



## RICERCA CLINICA

# Monitoraggio batterico lungo il tragitto transmucoso della vite di guarigione in assenza di carico funzionale in implantologia

*Implant dentistry: monitoring of bacteria along the transmucosal passage of the healing screw in absence of functional load*



federico.meynardi@istitutomagnus.it



Profilo morfologico batterico, tragitto transmucoso perimplantare, vite di guarigione, impianti two-pieces, assenza di carico funzionale

Bacterial morphologic profile, transmucosal peri-implant path, healing screw, two-pieces implants, absence of functional load

### SCOPO DEL LAVORO

Scopo del lavoro è verificare l'evoluzione del profilo batterico lungo il tragitto transmucoso della vite di guarigione, posizionata subito dopo l'inserimento dell'impianto endo-oso two-pieces, durante il periodo di quattro mesi destinato all'osteointegrazione, in assenza di carico funzionale.

### MATERIALI E METODI

Sono stati prelevati due campioni sito specifici lungo il cerchione mucoso della vite di guarigione di 80 impianti two-pieces, per quattro mesi, per un totale di 640 prelievi. Il posizionamento degli impianti è stato eseguito con un unico protocollo generale secondo tecnica flap-less per limitare variabili di contaminazione batterica del sito chirurgico. È stata posizionata per tutti gli 80 impianti la medesima vite di guarigione con diametro di 5 mm e altezza di 4 mm. Nei quattro mesi in esame i pazienti hanno mantenuto un'igiene routinaria, senza praticare alcuna igiene specifica sui siti campione.

### RISULTATI E CONCLUSIONI

Questa ricerca è servita a documentare come il profilo batterico di tutti i campioni in esame si sia mantenuto normale, con netta prevalenza di cocchi, in corrispondenza dell'interfaccia tra il profilo del colletto implantare ed il margine crestale osseo-alveolare, durante i quattro mesi precedenti il carico funzionale protesico. La presenza di un profilo batterico potenzialmente patogeno si è sviluppata esclusivamente sulla superficie del tragitto transmucoso perimplantare.

**L**a placca è un accumulo fisiologico di sostanza mista organica ed inorganica a significativo contenuto microbico, in particolare batterico che, oltre ad aderire alla superficie dei denti, può attecchire tenacemente sulle strutture implan-

toprotesiche (1, 2, 3).

È stata delineata da precedenti studi la similarità nella composizione della placca dentale e di quella ritrovata a livello dell'abutment implantare. Questa consiste soprattutto in cocchi Gram+ aerobi e batteri non mobili (4, 5, 6).

Nel corso di esperimenti sui cani, Berglundh ed Ericsson (7, 8) hanno rilevato che la quantità di placca formata nelle aree dentali e in quelle implantari è simile, così come la composizione. Gli impianti e i denti circondati da tessuti molli sani si associano costantemente ad una placca caratterizzata da quantità prevalenti di cocchi e bacilli Gram+, mentre i siti che evidenziano malattia parodontale e perimplantare diffusa contengono biopellicole con notevole quantità di bastoncelli, fusiformi e spiraliformi, nettamente prevalenti rispetto alla forme coccoidi ed in più chiaramente mobili (9, 10).

Questi dati non fanno che confermare i risultati di Listgarten, secondo il quale la percentuale di cocchi ritrovata in zona implantare è pari al 71,3% del totale, mentre le altre morfologie batteriche rappresentano la netta minoranza, soprattutto quelle mobili (0,4%). Questi dati subiscono variazioni significative nei siti che evidenziano infiammazione parodontale e perimplantare con valori percentuali di cocchi nettamente diminuiti.

L'obiettivo della ricerca è di valutare il profilo batterico dal punto di vista morfologico, in valori percentuali tra le varie forme batteriche presenti lungo il tragitto transmucoso della vite di guarigione posizionata dopo inserimento di fixture a due pezzi durante il periodo osteointegrativo, in assenza di carico, della durata di quattro mesi (fase di precarico).

Nello specifico la ricerca vuole verificare le differenze a livello di composizione batterica della placca ac-



Federico Meynardi

Marco E. Pasqualini  
Franco Rossi  
Luca Dal Carlo

Liberi professionisti

cumulata lungo il cerchione mucoso attorno alla vite di guarigione in titanio, prima dell'inserimento dell'abutment definitivo e dell'applicazione del carico funzionale (fig. 1).

## MATERIALI E METODI

Il posizionamento degli impianti è stato eseguito con un unico protocollo generale secondo tecnica flap-less per limitare variabili di contaminazione batterica del sito chirurgico. L'apertura della mucosa aderente nei siti edentuli è avvenuta mediante l'uso di mucotomo (bisturi circolare) del diametro di 4,1 mm, utilizzato per creare un'incisione completa del lembo della mucosa. È stata posizionata per tutti gli 80 impianti la medesima vite di guarigione con diametro di 5 mm ed altezza di 4 mm.

Ogni sito implantare è stato seguito a partire dal primo mese successivo al posizionamento dell'impianto, per quattro mesi, corrispondenti al periodo della cosiddetta osteointegrazione, in totale condizione di passività funzionale e biomeccanica.

È stato eseguito, con cadenza mensile, il prelievo della placca batterica accumulata sul campione di 80 impianti per un totale di 640 prelievi nelle due sedi stabilite come oggetto di studio:

- lungo il tragitto transmucoso della vite di guarigione;
- più in profondità: in corrispondenza dell'interfaccia tra profilo del colletto implantare ed il margine crestale osseo-alveolare.

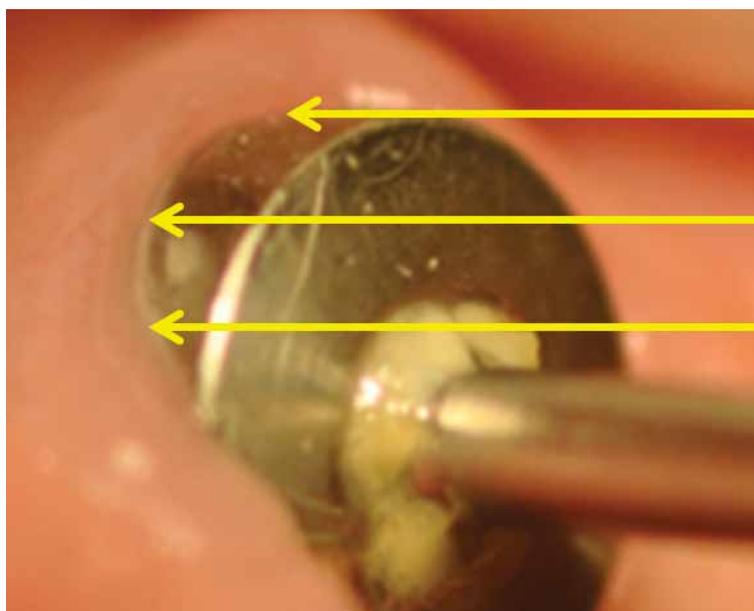
Per ogni prelievo è stata eseguita l'analisi in termini di profilo batterico, in vivo, secondo morfologia, mediante una tecnica ormai collaudata da oltre vent'anni da parte del nostro gruppo di studio, seguendo i concetti di Listgarten secondo cui un profilo batterico composto prevalentemente da cocci (70%) è da ritenersi fisiologico e saprofitico a fronte di una prevalente percentuale delle altre morfologie batteriche (bastoncelli, filamentosi e spiraliformi) dal carattere patologico (10, 11).

I campioni sono stati siglati come segue:

- TTM: campione prelevato dal tragitto transmucoso;
- IMC: campione prelevato dall'interfac-



**Fig. 1**  
La vite di guarigione in titanio di uno degli 80 casi analizzati.



**Fig. 2**  
La prima fase di prelievo è stata eseguita mediante puntale sterile nell'ambito del tragitto transmucoso (TTM), indicato dalle frecce, mantenendo la vite di guarigione in situ con la presenza del suo film batterico (placca) per non variare le condizioni microbiotiche tra i vari livelli della nicchia di prelievo.

cia del margine crestale.

La prima fase di prelievo è stata eseguita mediante puntale sterile nell'ambito del tragitto transmucoso (TTM), mantenendo la vite di guarigione in situ con la presenza del suo film batterico (placca) per non variare le condizioni microbiotiche tra i vari livelli della nicchia di prelievo (fig. 2).

La seconda fase di prelievo (IMC) è stata eseguita dopo rimozione della vite di guarigione con l'accortezza di evitare la contaminazione dello strumento sterile di prelievo lungo il tragitto transmucoso ricco di placca (figg. 3, 4, 5). La vite di guarigione è stata poi riposizionata per mantenere le medesime condizioni ambientali nei tre successivi prelievi a cadenza mensile.

Le vite di guarigione rimosse hanno costantemente evidenziato su tutta la loro superficie una notevole componente di

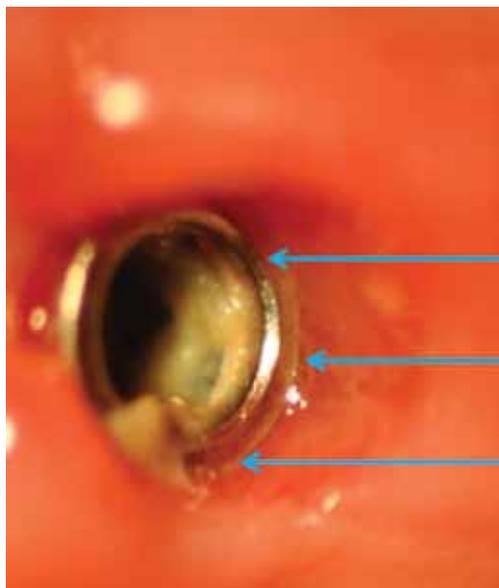
placca batterica (fig. 6). Massiccio è stato il riscontro di placca anche all'interno della fixture, nonostante la presenza della vite di guarigione (fig. 3).

La metodica del conteggio morfologico batterico si è svolta mediante microscopia a contrasto di fase su campione in vivo (fig. 7).

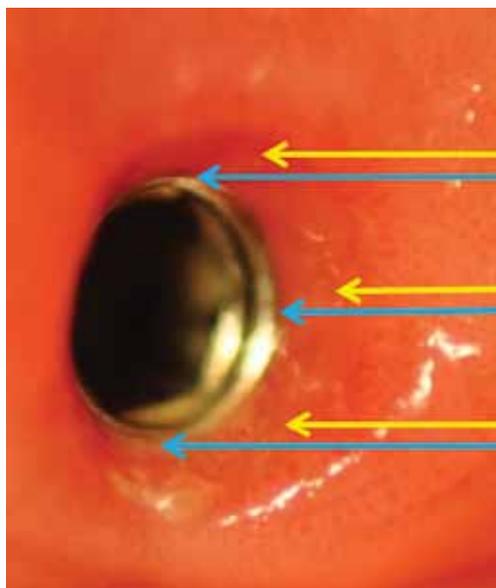
Il materiale prelevato dai siti da analizzare (TTM e IMC), mediante puntale sterile, è stato diluito in soluzione fisiologica all'1% di gelatina liofilizzata.

Con una micropipetta a volume variabile, si sono prelevati dal contenitore 1.000 microlitri di soluzione, disciolti nella provetta madre (PM).

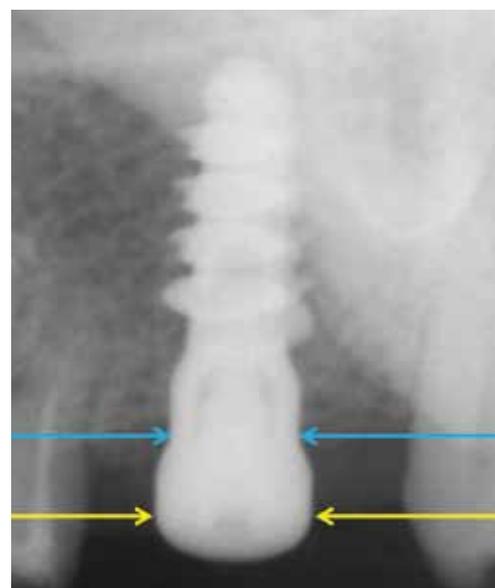
La PM è stata dinamizzata mediante agitatore (mod. AMR 2T), in modo da rendere omogenea la distribuzione del campione nella provetta stessa. Si è lasciato riposare il preparato per tre minuti.



**Fig. 3** Seconda fase di prelievo (IMC): le frecce blu evidenziano il margine crestale osseo-alveolare dopo rimozione della vite di guarigione. Osservare la quantità di placca.



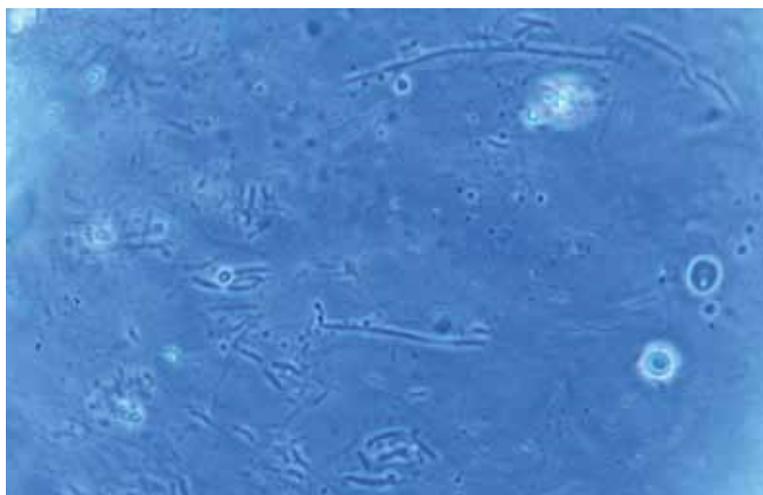
**Fig. 4** Le frecce indicano i siti di prelievo: il tragitto transmucoso TTM (frecce gialle) ed il margine crestale osseo-alveolare IMC (frecce blu).



**Fig. 5** Posizione del tragitto transmucoso TTM (frecce gialle) e del margine crestale osseo-alveolare IMC (frecce blu) visti nell'immagine radiografica.



**Fig. 6** La placca adesa alla superficie di titanio della vite di guarigione.



**Fig. 7** Visione microscopica 40x del prelievo del tragitto transmucoso TTM in cui si nota la presenza di tutte le morfologie batteriche (cocchi, bastoncini, filamentososi e spiraliformi).

Con la micropipetta dotata di nuovo puntale sterile si sono prelevati 100 microlitri di campione disciolto poi trasferiti in una provetta figlia (PF) contenente 900 microlitri di soluzione fisiologica. In questo

modo si è ottenuta una diluizione di 1:10. Questa provetta è stata dinamizzata analogamente alla PM in modo da rendere omogenea la dispersione del contenuto batterico e si è lasciata riposare per tre minuti.

Prelievo	TTM		IMC	
	N	Media %	N	Media %
1° mese	80	79,51	80	86,24
2° mese	80	61,20	80	87,11
3° mese	80	36,09	80	84,36
4° mese	80	25,83	80	85,64

**Tab. 1** Esame batterioscopico morfologico; percentuale di cocchi.

Si sono prelevati poi 100 microlitri di campione diluito e si sono depositati sulla superficie della camera di Burkler, coprendo il campione mediante vetrino coprioggetto. Posizionato il vetrino sullo stativo del microscopio a contrasto di fase, è stata eseguita la lettura mediante obiettivo 40x, effettuata su ogni unità di superficie (1/25 mmq) procedendo convenzionalmente dall'alto verso il basso e da sinistra verso destra, diagonalmente. Sono stati inclusi nel conteggio anche i batteri presenti sui lati contigui basso-destro del reticolo. I conteggi delle morfologie batteriche sono stati riportati su apposita tabella.

## RISULTATI

I risultati sono riassunti nella tabella 1. Dai dati rilevati si evince una significativa differenziazione evolutiva in termini di percentuale di cocchi nei prelievi osserva-

ti dai siti TTM rispetto ai siti IMC, lungo il periodo di monitoraggio dei quattro mesi. La riduzione progressiva dei cocchi a livello del TTM a favore delle altre morfologie batteriche indica una facile colonizzazione della nicchia microbiotica da parte della placca batterica. Il rilievo microbico a livello di IMC rivela che la presenza di cocchi rimane praticamente costante e nettamente prevalente rispetto alle altre morfologie batteriche, a significare condizioni eco-microbiotiche globalmente non favorevoli allo stabilizzarsi di un profilo ricco di bastoncini, filamentosi e spiraliformi.

**Analisi statistica**

Trattandosi di valori percentuali, l'analisi statistica è stata condotta con metodi non parametrici (12, 13). Per valutare la significatività statistica delle differenze riscontrate tra i due prelievi contemporanei (TTM e IMC) è stato impiegato il test U di Mann-Whitney (14) (figg. 8-11).

Nei quattro tempi considerati, si è osservata, nei prelievi TTM, una riduzione dei cocchi estremamente significativa rispetto ai prelievi IMC.

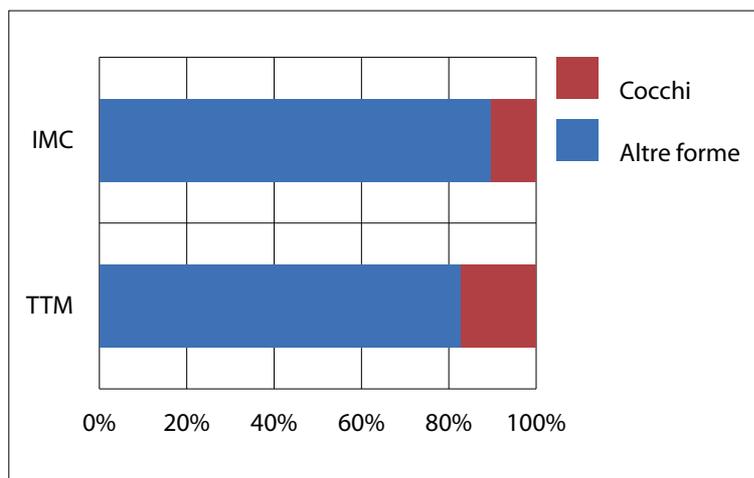
Per valutare la significatività statistica delle variazioni riscontrate nel tempo, in ognuno dei due singoli livelli è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis (15):

- test di Kruskal-Wallis per TTM:  $p < 0.001$  = altissima significatività;
- test di Kruskal-Wallis per IMC:  $p > 0.5$  = non significativo.

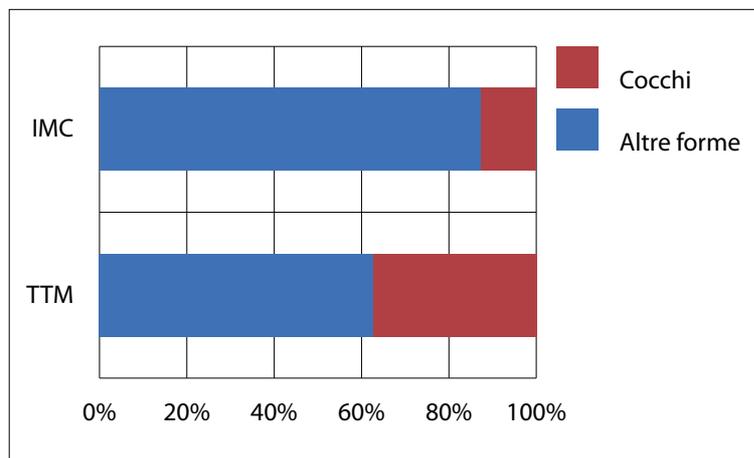
Ciò significa che la riduzione progressiva dei cocchi a livello di tragitto transmucooso risulta estremamente significativa, mentre a livello di interfaccia del margine crestale non sono avvenute variazioni importanti ed il profilo batterico rimane tendenzialmente costante e non significativo in termini patogenetici (11).

**DISCUSSIONE**

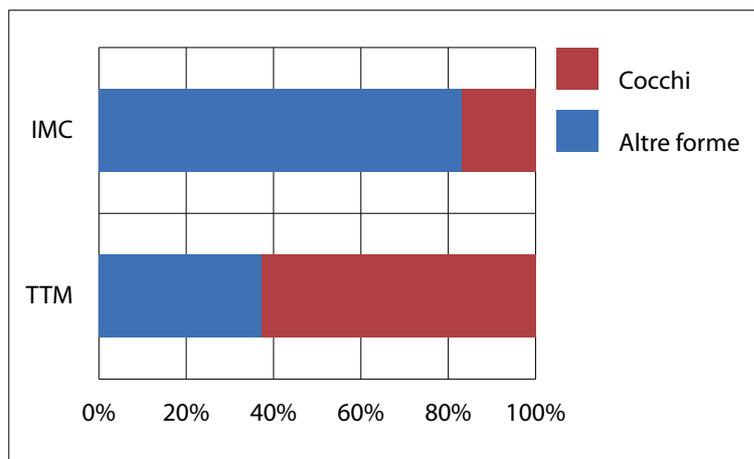
La ricerca vuole evidenziare come nel cerchione mucoimplantare a livello del margine crestale, in assenza del carico oclusale ed in particolare di fattori di pressione ambientale stressogeni (carico oclusale disfunzionale), permanga una spontanea



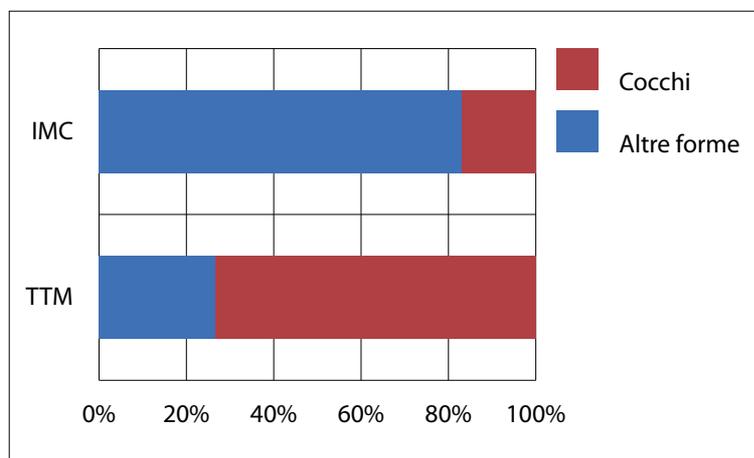
**Fig. 8**  
Test U di Mann-Whitney dopo un mese:  $p < 0.001$  = altissima significatività.



**Fig. 9**  
Test U di Mann-Whitney dopo due mesi:  $p < 0.001$  = altissima significatività.



**Fig. 10**  
Test U di Mann-Whitney dopo tre mesi:  $p < 0.001$  = altissima significatività.



**Fig. 11**  
Test U di Mann-Whitney dopo quattro mesi:  $p < 0.001$  = altissima significatività.

stabilizzazione batterica molto regolare (16, 17, 18). La presenza ordinata e relativamente ripetitiva di cocchi Gram+ ostacola lo sviluppo di condizioni microbiotiche perimplantari patogene atte a favorire condizioni di invasione batterica dei tessuti profondi: infezione e quindi perimplantite (19, 20, 21).

I rapporti di ecosistema, tra organismo ospite e fronte batterico, in termini di componente ecologica integrata, vengono così mantenuti (Microbioma) (22, 23).

L'assenza di sollecitazioni di natura biomeccanica (carico occluso-statico-dinamico) permette il mantenimento di un equilibrio tra il sistema vite implantare-osso-mucosa da una parte e il fronte batterico dall'altra.

La componente batterica mantiene costante valenza saprofitico-commensale, non invasivo-aggressiva, indipendentemente dalle morfologie che progressivamente si sviluppano lungo il tragitto transmucoso (TTM) e l'interfaccia tra impianto e margine creale osseo (IMC).

## CONCLUSIONI

Questo studio è servito a dimostrare che la sola pur massiccia presenza di batteri in un contesto biologico multifattoriale, in assenza di carico, non risulta sufficiente a produrre effetti destabilizzanti sull'equilibrio tra ospite e fronte batterico (24-30).

Il carico disfunzionale (trauma occlusale) potrebbe risultare quale fattore predisponente alla trasformazione del profilo batterico da saprofitico a patogeno (16, 17). ●

## AIM OF THE WORK

This was to check the bacteria profile along the transmucosal path of healing screws that has been placed immediately after the insertion of endosseous two-pieces implants, during the bone integration period of 4 months (pre-functional load phase).

## MATERIALS AND METHODS

Two site specific samples were harvested from the mucosa circumference of the healing screws of 80 two-pieces implants. Implants placement was performed by using standard protocol according to flapless

technique in order to limit bacterial contamination of the surgical area. Healing screws (5 mm diameter / 4 mm height) were used for all 80 implants. During the postsurgical 4 month study period, patients followed standard oral hygiene procedures and no special care was provided for the surgical sites.

## RESULTS AND CONCLUSIONS

This research highlighted that the bacterial profile of all samples remained normal, with a clear prevalence of cocci at the interface between implant neck and crestal alveolar bone during the 4 months before prosthetic functional load.

## BIBLIOGRAFIA

- Listgarten MA. The structure of dental plaque. *Parodontology* 2000 1994;5:652-75.
- Lindhe J, Nyman S. Textbook of clinical periodontology. Copenhagen: Munksgaard (second edition); 1989.
- Meynardi F, Pasqualini ME, Rossi F, Biancotti P. Confronto del profilo batterico presente in siti implantari con mesostruttura solidarizzata mediante barra saldata e con perno moncone singolo. *Doctor Os* 2013;24(5):411-5.
- Fanali S, Perrotti V, Riccardi L, Piattelli A, Piccirilli M, Ricci L, Artese L. Inflammatory infiltrate, microvessel density, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Nitric Oxide Synthase (NOS), and proliferative activity in soft tissues below intra-orally welded titanium bars. *J Periodontol* 2010 May;81(5):748-57.
- Listgarten MA. The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. *J Periodontol* 1988;15:485.
- Gandolfo S, Meynardi F, Corrente G, Nelken A. Analisi microbiologica a fresco della placca dento-gengivale. *RIS* 1994; maggio: 275-86.
- Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B. Soft tissue reactions to the de novo plaque formation implants's and teeth. An experimental study in the dog. *Clinical Oral Implants Research* 1992;3:1-8.
- Ericsson I, Berglundh T, Marinello CP, Liljenberg B, Lindhe J. Longstanding plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clin Oral Implants Research* 1992;3:99-103.
- Mombelli A. Prevention and therapy of peri-implant infections. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J. *Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology*. Berlin: Quintessence; 1999. p. 281-303.
- Meynardi F, Pasqualini M, Biancotti PP. Analisi batteriologica nel follow up in parodontologia. *Doctor Os* 2011;22(2):120-7.
- Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. *J Periodontol* 1976;1:47-53.
- Peat J, Barton B. *Medical statistics: a guide to data analysis and critical appraisal*. London: Blackwell Publishing; 2005.
- Hollander M, Wolfe DA, Chikchen E. *Nonparametrical Statistical Methods*. New York: John Wiley & Sons. 3rd Ed; 2013.
- Mann AB, Whitney DR. On a test whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* 1947;18:50-60.
- Kruskal W, Wallis WA. Use of ranks in one criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 1952;47:583-621.
- Pasqualini U. *Le Patologie Occlusali. Eziopatogenesi e terapia*. Milano: Masson; 1993. p. 3-23, 176-92.
- Meynardi F, Rossi F, Grivet Brancot L, Pasqualini ME. Non solo batteri ma un trauma occlusale all'origine della malattia parodontale. *Dental Tribune Jan* 2013;9(1):19-20.
- Meynardi F, Rossi F, Battaglio C, Biancotti PP, Pasqualini ME. Correlazione evolutiva tra profilo batterico parodontale-perimplantare e carico occlusale disfunzionale. *Doctor Os* 2011 Apr;22(4):341-5.
- Vettore MV et al. The relationship of stress and anxiety with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2003;30:394-402.
- Genco RJ, Grossi SG. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 1999;70:711-23.
- Wimmer G, Janda M et al. Coping with stress: its influence on periodontal disease. *J of Periodontol* 2002;73:1343-51.
- Blaser MJ. Who Are We? Indigenous Microbes and the Ecology of Human Diseases. *EMBO Reports* 2006;7(10):956-60.
- Lee YK, Mazmanian SK. Has the Microbiota Played a Critical Role in the Evolution of the Adaptive Immune System? *Science* 2010;330(Dic):1768-73.
- Margulis L, Dorion S. *Microcosmos*. University of California; Press Berkeley; 1997.
- Meynardi F, Biancotti PP et al. Correlazioni etiopatogenetiche tra parodontopatia e trauma occlusale. *IAPNOR - International Academy of Posture and Neuro-Muscular Occlusion Research* 2009;13(1): 3.
- Greenteing G, Lamter I. Cambiamenti dei modelli parodontali: implicazioni terapeutiche. *Int J of Period and Res Dent* 2003 Mar;4:18-24.
- Kawai T et al. A novel approach in adult periodontitis: an immunodominant of Porphyromonas gingivalis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998 Jan;5:11-7.
- Wimmer G, Janda M et al. Coping with stress: its influence on periodontal disease. *J Periodontol* 2002;73:1343-51.
- Van Dike T, Serhan C. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal disease. *J Dent Res* 2003 Feb;82:82-90.
- Page R, Schroeder H. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. *J Periodontol* 1981;52:477-91.