tab. I, che mette in relazione il responso batteriologico con il risultato dell'esame radiografico.

Accorsi S, Lavagnoli G, Frigeri S, Fiamminghi L. L'infezione mista: aspetti specifici a livello canalare. *G It Endo* 1990; 4: 14-25

Tab. 1

| Specie* batteriche | N. denti inoculati | N. denti in cui i batteri venivano reisolati | Risultati esame radiografico | | |
|---|--------------------|--|----------------------------------|-------|--------------------------|
| | | | Presenza les. periapicali > 1 mm | <1 mm | Assenza les. periapicali |
| B. oralis F. necrophorum F. nucleatum S. milleri S. faecalis P. anaerobius A. bovis P. acnes** | 12 | 12 | 11 | 1 | 0 |
| S. milleri S. faecalis A. bovis | 5 | 5 | 4 | 1 | 0 |
| B. oralis F. necrophorum P. anaerobius | 12 | 9 | 7 | 2 | 3 |
| B. fragilis P. acnes | 8 | 5 | 2 | 3 | 3 |
| B. melaninogenicus B. intermedius P. acnes | 8 | 6 | 4 | 2 | 2 |
| B. oralis | 9 | 0 | 0 | 0 | 9 |
| S. milleri | 9 | 6 | 3 | 1 | 5 |
| S. faecalis | 9 | 9 | 2 | 3 | 4 |
| P. anaerobius | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 |

* La combinazione 1 rappresenta la flora mista isolata da un canale di un incisivo laterale in precedente lavoro, mentre le combinazioni 2-3-4-5 sono state create artificialmente.

** P. acnes è stato reisolato soltanto 5 volte su 12.

Il caso N. 1 ci permette di considerare soddisfatto uno dei più importanti postulati di Kock, quello secondo cui i microrganismi isolati da una lesione e presunti responsabili di essa, per dimostrarsi veramente tali devono essere in grado, una volta inoculati e quindi messi in condizione di farlo, di determinare un analogo evento patologico. Infatti in tutti i 12 denti infettati tramite la flo-

ra prelevata da un dente con periodontite apicale, si è dimostrata presente un'analogha condizione patologica, spesso anche di una certa entità (11 lesioni periapicali su 12 erano maggiori di 1 mm di diametro). Si è inoltre dimostrata l'effettiva maggiore capacità da parte della flora batterica mista rispetto alle singole specie, nel determinare flogosi periapicali. A questo proposito è

estremamente interessante rilevare l'enorme variazione di comportamento del *B. oralis* all'interno della combinazione 1 ed inoculato singolarmente. Le analisi quantitative relative ai vari ceppi della combinazione 1 hanno infatti dimostrato che il *B. oralis* ne costituiva da solo più del 50%; contemporaneamente, nel caso di infezione singola, non veniva reisolato da alcuno dei 9 canali in cui

to di vista batteriologico ed istologico, quest'ultimo con particolare riferimento all'estensione ed alla qualità della risposta infiammatoria.

I dati ottenuti sono riportati nella Tab. 2.

I risultati dell'esame batteriologico confermarono globalmente quanto emerso dal lavoro di Dahlen e Moller, nonostante quest'ultimo facesse riferimento a prelievi eseguiti dopo un lasso di tempo molto maggiore (6 mesi). Queste analogie di risultati a dispetto dei diversi tempi di prelievo sono probabilmente legate alla diversità degli ambienti in cui si sono inoculati i batteri; tuttavia ciò non esclude in modo assoluto la

matorie di tipo granulomatoso con presenza di monociti, macrofagi, linfociti, isole di tessuto necrotico e rivestimento connettivale esterno.

La flora mista ha inoltre evidenziato capacità enormemente superiori alle singole specie nel determinare lesioni di tipo ascessuale, dimostrabili a 2, 5 e 13 settimane. È interessante notare che il massimo di formazione di ascessi si ha a 5 settimane: ciò probabilmente sta ad indicare che già a 13 settimane c'è una maggiore tendenza alla cronicizzazione della flogosi, con conseguente variazione dell'infiltrato cellulare.

Emerge quindi in modo più evidente da

era stato inoculato. Ciò a dimostrare ulteriormente la necessità di una flora mista affinché si creino le condizioni per la sopravvivenza e l'eventuale azione patogena da parte dei *Bacteroides*.

Un comportamento per molti versi opposto a quello del *B. oralis* viene mostrato da *S. milleri* e *S. faecalis*. Questi, nello studio quantitativo della combinazione 1, rappresentano rispettivamente il 4 e l'1% del totale. Nei casi invece in cui vengono inoculati singolarmente, dimostrano entrambi e soprattutto *S. faecalis*, notevoli capacità di sopravvivenza nell'ambiente canale anche in assenza di altre specie. Tuttavia l'attenta analisi dei dati ci dimostra che si tratta di specie a moderato indice di patogenicità per i tessuti periapicali, poiché sono descritti 6 casi (2 con *S. milleri* e 4 con *S. faecalis*) in cui alla presenza dei batteri all'interno dei canali non fa seguito alcuna patologia periapicale.

L'altro importante lavoro cui abbiamo accennato in precedenza è quello di Moorer e coll. del 1985 (8). Questo studio mette in luce molto chiaramente i diversi effetti patogeni determinati da flora mista e singole specie.

Vennero utilizzati 20 conigli, nei quali si impiantarono due tubi di polietilene ciascuno, a livello addominale, che presentavano una parete forata ed un diametro esterno di 4,5 mm. Gli autori preferirono impiantare i tubi privi di contenuto batterico, suturare ed attendere un periodo di tre settimane, al fine di limitare l'interferenza dell'infiammazione dovuta al trauma chirurgico con gli effetti determinati dai germi. Trascorse le tre settimane veniva eseguita una piccola incisione in corrispondenza del tubo precedentemente impiantato e si inniettava tramite una siringa il materiale batterico da esaminare. L'utilizzo dei tubi di polietilene forati non è causale, ma dovuto ad un ben preciso requisito, essi infatti rilasciano lentamente piccole quantità di materiale nei tessuti circostanti, simulando quindi abbastanza bene le condizioni dell'infezione canale ed i suoi effetti sui tessuti periapicali.

Si inniettarono queste soluzioni: brodo di coltura non infettato, soluzione idrosalina, *S. mitis*, *B. gingivalis*, *S. mitis*+*B. gingivalis*.

I risultati furono in seguito valutati dal pun-

Tab. 2

| Tipo di inoculo | Batteri vivi nei diversi prelievi | | | Estens. risp. flogistica | | | Formaz. lesioni ascessuali | | |
|--|-----------------------------------|----|----|--------------------------|-----|-----|----------------------------|----|----|
| | 2 | 5 | 13 | 2 | 5 | 13 | 2 | 5 | 13 |
| * Brodo di coltura non infetto | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Soluzione salina | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. mitis</i> | ++ | + | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>B. gingivalis</i> | ++ | + | - | + | + | + | - | - | - |
| <i>S. mitis</i> + <i>B. gingivalis</i> | ++ | ++ | + | +/++ | +++ | +++ | + | ++ | + |

* Settimana

possibilità che anche nei canali le infezioni da specie singole abbiano le stesse caratteristiche a 3 mesi come a 6. Lo *S. mitis* inoculato singolarmente dimostra discrete capacità di sopravvivenza risultando sempre presente, sebbene in quantità modeste, nei prelievi a 5 settimane; totalmente assente risultava invece nei prelievi a 13 settimane. Peggiori capacità di sopravvivenza dimostrava *B. gingivalis*, che veniva reisolato solo nella metà dei casi (2 su 4) a 5 settimane, ed in nessun caso a 13 settimane.

Decisamente aumentate risultano le capacità di sopravvivenza di entrambe le specie nell'infezione mista, in cui è stato possibile reisolarle in tutti i prelievi eseguiti.

Passando ora ai dati relativi all'entità della risposta infiammatoria, osserviamo situazioni ribaltate per quanto concerne le infezioni singole; infatti *B. gingivalis*, nonostante la maggiore difficoltà di sopravvivenza, si dimostra più patogeno di *S. mitis*, il quale pur essendo maggiormente rappresentato (a 2 settimane anche in quantità elevata) non è in grado di evocare alcuna risposta flogistica rilevabile.

Di notevole interesse è quanto osservato nelle reazioni indotte dalla flora mista. La risposta flogistica si è dimostrata forte ed estesa in tutti i casi, a prescindere dai diversi tempi considerati. In particolare, nei prelievi a 13 settimane, si sono osservate, nella zona di comunicazione tra il contenuto del tubo ed i tessuti dell'ospite, reazioni infiam-

questo studio, il ruolo primario ed essenziale della flora mista nella genesi sia delle lesioni infiammatorie di tipo ascessuale che di quelle di tipo granulomatoso, che spesso in Endodonzia rappresentano due eventi sequenziali di uno stesso processo patologico. Dopo aver stabilito con precisione le relazioni di causa-effetto esistenti tra flora batterica mista e reazioni flogistiche periapicali, passiamo ad analizzare più dettagliatamente le caratteristiche dei rapporti tra le diverse specie coinvolte nelle infezioni di tipo misto. Prima di trattare i problemi specifici relativi alla flora mista delle infezioni endodontiche, ci sembra opportuna una breve descrizione dei meccanismi generali che regolano qualunque rapporto tra diverse popolazioni batteriche che abbiano colonizzato uno stesso ambiente.

Un elemento essenziale alla vita di tutti gli organismi è l'assunzione di sostanze dall'ambiente esterno, la disponibilità delle quali condiziona in modo tassativo la scelta dell'ambiente in cui vivere. Risulta quindi ovvio come uno dei fattori ambientali più importanti che regolano il tipo ed il numero di specie batteriche presenti in un determinato ambiente è quello nutritivo. Ogni microrganismo potrà svilupparsi e prosperare solo in presenza di quelle sostanze delle quali ha necessità e che possono essergli fornite sia dall'organismo ospite che da altri microrganismi di specie diversa.

Altro elemento importante in grado di con-

dizionare la crescita batterica è il tipo di atmosfera dell'ambiente, più o meno ricco di O₂; anche in questo caso specie batteriche diverse possono interagire determinandone una modificazione.

L'abilità dei batteri ad aderire a certe strutture dell'organismo ospite, condiziona anch'essa l'eventuale sviluppo della colonia, ma esiste anche in questo caso la possibilità da parte di certi batteri di specie diverse, di legarsi tra di loro rendendo così possibile la presenza in determinati ambienti di specie batteriche del tutto incapaci di aderirvi singolarmente.

Dalla presenza contemporanea di più specie batteriche possono derivare per l'organismo ospite conseguenze sia negative che positive. Un'evidente conseguenza positiva è la situazione di equilibrio ecologico presente a livello intestinale, dovuta proprio alla presenza di così tante specie da rendere impossibile l'eccessivo sviluppo delle singole, al quale potrebbe conseguire un'azione patogena.

D'altro canto abbiamo avuto modo di vedere in precedenza come diverse manifestazioni patologiche siano strettamente legate alla presenza di flora mista.

Anche vista dalla parte dei batteri, la convivenza con altre specie può arrecare danni o benefici a seconda dei casi. Si distinguono a questo proposito tre tipi di relazione interbatterica: mutualismo, antibiosi (o antagonismo), sinergismo. Conosciamo inoltre due tipi di relazioni mutualistiche: la simbiosi ed il commensalismo.

Nelle simbiosi entrambe le specie traggono beneficio dalla contemporanea presenza dell'altra. Un esempio di simbiosi è rappresentato dal rapporto tra *Lactobacillus arabinosus* e *S. faecalis*, in cui il primo produce acido folico ed il secondo fenilalanina, entrambi importanti fattori di crescita per l'altra specie.

Un rapporto esplicativo della relazione di commensalismo è invece quello che si crea tra *H. influenzae* e *S. aureus* sulle piastre di agar-sangue. Lo *Staphylococcus aureus* produce una particolare sostanza detta "fattore V", che costituisce un fattore di crescita per l'*Hemophilus influenzae*. Il rapporto di commensalismo si caratterizza quindi per il beneficio tratto da una sola specie, mentre

l'altra risulta non influenzata dalla presenza della prima.

La relazione di antagonismo si fonda invece sulla capacità da parte di una specie batterica di inibire la crescita di un'altra senza venire da questa in alcun modo influenzata. Un rapporto di questo tipo si è dimostrato quello tra *Enterobacter aerogenes* e *Lactobacilli*, in cui i prodotti metabolici terminali di *Enterobacter* inibiscono la crescita di *Lactobacilli*.

L'antagonismo può essere dovuto anche ad altri meccanismi, in particolare alla produzione di sostanze dette batteriocine. Queste sostanze erano state inizialmente denominate colicine per essere state per la prima volta dimostrate in *E. coli*, che tramite esse riusciva ad inibire la crescita di specie ad esso molto simili e quindi dirette concorrenti in fatto di nutrizione.

In seguito si è dimostrata la produzione di batteriocine anche da parte di Stafilococchi, Streptococchi, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* e altre specie. Particolarmente attiva è risultata la batteriocina stafilococcica, in grado di inibire sia altri ceppi della stessa specie che altre specie batteriche di tipo Gram+, come il *Corinebacterium diphtheriae* ed altri difteroidi.

La capacità di produrre batteriocine è legata all'attività di materiale genetico extracromosomico (plasmidi); ciò rappresenta la principale ragione della mancata produzione di queste sostanze da parte di tutti i ceppi facenti parte di una stessa specie.

Questo impedisce di codificare in modo preciso e costante i rapporti di antagonismo dovuti all'azione delle batteriocine, indubbiamente molto importanti negli ecosistemi della flora mista sia patogena che saprofita.

Un esempio estremamente interessante delle interazioni ecologiche all'interno di flora mista dovute all'azione delle batteriocine è dato dall'azione di *S. Faecalis* (oggi denominato *Enterococcus*). Questo germe si è dimostrato in grado di produrre batteriocine inibitrici della crescita di numerosi altri batteri, tra i quali anche diversi ceppi di comune isolamento nelle infezioni endodontiche quali *Bacteroides Oralis*, *Streptococcus Milleri*, *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus anaerobius* (Dahlen e coll. 1987) (9).

La terza ed ultima possibilità di relazione

intermicrobica è definita "sinergismo"; in essa i diversi microrganismi coinvolti sono in grado di determinare eventi di cui sarebbero del tutto incapaci individualmente.

Un esempio è costituito dalla relazione tra *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus*, due specie batteriche in grado, singolarmente, di fermentare il lattosio determinando la formazione di acido.

La presenza contemporanea di entrambi fa sì che la fermentazione del lattosio determini oltre alla produzione di acidi anche quella di sostanze gassose. Un esempio di sinergismo viene considerato anche il rapporto tra batteri e batteriofagi, in cui la presenza del fago determina la produzione di sostanze altrimenti non sintetizzabili dalla cellula batterica (es. esotossina principale del *Corinebacterium diphtheriae*).

Un particolare tipo di sinergismo, peraltro così definito impropriamente, è quello che si riferisce alla patogenicità. In questo caso la presenza contemporanea di diverse specie determina (sulla base di rapporti di simbiosi, commensalismo o sinergismo propriamente detto) la possibilità di un'azione patogena maggiore rispetto alla somma delle singole, fenomeno questo di una certa importanza nelle infezioni endodontiche (es. produzione di Beta-lattamasi da parte di alcuni germi che in questo modo proteggono dall'azione di alcuni antibiotici altre specie sensibili contemporaneamente presenti). È infine importante ricordare come le relazioni interbatteriche non costituiscano un elemento permanente ed assolutamente invariabile, ma possano mutare anche radicalmente in rapporto alle variazioni di una o più componenti ambientali. Non deve quindi sorprendere l'osservazione di dati talvolta discordanti nei confronti di questo fenomeno.

Passiamo ora a vedere più da vicino le interrelazioni esistenti tra i principali microrganismi coinvolti nelle infezioni dei tessuti pulpo-periapicali e quindi nella genesi delle periodontiti apicali acute o croniche.

Già in precedenza è stato messo in risalto il ruolo fondamentale della flora batterica anaerobia obbligata in questo genere di patologia. Nella maggior parte dei casi però insieme agli anaerobi obbligati sono stati isolati germi anaerobi facoltativi, che costituiscono

addirittura la maggioranza nei casi di infezioni molto recenti. I dati a disposizione permettono di evidenziare l'esistenza di rapporti molto importanti tra i due tipi di flora, basati soprattutto sul diverso grado di affinità per l'O.

Il fatto che gli anaerobi facoltativi dominino il campo all'inizio ed in seguito cedano lentamente il passo agli obbligati si considera oggi dovuto al fatto che i germi che utilizzano O₂ ne determinano lentamente la scomparsa dai tessuti qualora questi, come la polpa necrotica, siano privati della vascolarizzazione, che altrimenti ne garantirebbe il costante apporto. Man mano che gli anaerobi facoltativi consumano O₂, l'ambiente si fa più idoneo alla crescita degli anaerobi obbligati, finché questi divengono i padroni assoluti del campo.

Giacché la patogenicità degli anaerobi obbligati, qualora abbiano la possibilità di svilupparsi, è molto maggiore rispetto ai facoltativi, la contemporanea presenza delle due componenti si traduce in un aumento del potere patogeno della flora mista.

L'importanza della combinazione aerobi-anaerobi per la determinazione di lesioni di tipo ascessuale è ben documentata dallo studio di Onderdonk e coll. del 1976 (10).

Fu eseguito su un totale di 240 cavie, suddivise in 12 gruppi di 20. In ogni animale venne inoculata una certa sospensione batterica ed in particolare, nei gruppi numerati da 5 a 10, l'inoculo era costituito da coppie di microrganismi. Eseguito l'impianto del materiale a livello addominale, nel maggior rispetto possibile delle condizioni di asepsi, si attesero 7 gg. dopo di che si eseguirono gli esami autopsici.

Nella Tab. 3 sono indicati i risultati facenti riferimento ai 5 gruppi appena menzionati, riguardanti le percentuali di mortalità e di formazione di flogosi a carattere ascessuale. Risulta evidente l'attitudine decisamente superiore, da parte delle coppie formate da un anaerobio obbligato ed uno facoltativo, rispetto alle altre, nel determinare flogosi acute di tipo ascessuale. L'associazione di *Enterococcus* o *E. coli* ad un anaerobio obbligato ha infatti causato ascessi in oltre il 90% dei casi.

Questo tipo di rapporto tra anaerobi obbligati e facoltativi fu peraltro descritto già

Tab. 3

| Batteri inoculati | Casi di mortalità | Casi di les. ascessuali |
|--------------------------|-------------------|-------------------------|
| E. coli+Enterococcus | 5/20 (25%) | 0/15 |
| E. coli+B. fragilis | 7/19 (37%) | 13/13 (100%) |
| E. coli+F. varium | 6/19 (32%) | 12/13 (92%) |
| Enterococcus+B. fragilis | 0/20 | 19/20 (95%) |
| Enterococcus+F. varium | 0/19 | 17/19 (89%) |
| B. fragilis+F. varium | 0/19 | 1/19 (5%) |

molti anni or sono riguardo alla crescita del *Clostridium tetani*. L'esperienza in questione, condotta sui Guinea pigs, dimostrò infatti che la germinazione delle spore tetaniche (inoculate attraverso la cute) poteva avvenire solo in presenza di anaerobi facoltativi che abbassassero la tensione di O₂ dei tessuti.

Abbiamo visto in precedenza come nell'ambito degli anaerobi obbligati coinvolti nell'eziologia delle lesioni periapicali, i *Bacteroides melaninogenicus* rappresentino una specie di fondamentale importanza; ne analizziamo quindi i rapporti con altre specie coinvolte nelle infezioni miste.

Per sopravvivere e moltiplicarsi attivamente, questo gruppo di microrganismi necessita di particolari fattori biochimici, quali la Vit. K (menadione) e l'Emina. Si tratta infatti di sostanze che non sono in grado di sintetizzare e che quindi devono assumere dall'ambiente esterno. Si è dimostrata capace di liberare menadione un'altra specie batterica spesso isolata nelle infezioni endodontiche: la *Veillonella*. Possiamo quindi affermare che la presenza di *Veillonella* favorisce lo sviluppo dei *B. melaninogenicus*; dobbiamo però contemporaneamente ricordare che la crescita della *Veillonella* è a sua volta strettamente dipendente dalla presenza di altre specie, quali Streptococchi ed *Actinomyces*. Queste specie sono dotate di notevoli capacità nella fermentazione degli zuccheri semplici con produzione di elevate quantità di acidi, in particolare lattato; gli studi eseguiti sulle *Veillonelle* ne hanno dimostrato la dipendenza da livelli sufficiente-

mente elevati proprio di acido lattico (rapporto di commensalismo). Questa peculiare esigenza dimostrata da parte di *Veillonella*, prefigura un altro possibile rapporto di dipendenza da un'altra specie molto spesso presente a livello canalare: il *Propionibacterium Acnes*. Questo difteroide ha infatti la possibilità di produrre notevoli quantità di lattato attraverso i propri meccanismi di glicolisi anaerobia. Un dato microbiologico interessante a supporto di questa possibilità è dato da uno dei casi presentati nel lavoro di Yoshida e coll. (già citato in un precedente lavoro -1-); infatti nell'unico caso in cui è presente *Veillonella Parvula* (61.7% della flora totale isolata da quel canale) è contemporaneamente presente *P. acnes* in una concentrazione (33.4% della flora totale) decisamente superiore a quella esistente negli altri due casi in cui veniva isolato (4.4 e 1.6%). Ci troviamo quindi ancora di fronte ad uno stretto legame tra le componenti anaerobia obbligata e facoltativa presenti nelle infezioni miste.

Le ridotte possibilità di reperire il menadione come tale, hanno determinato un'evoluzione nei *B. melaninogenicus*, che ha loro permesso di sfruttare sostanze molto simili ad esso ed in esso rapidamente trasformabili tramite poche e semplici reazioni. Lo studio di Mac Donald, Socransky e Gibbons del 1963 (11) fornisce dati interessanti a questo proposito.

Gli autori partono dalla considerazione delle notevoli attitudini nel determinare la formazione di lesioni ascessuali da parte dei *B. melaninogenicus* in presenza di Difteroidi-

di. Per meglio dimostrare questa relazione vennero eseguiti due esperimenti. Nel primo si iniettarono nei Guinea pigs preparazioni di *B. melaninogenicus* dotati delle normali esigenze metaboliche, e se ne verificò la capacità a determinare infezioni trasmissibili. Pur iniettando menadione nella zona di inoculo, non risultò possibile trasmettere le infezioni ad altri esemplari, come invece si era dimostrato in presenza di flora mista *Bacteroides*-*Difteroidi* anche senza inoculare menadione.

Il secondo protocollo prevedeva di saggiare la capacità di causare infezioni purulente trasmissibili, da parte di *B. melaninogenicus* selezionati *in vitro* come non dipendenti dall'apporto esterno di vit. K. In associazione a questi ceppi, la presenza dei *Difteroidi* risultò del tutto ininfluenza ai fini della patogenicità.

Questi dati indicano quindi la capacità, da parte dei *difteroidi*, di produrre un fattore di crescita assimilabile alla vit. K. Questo è stato individuato essere il Naftochinone, che i *Bacteroides* possono senza difficoltà convertire in menadione.

Il *Difteroide* più frequentemente isolato nelle infezioni endodontiche è il *Propionibacterium acnes*; particolari considerazioni sul ruolo di questo ceppo batterico nell'infezione mista canale, ci vengono suggerite dall'osservazione dei dati della già citata ricerca di Fabricius e Moller del 1982 relativa agli effetti patologici sul periapice da parte di diverse specie batteriche inoculate in combinazione o singolarmente.

Nel caso 1 il *P. acnes* non viene reisolato 7 volte su 12, mentre nel caso 5 risulta presente in tutti i prelievi risultati positivi per la crescita batterica; ciò potrebbe essere dovuto alla presenza, all'interno della combinazione 1, di specie batteriche che ne ostacolano la crescita, assenti invece nella combinazione 5. Il ceppo batterico maggiormente indiziato come responsabile di questa attività di inibizione è lo *S. faecalis*, che ha dimostrato, *in vitro*, azione antagonista verso *P. acnes* tramite la produzione di batteriocine specifiche. L'assenza di *P. acnes* da 7 infezioni e la contemporanea presenza di *B. oralis* evidenzia ancora una volta come quest'ultimo, a differenza dei *B. melaninogenicus*, non presenti particolari necessità di vit.

K e quindi di specie batteriche che la producano.

Nel caso 5 abbiamo invece l'abbinamento di *P. acnes* proprio al *B. melaninogenicus*. Il rilievo più interessante che ci suggeriscono i dati relativi a questo caso è che la presenza di *P. acnes* e la sua produzione di Naftochinone, non è stata sufficiente a promuovere la crescita dei *Bacteroides* in tutti gli 8 casi. Probabilmente, trattandosi di specie ambedue anaerobie obbligate il maggior problema che incontrano risiede proprio nella difficoltà di ridurre la tensione di O₂, ancora discretamente elevata nel tessuto pulpare appena devitalizzato.

In particolari casi le necessità di vit. K da parte dei *B. melaninogenicus* possono venire soddisfatte anche dall'organismo ospite. Dagli studi sull'evoluzione della malattia parodontale, in cui i *B. melaninogenicus* rappresentano una delle componenti di maggiore importanza, sono emersi dati interessanti in proposito.

Si è infatti osservato come alle variazioni ormonali della gravidanza corrisponda un incremento della concentrazione di *B. melaninogenicus* nei solchi gengivali e nelle tasche parodontali, a cui in molti casi corrisponde una fase di attività distruttiva della malattia. In seguito è stato possibile stabilire con precisione la natura di questo rapporto, dovuto all'enorme incremento della presenza in circolo di estradiolo e progesterone, che possono essere trasformati dai *B. melaninogenicus* in menadione.

Questo tipo di interazione non è comunque di pari importanza in campo endodontico, dove l'infezione è confinata ai canali radicolari, che non essendo vascolarizzati risultano impossibilitati a ricevere le sopracitate sostanze. Non si può però escludere a priori che, in caso di passaggio dei *B. melaninogenicus* nel periapice, la presenza di tassi ematici elevati di estradiolo e progesterone, consenta loro una più rapida crescita ed una conseguente maggior patogenicità, con il risultato di un aumento dell'entità della flora.

L'altra necessità principale, in termini metabolici, da parte dei *B. melaninogenicus* oltre al menadione, è rappresentata dall'emina.

Si tratta di un fattore di notevole importanza per lo sviluppo di questa specie per cui co-

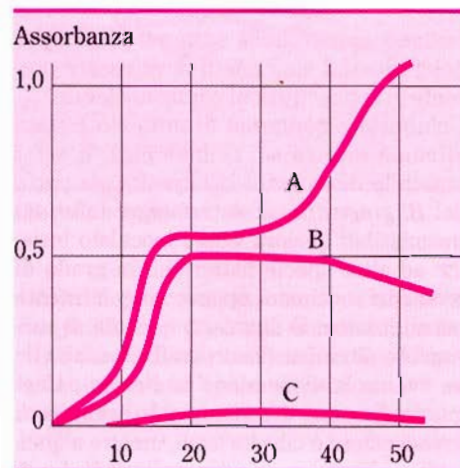


Fig. 1 - A: *B. asaccharolyticus* + *K. pneumoniae* B: *K. pneumoniae* C: *B. asaccharolyticus*

stituisce un altro elemento importante nei rapporti con gli altri batteri presenti nella flora mista.

Il significato di questa sostanza nelle infezioni miste in cui sia presente *B. melaninogenicus* è efficacemente illustrato da una ricerca di Mayrand e McBride del 1980 (12). Inizialmente lo studio dimostra ancora una volta l'importanza della flora mista per lo sviluppo di determinate infezioni, il ruolo fondamentale dei *B. melaninogenicus* (viene utilizzato *B. melaninogenicus* ss. *asaccharolyticus*) per quanto concerne la patogenicità ed inoltre il ruolo di una carica batterica sufficientemente elevata affinché si possano ottenere effetti patologici. L'attenzione viene rivolta in seguito agli specifici rapporti interbatterici esistenti tra *B. melaninogenicus* e *K. pneumoniae*, che si è dimostrata in grado di promuoverne in modo spiccato la crescita, come risulta ben evidente dal grafico della Fig. 1.

Si è quindi cercato di identificare il fattore di crescita prodotto da *K. pneumoniae*, alla base del rapporto di commensalismo con il *B. melaninogenicus*. A questo scopo si sono analizzati tutti i prodotti metabolici terminali di *K. pneumoniae* presenti nel soprannatante delle colture, ponendoli a contatto con le colture di *B. melaninogenicus*.

Una di queste sostanze, l'ac. Succinico, si è dimostrata in grado di promuovere in modo spiccato la crescita dei *Bacteroides*: questo per la sua capacità di sostituire l'emina. Non

trattandosi però della sostanza ideale, per determinare i suoi effetti deve essere presente in concentrazioni piuttosto elevate.

Un'ulteriore conferma di tutto ciò è stata ottenuta *in vivo* sui Guinea pigs. È stato possibile dimostrare la capacità, da parte del *B. gingivalis*, di determinare infezioni trasmissibili qualora venga inoculato insieme ad altre specie batteriche in grado di produrre succinato, oppure singolarmente ma aggiungendo una certa quantità di succinato o di emina (incorporati a veicoli che ne evitino la dispersione in circolo). L'aggiunta di emina determinava lo sviluppo di lesioni estese e talvolta fatali, mentre a quella di succinato conseguivano lesioni di minore gravità; ciò a dimostrazione delle capacità comuni ma di entità diversa nel promuovere la crescita dei *Bacteroides melaninogenicus*.

Finora non è stato comunque possibile definire con precisione il ruolo biochimico del succinato nella sua veste di sostituto dell'emina.

Tra le altre specie, oltre a *K. pneumoniae*, dotate della possibilità di produrre succinato, ci sono anche (tra quelle componenti la flora orale) *E. coli* ed *Actinomyces viscosus*. Gli *Actinomyces*, importanti fattori eziologici della carie coronale e radicolare, possono essere rappresentati anche nelle infezioni canalari, dove quindi costituiscono un fattore favorevole alla crescita dei *B. melaninogenicus*. A loro volta però gli *Actinomyces* presentano esigenze metaboliche peculiari, tra cui una delle più rilevanti è la necessità di una fonte di azoto. L'azoto necessario gli viene fornito principalmente sotto forma di NH₃, derivato in notevole quantità dal catabolismo degli aminoacidi di batteri anaerobi obbligati quali *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* (molto ben rappresentati nelle infezioni endodontiche).

Si evidenzia quindi un ulteriore possibile rapporto di interdipendenza tra le diverse specie batteriche presenti nella flora mista canalare, rapporto che può condizionarne le caratteristiche qualitative e gli effetti patogeni.

Un ulteriore esempio dei possibili condizionamenti a cui può essere sottoposta la crescita dei *B. melaninogenicus*, ci viene illu-

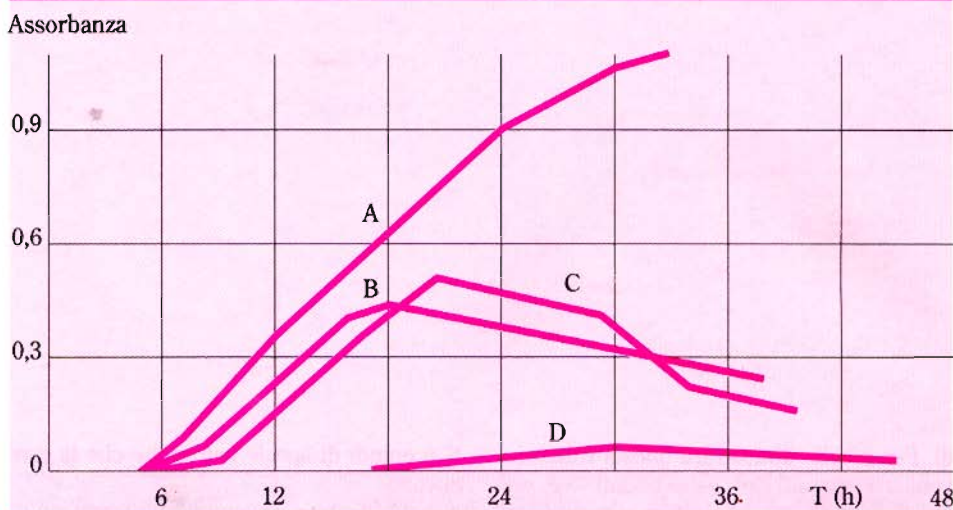


Fig. 2 - A: *B. gingivalis* + *W. recta* B: *W. recta* (pure) C: *W. recta* (mixed) D: *B. gingivalis* (pure).

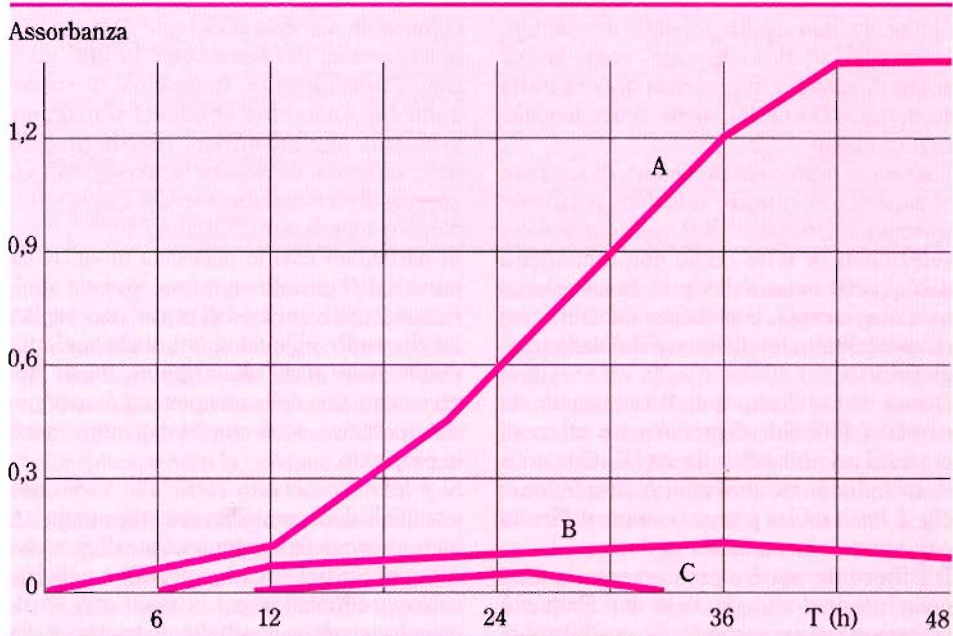


Fig. 3 - A: coltura mista B: *B. melaninogenicus* C: *W. recta*.

strato dallo studio di Grenier e Mayrand del 1986 (13). In questo lavoro si cerca di verificare la natura dei rapporti nutrizionali intercorrenti tra *B. gingivalis* (*B. melaninogenicus* ss. *asaccharolitycus*, oral strain) e *W. recta* e tra *B. melaninogenicus* (*B. melaninogenicus* ss. *melaninogenicus*) e *W. recta* stessa. Riportiamo alcuni grafici estremamente significativi riguardo ai suddetti rapporti nutrizionali; rappresentano infatti le curve di crescita dei germi in esame in coltura singola o mista (Figg. 2-3-4).

Il fatto che non vi siano particolari differenze tra la crescita di *W. recta* presa singolarmente od associata a *B. gingivalis*, indica un rapporto di commensalismo a favore di quest'ultimo. Il fattore di crescita prodotto da *W. recta* è costituito dal protoeme, sostanza avente anch'essa la capacità di sostituire l'emina.

Il protoeme o ferroprotoporfirina IX viene sintetizzato da *W. recta* a partire dal citocro-

mo b, avente una struttura molto simile al protoeme e fortemente rappresentato nelle cellule di questa specie.

Nella cellule di *B. melaninogenicus*, dopo aver svolto le sue funzioni metaboliche, il protoeme viene modificato con l'estrazione dalla sua molecola del ferro bivalente che viene in seguito trasformato in ematina, il pigmento responsabile del colore nerastro delle colonie.

Vediamo ora i grafici relativi alla relazione *B. melaninogenicus*/*W. recta* (Figg. 3-4); da questi risulta un rapporto di simbiosi, con la produzione di fattori di crescita da parte di entrambe le specie.

Il growth factor prodotto da *W. recta* è, come già abbiamo visto, il protoeme, mentre quello prodotto da *B. melaninogenicus* è costituito dall'ac. formico, elemento importantissimo per la crescita di *W. recta*.

La distribuzione temporale di questi eventi è suggerita dal grafico della Fig. 4: la *W.*

recta produce inizialmente una certa quantità di GF per *B. melaninogenicus*, il quale dopo un certo tempo, quando la quantità di GF è abbastanza elevata, inizia la sua fase di crescita esponenziale. Il notevole sviluppo di *B. melaninogenicus* consente quindi la produzione di ac. formico, cui fa seguito la crescita esponenziale di *W. recta*.

Pur trattandosi di specie (*W. recta*) non facenti parte della normale flora delle infezioni canalari, ci sembra questo un esempio estremamente esplicativo di quanto può avvenire, con protagonisti diversi, nelle infezioni endodontiche, condizionando in maniera decisiva le manifestazioni patologiche ad esse correlate.

Un'altra componente di notevole importanza nei rapporti tra le diverse specie della flora mista canalare e non, è rappresentata dalla possibilità di rapporti di sinergismo in termini di patogenicità.

I meccanismi tramite i quali si attua questo fenomeno sono conosciuti solo in parte, ma si ritiene che esso costituisca un elemento primario nel determinare l'entità e le caratteristiche delle lesioni infiammatorie dovute a flora mista.

Le relazioni di sinergismo in termini di patogenicità sono in gran parte legate ad attività enzimatiche specifiche. Importanti al riguardo risultano essere le emolisine di cui sono dotati numerosi ceppi di Streptococchi che possono fornire una notevole quantità di nutrimento per altre specie contemporaneamente presenti, quali ad esempio i *Bacteroides* che dagli eritrociti lisati possono ricavare ferroproteome.

Di notevole rilievo è anche la già citata attività sinergica tra ceppi batterici produttori di collagenasi (es. *B. melaninogenicus*, *Peptostreptococcus*, *peptococcus*) e ceppi produttori di ialuronidasi (es. *Staphylococcus* e *Streptococcus*), per l'enorme potere distruttivo nei confronti dei tessuti connettivi.

A proposito dell'attività da parte delle collagenasi di *B. melaninogenicus*, un'ipotesi estremamente suggestiva viene avanzata da Mc Donald, Socransky e Gibbons, nel già citato lavoro del 1963, sulla scorta della seguente esperienza. Un ceppo di *B. melaninogenicus* fu posto in un terreno di coltura a lui favorevole, cui fu aggiunta una certa quantità di collagene di Guinea pigs. Dopo



Fig. 4 - A: *W. recta* (pure) B: *W. recta* (mixed) C: *B. melaninogenicus* (mixed) D: *B. melaninogenicus* (pure).

6 gg. si eseguì il dosaggio dell'idrossiprolina, quale indicatore dell'attività collagenolitica. Si osservò che il massimo di attività si aveva nei terreni maggiormente diluiti.

Da ciò è nata l'ipotesi secondo cui la presenza di prodotti finali derivati dall'attività della collagenasi, inibisce, con meccanismo di feed-back, la sintesi dell'enzima stesso da parte del germe produttore. Tuttavia, in presenza di altre specie batteriche in grado di utilizzare detti prodotti finali si assisterebbe alla rimozione del blocco a feed-back sulla sintesi della collagenasi. Questo meccanismo potrebbe quindi costituire un importante fattore di incremento dell'attività patogena di *B. melaninogenicus* dovuto alla presenza di flora mista. Il significato della flora mista andrebbe quindi oltre ai rapporti di tipo nutrizionale, venendo ad incidere anche sulla produzione di sostanze patogene.

Un'ulteriore possibilità di azione sinergica in fatto di patogenicità è rappresentata dall'azione antagonista verso le difese dell'organismo manifestata da alcune specie batteriche. È stata dimostrata la possibilità da parte di determinate specie, tra cui *Staphylococchi* e *B. melaninogenicus* (Okuda e Takazoe 1973) (14), di produrre sostanze tossiche per i granulociti neutrofili. Gli effetti di questa attività risultano molto graditi alle altre specie presenti nelle infezioni miste, le quali, anche se non dotate di questa proprietà, vengono ad usufruirne in modo diretto trovandosi di fronte un pool cellulare di difesa decimato e/o dotato di minore efficacia.

Un meccanismo estremamente interessante attraverso il quale i *Bacteroides* possono rallentare l'azione dei processi difensivi, risultata dalla produzione di sostanze prive di attività chemiotattica ma dotate di notevole affinità nei confronti dei recettori specifici per la chemiotassi, presenti sulla superficie dei granulociti PMN (Van Dycke e coll. 1982)

(15). Ciò determina una sorta di inibizione competitiva nei confronti di sostanze batteriche dotate di attività chemiotattica, le quali, non potendosi legare ai recettori, non sono in grado di innescare la reazione dei PMN.

Accenniamo infine brevemente ad un altro importante elemento in grado di condizionare lo sviluppo della flora di tipo misto, cioè il rapporto di adesione tra le diverse specie presenti. La presenza delle cosiddette "adesine" sulla parete cellulare, si è dimostrata praticamente ubiquitaria in tutte le specie esaminate.

Si tratta di sostanze con struttura diversa a seconda della specie (proteine, glicolipidi ecc.), aventi in comune la proprietà di interagire con specifici recettori sia a livello di cellule eucariotiche che procariotiche. Un caso piuttosto interessante nell'ambito dell'adesione alle cellule eucariotiche è rappresentato dal comportamento di *B. Endodontalis*. Come già abbiamo avuto modo di sottolineare (2), questa specie, contrariamente a quasi tutte le altre facenti parte della famiglia dei *B-P Bacteroides* si è dimostrata isolabile solo all'interno dei canali radicolari o comunque sempre in infezioni di origine endodontica. Ciò è stato spiegato analizzando la struttura della parete cellulare di questo microorganismo, la quale risulta pressoché totalmente sprovvista di fimbriae; questo rende estremamente difficile l'adesione ai tessuti molli orali ed esclude quindi una possibile patogenicità nei loro confronti.

L'adesione tra diverse specie batteriche comporta invece la possibilità di acquisire proprietà che la specie singola non presenta, soprattutto in termini di adesione a strutture dell'organismo ospite. Inoltre qualora tra le due specie esista anche un rapporto di tipo nutrizionale o di altra natura, la presenza di adesione ne favorisce la salvaguardia. Nell'ambito delle specie batteriche isolate

Tab. 4

| Scimmia | Tempi di prelievo | *Specie an. ob. isolate | Specie an. fac. isolate | Rapporto obblig./facoltat. |
|---------|-------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| M90 | 7 | 5.8 | 4.0 | 1.7 |
| | 90 | 8.0 | 3.9 | 3.9 |
| M 180 | 7 | 7.5 | 5.5 | 1.4 |
| | 180 | 10.4 | 2.9 | 6.5 |
| M1060 | 1060 | 9.7 | 0.8 | > 11.3** |

* Il valore espresso rappresenta la media dei singoli ottenuti.

** Il valore non è definibile con assoluta precisione in quanto gli anaerobi facoltativi non erano dimostrabili in 4 canali.

dai canali radicolari, si sono dimostrati rapporti di adesione tra i *B. melaninogenicus* (*gingivalis intermedius* e *melaninogenicus*) e l'*Actinomyces viscosus* e gli *Streptococchi mitis* e *sanguis*. È stato inoltre possibile evidenziare (Kolenbrander e coll. 1985) (16) un particolare rapporto di adesione a tre tra *A. viscosus*, *S. sanguis* (ponte) e *B. loescheii*, tra i quali è presente anche un rapporto di tipo nutrizionale, basato sulla produzione di NH da parte del *Bacteroides*, che viene utilizzato come fonte di azoto dalle altre due specie. Si delinea quindi anche in questo caso un rapporto di sinergismo tra le componenti Gram+ anaerobi facoltativi e Gram- anaerobi obbligati, questa volta basato su rapporti di adesione reciproca.

Anche in questo campo comunque le conoscenze sono piuttosto limitate e solo alla luce di nuove esperienze sarà possibile comprendere tutto il significato del problema.

Veniamo ora a trattare di uno degli elementi più importanti e caratteristici relativi alla flora batterica mista delle infezioni endodontiche: le variazioni quantitative e qualitative riscontrabili al loro interno con il passare del tempo.

Il significato di queste variazioni è intimamente connesso ai rapporti ecologici che abbiamo appena illustrato; le modifiche che si verificano all'interno dell'infezione mista non sono altro che il frutto di una selezione volta a favorire le specie più adatte all'ambiente, che quindi trovano in esso le condizioni ideali per la crescita. È da sottolineare come, soprattutto in un ambiente come quello canalare dove manca l'intervento diretto dell'organismo ospite, le condizioni ambientali dipendono in misura notevole dalle azioni delle singole specie batteriche e dai rapporti intercorrenti tra di esse.

Di conseguenza l'evoluzione cronologica delle infezioni endodontiche miste è regolata principalmente dalle relazioni esistenti tra le diverse componenti batteriche che ne fanno parte.

Una ricerca di enorme importanza su questo argomento è quella condotta da Fabricius e coll. nel 1982 (17), di cui esamineremo dettagliatamente i contenuti.

Lo studio fu condotto su 3 scimmie *Macaca fascicularis*, di cui si utilizzarono gli 8 denti



Fig. 5

anteriori (monoradicolarli), per un totale di 24 elementi e 24 canali. Si eseguì un accurato isolamento del campo tramite diga ed un'altrettanto meticolosa disinfezione dello stesso (controllata tramite prelievi risultati in seguito tutti negativi), cui fece seguito l'apertura del dente che quindi veniva devitalizzato meccanicamente. Il tessuto pulpare veniva in seguito lasciato esposto al contatto con la flora orale per una settimana, dopo di che si eseguivano otturazioni quanto più ermetiche possibile.

Le 3 scimmie vennero denominate rispettivamente M90, M180 e M1060 ed avrebbero seguito un protocollo leggermente diverso l'una dall'altra.

Nel caso dell'M90 i prelievi microbiologici furono eseguiti a 7 e a 90 gg. dall'otturazione, nell'M180 a 7 e 180 gg. mentre nell'M1060 fu eseguito un solo prelievo a 1060 gg. dall'otturazione.

Si eseguirono le relative colture e si identificarono le diverse specie presenti tramite l'analisi morfologica, la colorazione di Gram, la sensibilità all'O₂, la crescita su terreni selettivi; gli anaerobi obbligati vennero ulteriormente distinti sulla base di esami gascromatografici e di tests biochimici.

I risultati numerici ed i grafici relativi ai rap-



Fig. 6

porti tra anaerobi obbligati e facoltativi sono riportati nella Tab. 4 e nelle Figg. 5-6.

In base a quanto appena detto fu possibile anche una identificazione più precisa delle specie coinvolte e quindi la raccolta di dati relativi alle modificazioni cronologiche cui andavano incontro.

I grafici della Fig. 7 rappresentano i valori ottenuti al riguardo.

Nella Tab. 5 sono evidenziati i dati specifici relativi alle singole specie.

L'elemento che più di ogni altro si rende evidente è rappresentato dall'evoluzione nel rapporto di forze tra le componenti anaerobia facoltativa ed obbligata. Gli anaerobi facoltativi sono infatti presenti in quantità solo di poco inferiore agli obbligati nei prelievi a 7 gg. (rapporto 1:1.7), mentre nei prelievi successivi c'è una netta tendenza alla loro riduzione, fino ad arrivare al prelievo a 1060 gg. in cui il rapporto è di 1:11.3, ed in 4 canali risulta impossibile isolarli. Parallelamente si manifesta l'incremento costante degli obbligati, che già a 90 gg. rappresentano circa il 90% della flora totale ed il 98% a 1060 gg.

Emerge quindi la notevole importanza dei tempi nei quali si eseguono i prelievi microbiologici e della conoscenza dell'età dell'in-

Tab. 5

| Specie batteriche isolate | Prelievi* a 7 gg. | Prelievi a 90 e 180 gg. |
|--|----------------------|----------------------------|
| ANAEROBI FACOLTATIVI | | |
| Streptococchi - emolitici | 12 | 9 |
| Enterococchi | 12 | 9 |
| Bastoncelli G+ (Lactobacilli/Corinebatteri) | 10 | 4 |
| Bastoncelli G- (Coliformi/Proteus) | 11 | 14 |
| ANAEROBI OBBLIGATI | | |
| Peptococcus/Peptostreptococcus | 10 | 13 |
| Veillonella | 8 | 2 |
| Bastoncelli G+ | 15 | 16 |
| Bacteroides | 16 | 16 |
| Fusobacterium | 4 | 6 |
| Treponema | 0 | 2 |

* Il valore si riferisce al numero di casi in cui si è isolata la specie.

fezione per poterne meglio intuire la qualità della componente batterica.

Uno studio dello stesso gruppo di Fabricius e Dhalen del 1982, condotto *in vitro* ed *in vivo* infettando determinati tessuti tramite flora mista composta da anaerobi obbligati e facoltativi, evidenzia in modo molto preciso l'importanza dei tempi di prelievo. Infatti nei prelievi batteriologici finali fu possibile isolare ceppi di anaerobi obbligati risultati addirittura assenti nei prelievi iniziali. La ragione di questa eventualità, escludendo una del tutto improbabile contaminazione, è senz'altro rappresentata dal fatto che nei prelievi iniziali detti ceppi di anaerobi obbligati erano presenti in numero così ridotto da non poter nemmeno essere riscontrati.

Un evento del tutto simile si è verificato anche in questo studio, in cui alcuni ceppi di *Bacteroides*, risultati assenti nei prelievi iniziali, sono invece risultati presenti in quelli finali. A questo tipo di andamento evolutivo presente nella flora canalare possiamo forse ricollegare il caso 4 del lavoro di Zavistoski e coll. (1980) in cui ci troviamo probabilmente di fronte ad un'infezione canalare molto recente, con elevatissime percentuali di anaerobi facoltativi, ed anaerobi obbligati presenti in numero così ridotto da non essere rilevabile. In base a quanto visto in precedenza, si può ipotizzare che un prelievo batteriologico eseguito nello stesso canale dopo un certo periodo di tempo, avrebbe evidenziato anche gli anaerobi obbligati. Nella situazione opposta potrebbe invece trovarsi l'infezione canalare del caso 3 (Zavistoski e coll.), probabilmente avvenuta molto tempo prima del prelievo ed in cui la componente anaerobia facoltativa si è progressivamente ridotta fino ad annullarsi.

Anche riguardo ad alcuni dati del lavoro di Keudell e coll. (1976) (18) è possibile un'annotazione interessante relativa al significato dei tempi di prelievo ed alle variazioni cronologiche della flora endodontica mista. Nei 10 casi riportati di polpe vitali positive all'esame batteriologico, la flora isolata è formata esclusivamente da anaerobi facoltativi; probabilmente anche in questo caso siamo di fronte ad infezioni molto recenti (polpa vitale) in cui la componente degli anaerobi obbligati, pur essendo presente, lo è in quantità talmente basse da non poter

essere evidenziate.

Sempre nell'ambito di questo argomento, i dati forniti da Ogunteby e coll. (1982) relativi a prelievi eseguiti in ascessi periapicali, sembrano confermare quanto appena sostenuto.

Essendo infatti, nella maggior parte dei casi, l'ascesso periapicale acuto un evento cronologicamente vicino all'inizio dell'infezione del tessuto pulpale, troviamo sempre presenti gli anaerobi facoltativi (*Streptococchi mitis* e *faecalis* ed *Actinomyces viscosus*), talvolta anche in assenza di anaerobi obbligati (casi 8 e 6). In un solo caso sono presenti solo gli obbligati, ma proprio nell'unico caso in cui l'esame obiettivo evidenzia la presenza di un'otturazione canalare incompleta; ciò testimonia come il dente fosse già stato trattato endodonticamente e come quindi la flogosi periapicale presentatasi in seguito rappresenti, con ogni probabilità, un fenomeno di riacutizzazione dovuto ad un'infezione canalare di vecchia data.

Tornando ai risultati del lavoro di Fabricius e coll. si rende evidente il ruolo centrale occupato dai bastoncelli G-, all'interno del gruppo degli anaerobi obbligati. Rappresentano infatti, tranne che a 7 gg., la componente maggiormente rappresentata in tutti i prelievi eseguiti, con una chiara tendenza all'aumento con il trascorrere del tempo, fino a costituire la quasi totalità (75-80%) del prelievo a 1060 gg.

Anche i bastoncelli G+ si dimostrano, tra gli anaerobi obbligati, una componente importante e piuttosto stabile nel tempo; sono rappresentati principalmente da *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* ed *Eubacterium*.

Come prevedibile, tra gli anaerobi facoltativi il gruppo di maggior importanza è costituito dai cocchi G+.

Per quanto riguarda le singole specie, le variazioni rilevate confermano in pieno le tendenze osservate nel comportamento dei

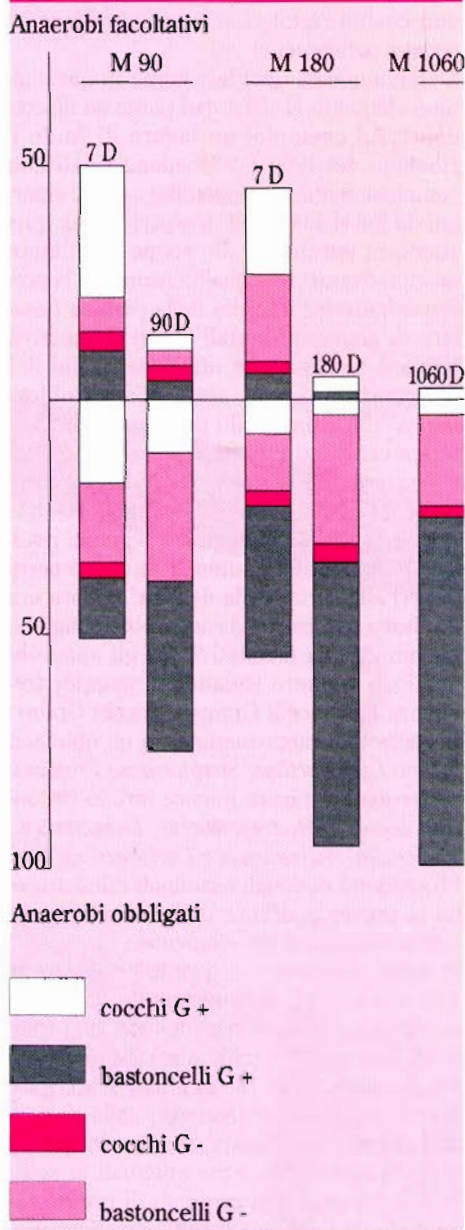


Fig. 7

gruppi: con il passare del tempo aumentano *Peptostreptococcus*, Bastoncelli G+ anaerobi obbligati, *Fusobacterium*, mentre diminuiscono gli Streptococchi, gli Enterococchi, i Bastoncelli G+ anaerobi facoltativi; stabili, in quanto già presenti dall'inizio in tutti i casi, i *Bacteroides*.

In parte inattesi invece i risultati relativi ai Bastoncelli G+ anaerobi facoltativi ed alle *Veillonelle*, dai quali, teoricamente, si attenderebbe un comportamento opposto a quello osservato. Il comportamento di *Veillonella* può comunque essere spiegato in base a quanto già visto relativamente ai rapporti nutrizionali tra le diverse specie presenti nelle infezioni endodontiche. Abbiamo infatti sottolineato la dipendenza da parte di *Veillonella* dalla presenza nell'ambiente di adeguate concentrazioni di ac.lattico, che solitamente gli viene per la maggior parte fornito da Streptococchi ed *Actinomyces* (anaerobi facoltativi).

Con il progressivo decremento del numero degli anaerobi facoltativi presenti potrebbero quindi venire meno quelle sostanze fondamentali nella crescita delle *Veillonelle*. Riportiamo infine gli interessanti risultati dello studio sulla distribuzione topografica dei diversi gruppi batterici, incluso sempre nella medesima ricerca di Fabricius e coll. del 1982. Si tratta di un primo approccio ad un problema il cui significato è in gran parte ancora da scoprire.

Fu seguito il seguente protocollo sperimentale: nei canali delle scimmie M90 e M180, oltre al prelievo microbiologico principale visto poc'anzi, si eseguirono rispettivamente a 90 e 180 gg. altri 3 prelievi in diverse parti del sistema canalare: uno all'incirca alla metà del canale principale, uno sempre allo stesso livello ma dalla dentina della parte canalare, uno dalla porzione apicale del canale principale. I risultati delle colture evidenziarono tra le differenti flore batteriche prelevate, differenze qualitative di un certo rilievo, con tendenze sovrapponibili nei diversi tempi di prelievo (90 e 180 gg.). I risultati ottenuti sono rappresentati nel grafico della Fig. 8.

Si rende evidente la netta tendenza all'aumento degli anaerobi obbligati ed alla diminuzione degli anaerobi facoltativi procedendo in direzione apicale. Gli autori precisano

inoltre che l'isolamento di anaerobi facoltativi dalla regione apicale del canale radicolare, è stato possibile solo in un ridotto numero di casi, nei quali erano piuttosto presenti in quantità comunque basse. Un altro dato rilevante è rappresentato dalla maggior presenza di anaerobi obbligati a livello della parete dentinale rispetto al canale principale; ciò, come meglio vedremo in seguito, può costituire un elemento importante in termini patogenetici.

È comunque da ricordare come su quest'ultimo elemento vi siano dati piuttosto discordanti. Ad esempio, un lavoro di Ando e Hoshino del 1990 (19) evidenzia dati non completamente sovrapponibili a quelli riportati da Fabricius e coll. L'esperienza in questione fu intrapresa allo scopo di valutare quantitativamente e qualitativamente la presenza batterica a livello della dentina canalare di elementi dentali affetti da necrosi pulpale. Le tecniche utilizzate ai fini del mantenimento dello stato di anaerobiosi risultavano ottimali ed i prelievi di flora batterica venivano effettuati asportando, con frese sterili, piccole porzioni di dentina comprese tra 0,5 e 2,2 mm di distanza dal canale principale. Si evidenziarono i seguenti risultati: in tutti i casi esaminati furono reperiti batteri all'interno della dentina; la flora era costituita per un 80% da anaerobi obbligati e per un 20% da facoltativi; tra gli anaerobi obbligati vennero isolati con maggior frequenza bastoncelli Gram+ e cocchi Gram+; le specie più rappresentate tra gli obbligati furono *Lactobacillus*, *Streptococcus Propionibacterium*; in misura minore furono riscontrati anche *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Veillonella*, *Actinomyces* e *Lactobacillus*; tutti i frammenti dentali esaminati dimostrarono la presenza di infezione mista con una media di 8 specie per elemento.

In netto contrasto con quanto osservato da Fabricius e coll. è sicuramente il fatto di non aver riscontrato in alcun caso la presenza di bastoncelli Gram- anaerobi obbligati. L'unico elemento forse in grado di spiegare questa evenienza è costituito dalla profondità del prelievo; infatti, mentre in questo lavoro i prelievi venivano effettuati in strati di dentina piuttosto profondi, il protocollo adottato da Fabricius e coll. prevedeva prelievi dalla dentina superficiale della parete



Fig. 8

canalare.

Un ulteriore contributo alla conoscenza della disposizione batterica sulle pareti dentali viene dal lavoro di Nair (1987) (20). In esso si evidenzia come sulle pareti dentali siano reperibili colonie batteriche disposte su più strati, tali da presentarsi sotto forma di una struttura "a palizzata", per molti versi

simile a quella della placca batterica aderente alla superficie dello smalto. Lo strato batterico disposto sulla parete canalare non presenta tuttavia una densità uniforme, ma zone di maggiore e minore densità, in cui le prime sono costituite da agglomerati batterici aggregatisi in base a fenomeni di adesione reciproca.

È stato inoltre possibile dimostrare che i batteri filamentosi tendono a disporsi con l'asse maggiore perpendicolare rispetto alla parete canalare, mentre le forme coccoidi tendono a formare cordoni orientati anch'essi nel medesimo senso dei filamentosi. Venendo ora a considerare un'ulteriore aspetto topografico delle infezioni canalari, quello della localizzazione dei diversi tipi di flora in senso corono-apicale, prendiamo nuovamente in considerazione un'esperienza condotta dal gruppo di Fabricius.

In questo caso lo studio sulla flora canalare prevedeva un'analisi più approfondita nei confronti di due specie: *Bacteroides* ed *E. coli*, dei quali venivano confrontate le percentuali di presenza a metà del canale principale e nella porzione apicale. I dati che ne sono emersi sono da considerarsi piuttosto significativi, in quanto aggiungono un ulteriore tessera al mosaico dell'eziopatogenesi delle periodontiti apicali. Si è infatti dimostrata la presenza, in percentuali elevatissime, di *Bacteroides* nella porzione apicale rispetto alla parte più coronale del canale; ciò dimostra come la specie di maggior rilievo nell'eziologia delle lesioni periapicali, presenti anche rapporti topografici favorevoli con il periapice stesso.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Accorsi S, Lavagnoli G, Frigeri S, Fiamminghi L. Significato della flora batterica nell'eziologia delle periodontiti apicali: aspetti qualitativi, quantitativi e topografici. *G It Endo* 1990; IV 2: 22-30
- 2 - Lavagnoli G, Accorsi S, Brenna F, Fiamminghi L. Caratteristiche morfo-funzionali dei ceppi batterici di maggior importanza nelle infezioni endodontiche. *G It Endo* 1990; 3 IV: 38-43
- 3 - Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umea Univ. *Odont Diss* 1976; 7: 94
- 4 - Williams BL, McCann GF, Schoenkecht FD. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 770-774
- 5 - Ogunteby B, Slee AM, Tanzer J, M Langeland K. Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 964-966
- 6 - Zavistoski J, Dzink JA, Onderdonk A, Bartlett J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surg* 1980; 49: 171-174
- 7 - Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJR. Influence of combination of oral bacteria on periapical tissue of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 200-206
- 8 - Moorer WR, Thoden van Velzen SK, Wesseling PR. Abscess formation induced in rabbits with bacteria-filled subcutaneous implants that simulate the infected dental root canal. *Oral Surg* 1985; 59: 643-646
- 9 - Dahlen G, Fabricius L, Holm SE, Moller A. Interactions within a collection of eight bacterial strains isolated from a monkey dental root canal. *Oral Microb and Immun* 1987; 2: 164-179
- 10 - Onderdonk AB, Bartlett JG, Louie T, Sullivan-Seigler N, Gorbach SL. Microbial synergy in experimental intra-abdominal abscess. *Infect Immun* 1976; 13: 22-26
- 11 - Macdonald JB, Socransky SS, Gibbons RJ. Aspects of the pathogenesis of mixed anaerobic infections of mucous membranes. *J Dent Res* 1963; 42: 529-544
- 12 - Mayrand D, McBride BC. Ecological Relationship of bacteria involved in a simple, mixed anaerobic infection. *Infect Immun*. 1980; 27: 44-50
- 13 - Grenier D, Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. *Infect Immun* 1986; 53: 616-620
- 14 - Okuda K, Takazoe I. Antiphagocytic affects of the capsular structure of a pathogenic strain of *Bacteroides melanogonicus*. *Bull Dent Coll* 1973; 14: 99-104
- 15 - Van Dycke TE, Bartholemew E, Genco RJ, Slots J, Levine MJ. Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. *J of Periodontology* 1982; 53: 502-508
- 16 - Kolenbrander PE, Andersen RN, Holdeman LV. Coaggregation of oral bacteroides species with other bacteria: central in role coaggregation bridges and competitions. *Infect Immun* 1985; 48: 741-746
- 17 - Fabricius L, Dahlen G, Ohman A E, Moller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scand J Dent Ras* 1982; 90: 134-144
- 18 - Keudell K, Conte M, Fujimoto L, Ernest M, Berry HG. Microorganisms isolated from pulp chambers. *J Endod* 1976; 2: 146-148
- 19 - Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *Intern Endod J* 1990; 23: 20-27
- 20 - Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987; 13, 1: 29-39
- 21 - Nolte. *Oral microbiology*. Ed Mosby Co 1977