



A.J. van Winkelhoff¹
 D. Herrera²
 E.G. Winkel³
 N. Dellemijn-Kippuw¹
 C.M.J.E. Vandenbroucke-
 Grauls⁴
 M. Sanz²

Antibioticumresistentie in de subgingivale microflora in patiënten met adulte parodontitis

Een vergelijkend onderzoek tussen Spanje en Nederland

Samenvatting

Trefwoorden:

- Parodontologie
- Antibioticumresistentie
- Parodontitis

Uit 'de sectie Klinische Orale Microbiologie van de afdeling Orale Biologie van het Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA), 'de Universiteit van Madrid in Spanje, 'de Kliniek voor Parodontologie in Amsterdam en 'de afdeling Medische Microbiologie en Infectie preventie van de Vrije Universiteit Amsterdam.

Dit manuscript is een bewerking van een Engelstalig manuscript dat is aangeboden voor publicatie in het Journal of Clinical Periodontology.

Datum van acceptatie:
10 juni 1999.

Adres:
Dr. A.J. van Winkelhoff
ACTA
Van der Boechorststraat 7
1081 BT Amsterdam

Het wijdverbreide gebruik van antibiotica bij de behandeling van bacteriële infecties heeft geleid tot een toename in de resistentie van humane en dierlijke bacteriën. Het antibioticumgebruik verschilt enorm tussen de Europese landen. Hierdoor is ook de prevalentie van resistente pathogene micro-organismen niet gelijk. In deze publicatie worden de resultaten gepresenteerd van een onderzoek naar de bacteriële resistentie in de parodontale microflora bij adulte patiënten met parodontitis in Nederland en Spanje.

In dit vergelijkend onderzoek werd voor Spanje gekozen omdat er uitgebreide wetenschappelijke literatuur bestaat waarin wordt aangetoond dat het antibioticumgebruik in Spanje significant hoger is dan in andere Europese landen, waaronder Nederland. Ook bestaat er in Spanje een hogere prevalentie van resistente pathogene bacteriën.

Uit het onderzoek bleek dat er in Spanje, in vergelijking met Nederland, een significante hogere resistentie in de anaërobe parodontale microflora bestond voor penicilline, amoxicilline, metronidazol, clindamycine en tetracycline. Er werd in Spanje een hogere prevalentie van resistente paropathogene bacteriën gevonden. In 5 van de 31 Spaanse patiënten werden minstens 3 tetracycline-resistente paropathogenen aangetroffen. Het veelvuldig gebruik van antibiotica in Spanje heeft geleid tot een verhoogde resistentievorming in de parodontale microflora.

WINKELHOFF AJ VAN, HERRERA D, WINKEL EG, DELLEMIJN-KIPPUW N, VANDENBROUCKE-GRAULS CMJE, SANZ M. Antibioticumresistentie in de subgingivale microflora in patiënten met adulte parodontitis. Een vergelijkend onderzoek tussen Spanje en Nederland. Ned Tijdschr Tandheelkd 1999; 106: 290-294.

Inleiding

Het (overmatig) gebruik van antimicrobiële middelen bij de preventie en de behandeling van bacteriële ziekten heeft een grote invloed op het ontstaan van antibioticumresistente micro-organismen. Antibioticumresistentie is een wereldwijd probleem geworden en heeft grote medische en economische consequenties. De omvang van dit probleem is echter niet even groot in alle delen van de wereld en binnen Europa bestaan er grote verschillen in de prevalentie van resistente humane pathogenen. Het antibioticumgebruik is significant hoger in de mediterrane landen (Baquero, 1996). Er is vastgesteld dat het antibioticumgebruik, uitgedrukt in aantal dagelijkse doses per 1.000 inwoners, in Spanje, Frankrijk, Italië en Duitsland respectievelijk 23,0, 26,2, 14,0 en 10,6 bedraagt (Pradier *et al.*, 1997). Als gevolg hiervan is de prevalentie van resistente pathogene bacteriën ook hoger in de zuidelijke landen. Penicillineresistente *Streptococcus pneumoniae* kent een prevalentie van 25% in Frankrijk en van 45% in Spanje, terwijl deze in het Verenigd Koninkrijk, Duitsland en Nederland respectievelijk 3, 8 en 3% bedraagt (Baquero, 1996; Cullmann, 1996).

Het voorkomen van meticillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) is in Europa onderzocht in 7.333

stammen, verdeeld over 43 verschillende laboratoria in 10 Europese landen waaronder Nederland. Van de geteste stammen bleek 12,8% meticillineresistent. Het percentage varieerde echter van 0,1% in Denemarken en 1,5% in Nederland tot 30,3% in Spanje, 33,6% in Frankrijk en 34,4% in Italië (Voss *et al.*, 1994). Resistentie in de MRSA bacteriën voor andere antibiotica dan meticilline bleek ook hoger in Spanje dan in Nederland en bedroeg 84,7% versus 55,5% voor ciprofloxacin, 96,8% versus 44,4% voor clindamycine en 96,8% versus 55,6 voor erythromycine (Voss *et al.*, 1994).

De productie van bètalactamase door bacteriën is een belangrijk mechanisme waardoor bacteriën resistentie ontwikkelen tegen penicillinen. De prevalentie van bètalactamase positieve *Haemophilus influenzae* type b in Spanje bedraagt tussen de 58% en 64%, in Nederland ligt dit percentage tussen de 9% en 12% (Cullmann, 1996). Ook onder de strikt anaërobe bacteriën lijkt er een stijging van de resistentie te zijn (Appelbaum *et al.*, 1992).

Over de invloed van systemische antibiotica op de resistentievorming in de parodontale microflora is weinig bekend. Onderzoek in de Verenigde Staten, dat werd uitgevoerd in de perioden 1980-1985 en 1990-1995, liet een lichte stijging zien in de resistentie voor tetracycline en amoxicilline (Walker, 1996).

Tabel 1. Beschrijving van de patiëntenpopulaties.

Parameter	Spanje (n = 31)	Nederland (n = 30)
Gemiddelde leeftijd	43,1	43,0
Rookgedrag		
% huidige rokers	51,6	73,4
Laatste antibioticumgebruik (%)		
1-12 maanden	54,8	10*
13-48 maanden	25,8	10
> 60 maanden	0	43,3
nooit	19,4	36,7
Soort antibioticum (%)		
amoxicilline	48	5,3*
metronidazol	0	10,5
% huidige medicijngebruikers anders dan antibiotica	32,2	3,2*

*p < 0,05

De productie van bètalactamase is gevonden bij parodontale bacteriën zoals *Prevotella intermedia*, die vooral werd gevonden na recent gebruik van penicilline. Kinder et al (1986) en Van Winkelhoff et al (1997) vonden bètalactamase producerende subgingivale bacteriën in 74% van de onderzochte adulte patiënten met parodontitis. Het overmatig gebruik van antibiotica zal niet alleen de samenstelling van de subgingivale plaque beïnvloeden, antibiotica kunnen ook een selectie zijn voor paropathogenen met een verminderde gevoeligheid voor diverse antibiotica.

Het doel van dit onderzoek was de mate van resistentie van de subgingivale microflora te bepalen voor diverse antibiotica in adulte patiënten met parodontitis in Spanje en Nederland.

Materiaal en methode

In dit onderzoek werden opeenvolgende adulte patiënten met parodontitis opgenomen uit de Kliniek voor Parodontologie te Amsterdam (n = 30) en van de afdeling Parodontologie van de Tandheelkunde Faculteit van de Universiteit van Madrid (n = 31). Inclusiecriteria waren: leeftijd > 25 jaar, > 3 gebitselementen in elk kwadrant, > 1 pocket/kwadrant met een sondeerdiepte van > 5 mm en die bloedde na sonderen, röntgenologisch vastgesteld alveolair botverlies in elk kwadrant, en geen parodontale behandeling in het verleden. Een exclusiecriteria was systemisch of lokaal antibioticumgebruik 6 weken voor het onderzoek. Bij de aanvang van het onderzoek werd geïnformeerd naar: systemische ziekten, antibioticumgebruik in het verleden, huidig medicijngebruik en het rookgedrag.

Van elke patiënt werden een volledige pocketstatus en röntgenopnames van de dentitie gemaakt. De diepste pocket met aanhechtingsverlies die bloedde na sonderen, werd in elk kwadrant geselecteerd. Bij deze plaatsen werd de plaque-index (0 = geen visuele plaque, 1 = visuele plaque), de bloedingsindex (0 = geen bloeding, 1 = bloeding na sonderen) en de suppuratie-index (0 = geen pusafvoer, 1 = pusafvoer) vast-

gesteld. Deze pockets dienden tevens als experimentele plaatsen voor het microbiologisch onderzoek.

De microbiologische procedures werden in Madrid en Amsterdam nauwkeurig op elkaar afgestemd door middel van controleafnames die werden geanalyseerd op beide laboratoria. Na het zorgvuldig verwijderen van de supragingivale plaque en het isoleren van de experimentele gebitselementen met

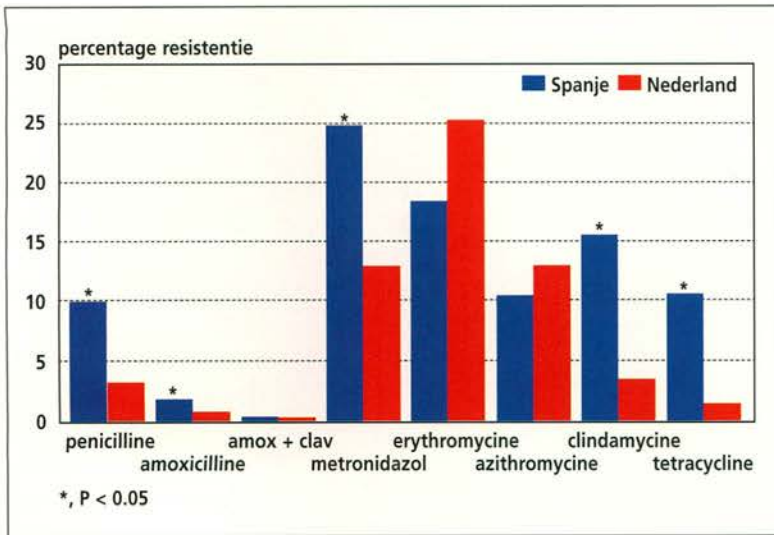
wattenrollen werden 2 steriele papierstiften na elkaar in de pocket geplaatst. De papierstiften van de 4 experimentele pockets werden bij elkaar gevoegd in steriel transportmedium en binnen 2 uur na afname verwerkt op het laboratorium. De subgingivale plaquemongsters werden gehomogeniseerd, verdund en op bloedhoudende agarplaten en op voedingsbodems geënt die selectief zijn voor *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Slots, 1982). Tevens werden de plaquemongsters op bloedagarplaten geënt waaraan breekpuntconcentraties (groei betekent resistentie) van de volgende antibiotica waren toegevoegd: penicilline (0,5 microgram/ml), amoxicilline (3,0 microgram/ml), amoxicilline (3,0 microgram/ml) en clavulaanzuur (0,75 microgram/ml), metronidazol (8 microgram/ml), clindamycine (4 microgram/ml), erythromycine (2 microgram/ml), azithromycine (2 microgram/ml) en tetracycline (8,0 microgram/ml). Controle (geen antibiotica toegevoegd)- en testplaten werden tot 14 dagen geïncubeerd onder strikt anaërobe omstandigheden. Een tweede identieke serie bloedagarplaten werden aëroob geïncubeerd. De *A. actino-*

Tabel 2. Klinische parameters van de onderzochte patiënten in Spanje en Nederland.

Parameter	Spanje (n = 31)	Nederland (n = 30)
Plaque-index		
% plaatsen PI0	21,8	45,8
% plaatsen PI1	78,2	54,2*
Gemiddelde pocketdiepte + (standaarddeviatie)	6,2 (0,8)	7,0 (1,2)*
Gemiddeld klinisch aanhechtings- verlies + (standaarddeviatie)	7,0 (1,4)	8,0 (2,5)
Bloedingsindex		
% plaatsen BI0	1,6	1,7
% plaatsen BI1	98,4	98,3
Pusafvoer		
S10	48,4	43,3
S11	51,6	56,7

*p < 0,05.

PI0 = geen visuele plaque; PI1 = visuele plaque; BI0 = geen bloeding na sonderen; BI1 = bloeding na sonderen; S10 = geen pusafvoer; S11 = pusafvoer.



Afb. 1. Resistentie-niveaus voor enkele antibiotica van anaërobe bacteriën in de subgingivale plaque van adulte patiënten met parodontitis.

mycetemcomitans platen werden 5 dagen geïncubeerd in lucht met 5% CO₂. De verschillende paropathogene bacteriën werden geïdentificeerd volgens standaardmethoden.

Het totale aantal kolonies op de anaërobe controlebloedagarplaten diende als referentie voor het aantal kolonies dat op de verschillende antibioticumplaten groeide. De mate van resistentie voor elk antibioticum werd uitgedrukt in een percentage en werd berekend voor elk patiëntenmonster. Van deze percentages werd een gemiddeld percentage voor elk antibioticum berekend. De verschillen tussen de berekende gemiddelde percentages van de antibioticumresistentie voor elk antibioticum in Nederland en Spanje werden statistisch getoetst met behulp van een ongepaarde T-toets.

Resultaten

De klinische bevindingen alsmede enkele andere karakteristieken van beide patiëntengroepen staan vermeld in tabel 1. Opvallend was dat het percentage rokers in de Nederlandse patiëntengroep aanmerkelijk hoger was dan in de Spaanse groep. Ook werd er

een belangrijk verschil gevonden in het antibioticum- en medicijngebruik: beide zijn hoger in de Spaanse patiëntengroep. Het gebruik van metronidazol en spiramycine is nul in de Nederlandse patiëntengroep. Deze antibiotica zijn in Spanje verkrijgbaar in een combinatiepreparaat (Rodogyl®). Een opvallend verschil was ook het significant hoger gebruik van amoxicilline in Spanje.

In tabel 2 zijn de klinische variabelen samengevat. Er was een gering maar significant verschil in de gemiddelde pocketdiepte en het gemiddeld aanhechtingsverlies tussen beide groepen. De andere klinische parameters vertoonden grote overeenkomsten. Tabel 3 geeft de prevalentie en het gemiddelde percentage van diverse paropathogene bacteriën in beide patiëntengroepen weer. Opvallend is de lage prevalentie van *A. actinomycetemcomitans* en de hoge prevalentie van *P. gingivalis* in de Spaanse groep. De overige bacteriologische parameters vertonen grote overeenkomsten tussen beide groepen.

In afbeelding 1 worden gemiddelde resistentieniveaus van de diverse antibiotica weergegeven voor de anaëroob geïncubeerde monsters. Er werd

Tabel 3. Prevalentie en percentages van paropathogene bacteriën in Spaanse en Nederlandse adulte patiënten met parodontitis.

Species	Aa	Pg	Pi	Bf	Pm	Fm
Spanje (n = 31)						
Aantal	1	20	23	20	18	31
Prevalentie (%)	3,2	64,5	74,2	64,5	58,1	100
Gemiddeld % in positieve patiënten	0,5	22	7	7	4	7
Nederland (n = 30)						
Aantal	7	11	27	22	29	30
Prevalentie (%)	23,3	36,7	90	73,3	96,7	100
Gemiddeld % in positieve patiënten	3	29	6	8	7	9

Aa = *A. actinomycetemcomitans*; Pg = *P. gingivalis*; Pi = *P. intermedia*; Bf = *B. forsythus*; Fn = *F. nucleatum*; Pm = *P. micros*.

Tabel 4. Percentage parodontale bacteriestammen van Spaanse (ESP) en Nederlandse (NL) adulte patiënten met parodontitis die resistent zijn voor een gegeven antibioticum.

		Aa*	Pg	Pi	Bf	Fm	Pm
Penicilline	ESP	0,0	15	82,6	35,0	54,8	10,5
	NL	42,9	0	37,0	4,5	13,3	6,9
Amoxicilline	ESP	0	20	65,2	25	32,3	15,8
	NL	0	9,1	29,6	0	16,7	6,9
Amoxicilline en clavulaanzuur	ESP	0	0	0	10	6,5	0
	NL	0	0	0	0	0	0
Metronidazol	ESP	0	0	0	0	0	0
	NL	14,3	0	0	0	3,3	0
Erythromycine	ESP	0	5,0	4,3	20,0	77,4	26,3
	NL	14,3	9,1	3,7	4,5	93,3	24,1
Azithromycine	ESP	0	20,0	17,4	25,0	6,5	10,5
	NL	42,9	0	3,7	4,5	96,7	3,4
Clindamycine	ESP	0	5,0	17,4	5,0	3,2	0
	NL	0	0	3,7	0	0	0
Tetracycline	ESP	100	100	52,2	15,0	29,0	21,1
	NL	0	0	7,4	0	10,0	0

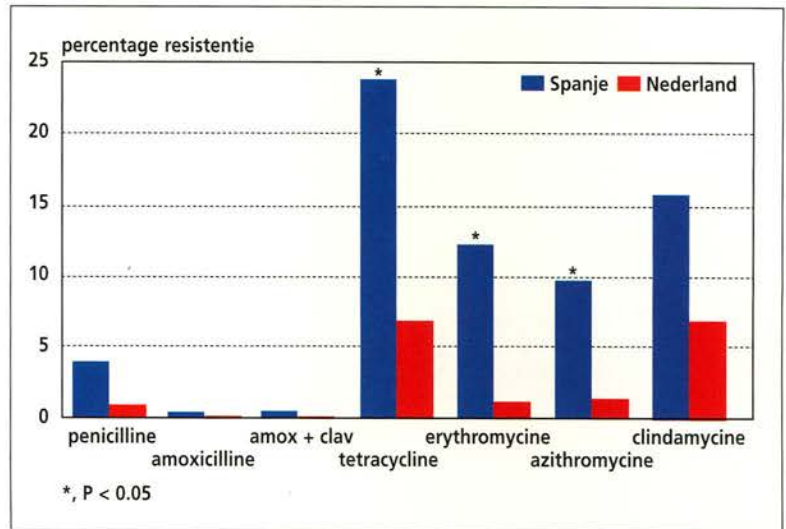
*Voor verklaring van de afkortingen zie tabel 3.

een significant hogere resistentie in de anaërobe microflora van de Spaanse patiëntengroep gevonden voor penicilline, amoxicilline, metronidazol, clindamycine en tetracycline. De resistentieniveaus van amoxicilline en clavulaanzuur, erythromycine en azithromycine vertoonden geen verschillen tussen beide landen. Voor de aëroob geïncubeerde monsters werden statistisch significante verschillen gevonden in gemiddeld resistentieniveaus voor tetracycline, erythromycine en azithromycine (afb. 2). In afbeelding 3 is het aantal tetracyclineresistente paropathogene bacteriën per patiënt weergegeven. In de Spaanse groep vond men 1 patiënt met 5, 1 patiënt met 4, 3 patiënten met 3 en 6 patiënten met 2 tetracyclineresistente paropathogene bacteriën. In al de genoemde categorieën werden geen Nederlandse patiënten aangetroffen. Tabel 4 geeft de percentages van de geïsoleerd paropathogene species die groeide op de antibioticumhoudende bloedagarplaten. Vrijwel zonder uitzondering waren deze percentages voor de diverse bacteriesoorten hoger in de Spaanse patiëntengroep. Het percentage bacteriestammen dat resistent was voor metronidazol was echter gering, slechts 1 *F. nucleatum*-stam uit een Nederlandse patiënt groeide door de breekpuntconcentratie van metronidazol.

Discussie

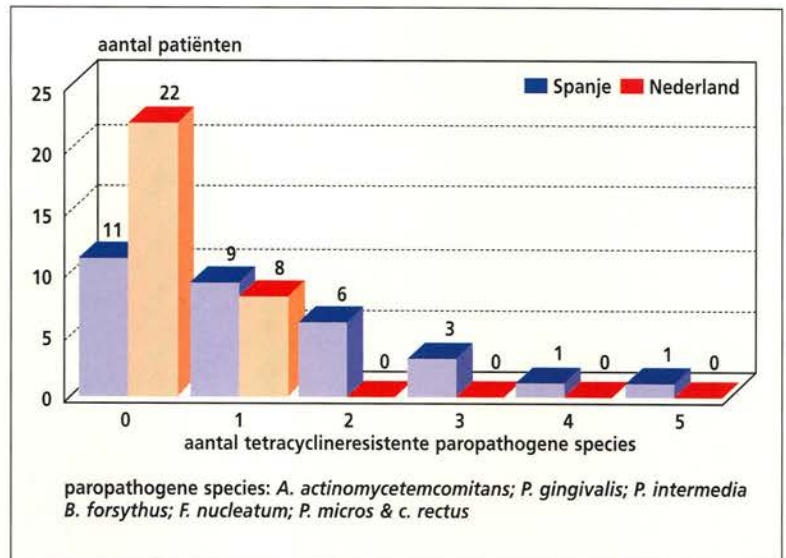
In dit onderzoek is de resistentie voor diverse antibiotica bekeken in de parodontale microflora van adulte patiënten met parodontitis in Nederland en Spanje. Voor dit vergelijkend onderzoek is voor Spanje gekozen vanwege het significant hogere antibioticumgebruik in dit land. Er is weinig bekend over de effecten van systemisch antibioticumgebruik op de resistentievorming in de parodontale microflora bij patiënten met parodontitis. In dit onderzoek is aangetoond dat het resistentieniveau in de anaërobe microflora voor penicilline, amoxicilline, metronidazol, clindamycine en tetracycline significant hoger is in de Spaanse patiënten. In het aërobe gedeelte van de subgingivale microflora werden hogere resistentieniveaus gevonden voor erythromycine, azithromycine en tetracycline. De resultaten van dit onderzoek tonen aan dat het gebruik van systemische antibiotica een grote invloed heeft op de gevoeligheid van de parodontale microflora in adulte patiënten met parodontitis. Een opvallende bevinding was dat 11 Spaanse patiënten meer dan 2 tetracyclineresistente paropathogene bacteriën hadden terwijl dit 0 was in de Nederlandse patiëntengroep.

De resistentie voor penicillinen (penicilline G en amoxicilline) wordt, ten minste voor een deel, veroorzaakt door de productie van bètalactamase. Een sterke aanwijzing hiervoor is gelegen in de grote gevoeligheid van de parodontale bacterie voor amoxicilline en clavulaanzuur. De grote gevoeligheid van de paropathogene bacterie voor metronidazol in zowel de Spaanse als de Nederlandse patiënten is een onder-



Afb. 2. Resistentie niveaus voor enkele antibiotica van aërobe bacteriën in de subgingivale plaque van adulte patiënten met parodontitis.

steuning voor het gebruik van dit antimicrobiële middel. Recentelijk is aangetoond dat metronidazol de klinische parodontale situatie in adulte patiënten met een therapieresistente vorm van parodontitis sterk kan verbeteren (Winkel et al, 1997). Ook de microbiologische samenstelling van de subgingivale microflora werd in gunstige zin veranderd.



Afb. 3. Aantal patiënten met een gegeven aantal tetracycline-resistente paropathogene bacteriën.

De resultaten van dit onderzoek hebben wellicht consequenties voor de tandheelkundige en medische professie. Het laat eens te meer zien dat antibioticumgebruik resistentievorming in de hand werkt. Dit moet voor de medische en de tandheelkundige professie een signaal zijn dat het voorschrijven van antibiotica met grote zorg moet worden gedaan. Voor antibiotica geldt nog steeds 'baadt het niet, het schaadt altijd'. Bij de behandeling van parodontitis betekent zorgvuldig handelen dat antibiotica moeten worden voorgeschreven op geleide van een bacteriologisch onderzoek en overigens pas dan als een grondige gebitsreiniging heeft plaatsgevonden en de mondhygiëne optimaal is. Een bacteriologisch onderzoek kan patiënten selecteren die baat kunnen hebben bij een antibioticumkuur (Van Winkelhoff en De Graaff, 1991). Ook de antibioticumkeuze dient te worden gebaseerd op bacteriologische informatie.

Literatuur

- APPELBAUM PC, SPANGLER SK, SHIMAN R, JACOBS MR. Susceptibilities of 540 anaerobic gram-negative bacilli to amoxicillin, amoxicillin-BRL 42715, amoxicillin-clavunilate, temafloxacin and clindamycin. *Antimicrob Agents Chem* 1992; 36: 1140-1143.
- BAQUERO F. Antibiotic resistance in Spain: what can be done? *Clin Infect Dis* 1996; 23: 819-823.
- CULLMANN W. Comparative evaluation of orally active antibiotics against community-acquired pathogens: results of eight European countries. *Chemoth* 1996; 42: 11-20.
- KINDER SA, HOLT SC, KORNMAN KS. Penicillin resistance in the subgingival microflora associated with adult periodontitis. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 1127-1133.
- PRADIER C, DUNAIS B, CARSENTI-ÉTESSE H, DELLAMONICA P. Pneumococcal resistance patterns in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 644-647.
- SLOTS J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomyces-temcomitans*. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 606-609.
- VOSS A, MILATOVIC D, WALLRAUCH-SCHWARZ C, ROSDAHL VT, BRAVENY I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 50-55.
- VAN WINKELHOFF AJ, DE GRAAFF J. Microbiology in the management of destructive periodontitis. *J Clin Periodontol* 1991; 18: 406-410.
- WALKER CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000* 1996; 10: 79-88.
- WINKEL EG, VAN WINKELHOFF AJ, TIMMERMAN MF, VANGSTED T, VAN DER VELDEN U. Effects of metronidazole in patients with refractory periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 573-579.

Summary

Key words:

- Periodontology
- Antibiotic resistance
- Periodontitis

Antibiotic resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis

The widespread use of antibiotics for treatment of bacterial infections has lead to the emergence of resistant human pathogens. Great differences have been documented between European countries in the use of systemic antibiotics. In parallel, significant differences in levels of resistant pathogens have been documented.

In order to investigate whether differences in antibiotic use influence the level of antimicrobial resistance of the subgingival microflora, microorganisms from the subgingival plaque of untreated patients with adult periodontitis in The Netherlands (n = 30) and Spain (n = 31) were compared. Blood agar plates containing breakpoint concentrations of penicillin, amoxicillin, amoxicillin and clavunilate, metronidazole, erythromycin, azithromycin, clindamycin and tetracycline were used to determine the proportion of bacteria from the subgingival plaque that was resistant to these antibiotics.

In the Spanish patients, statistically significant higher mean levels of resistance were found for penicillin, amoxicillin, metronidazole, clindamycin and tetracycline. The mean number of different bacterial species growing on the selective plates was higher in the Spanish patients, as was the percentage of resistant strains of most periodontal pathogens. A striking difference was observed in the frequency of occurrence of tetracycline-resistant periodontal pathogens. In Spain, 5 patients had > 3 tetracycline resistant periodontal pathogens, whereas this was not observed in any of the Dutch patients. It is concluded that the widespread use of antibiotics in Spain is reflected in the level of resistance of the subgingival microflora of adult patients with periodontitis.