

## BIOFILM RING TEST® – O NOUĂ METODOLOGIE DE EVALUARE *IN VITRO* A EFICACITĂȚII APELOR DE GURĂ

CAROLA PENTELESCU<sup>1</sup>, ADA DELEAN<sup>1</sup>, DAN POP<sup>1</sup>,  
VIORICA TEODORESCU<sup>3</sup>, LAURENȚIU PASCU<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Catedra de Odontologie

<sup>2</sup>Catedra de Protetică Dentară

<sup>1,2</sup>Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca

<sup>3</sup>Catedra de Odontologie, Facultatea de Medicină Dentară, Universitatea Ovidius, Constanța

### Rezumat

*Biofilmul plăcii dentare reprezintă factorul etiologic principal al cariei dentare și bolii parodontale. Prevenția cariei dentare și a afecțiunilor parodontiului marginal vizează îndepărtarea biofilmelor orale existente și prevenirea formării acestora. Apele de gură sunt mijloace ieftine, ușor de utilizat, scopul lor fiind combaterea biofilmelor și prevenirea apariției gingivitei. Testarea in vitro a agenților antiplacă trebuie să preceadă utilizarea clinică a acestora. Aceasta se realizează pe modele experimentale care imită biofilme create in vitro. Un astfel de model experimental este tehnica Biofilm Ring Test®. Principiul metodei constă în adăugarea unor bile magnetice la soluția bacteriană. Odată cu formarea biofilmelor, bilele magnetice sunt încorporate în matricea exopolizaharidică. După incubare, biofilmele sunt supuse unui proces de magnetizare și scanate într-un dispozitiv special. Pe baza imaginilor obținute se calculează un Indice de Formare a Biofilmelor (BFI), valorile acestuia indicând prezența sau absența biofilmelor. Astfel este posibilă depistarea rapidă, precisă și reproductibilă a biofilmelor.*

**Cuvinte cheie:** biofilme orale, agenți antimicrobieni, Biofilm Ring Test®.

## BIOFILM RING TEST® – A NEW TECHNIQUE OF *IN VITRO* EVALUATION OF MOUTHRINSES

### Abstract

*Oral biofilms are the etiological factor for dental caries and periodontal disease. Prevention should focus on the removal of existing oral biofilms and inhibition of new biofilm formation. Mouthrinses are efficient antiplaque and antigingivitis agents. Mouthrinses are tested in vitro before their clinical use. Biofilm models that mimic in vivo conditions are used for this purpose. Biofilm Ring Test® represents a new device for in vitro biofilm evaluation. The principle of the method consists of the addition of magnetic microbeads to the bacterial solution. During biofilm formation the beads are incorporated in the exopolysaccharide matrix. After incubation the biofilms are read with a special scanner prior and after magnetization. Based on the readings a Biofilm Forming Index (BFI) is calculated. The BFI values are indicating the presence or absence of biofilms. The Biofilm Ring Test® technique is a rapid, precise and reproducible method for biofilm detection.*

**Keywords:** oral biofilms, antimicrobial agents, Biofilm Ring Test®.

---

Articol intrat la redacție în data de: 27.05.2012

Primit sub formă revizuită în data de: 06.06.2012

Acceptat în data de: 11.06.2012

Adresa pentru corespondență: carollinchen@yahoo.com

## INTRODUCERE

Biofilmele au fost descrise din secolul 17, când Leeuwenhoek observa prima oară animaculele din placa dentară proprie [1]. Dar teoria biofilmului a fost postulată abia în 1978, când cercetări ulterioare privind dinamica formării și dezvoltării biofilmelor au dus la dobândirea cunoștințelor necesare pentru definirea biofilmelor. Astăzi biofilmele sunt definite ca fiind comunități bacteriene sesile atașate ireversibil de un substrat sau între ele, înglobate într-o matrice extracelulară de substanțe polimerice, pe care celulele bacteriene le-au produs și prezintă un fenotip modificat cu privire la rata de creștere și transcripția genelor [1]. Orice mediu în care sunt prezente bacterii și care prezintă un flux lichidian este predispus la apariția biofilmelor [2]. În acest sens, mediul oral reprezintă mediul ideal pentru apariția și instalarea biofilmelor, fiind expus fluxului salivar constant și prezentând numeroase și variate specii bacteriene. Cele peste 700 de specii bacteriene prezente în cavitatea orală [3] se organizează la nivelul suprafețelor dentare sub forma plăcii dentare. Aceasta reunește toate caracteristicile structurale și funcționale ale unui biofilm [4]. Particularitățile biofilmului plăcii dentare sunt diversitatea mare de specii bacteriene regăsite în acesta și comunicarea între celule sau de la microcomunitate la macrocomunitate, proces denumit "quorum sensing" [2]. Scopul acestui proces dinamic desfășurat între celulele bacteriene este de a-și semnaliza prezența unele față de altele și de a modula expresia genetică ca și răspuns la modificările densității populaționale [2]. Patogenitatea biofilmului plăcii dentare, ca și în cazul altor biofilme, este consecința rezistenței crescute față de substanțele antimicrobiene, precum și a incapacității de a fi fagocitat de celulele de apărare ale gazdei [2]. Biofilmele orale sunt unanim acceptate ca fiind factorul cauzal al principalelor afecțiuni ale cavității orale și anume caria dentară [5] și boala parodontală [6]. Un loc important în combaterea acestor afecțiuni revine prevenției. OMS atrage atenția asupra importanței care trebuie acordată prevenției, prin promovarea unui stil de viață cât mai sănătos, cu scopul creșterii calității vieții [7]. De la corelația demonstrată de Loe et al. [8] între placa dentară și gingivită, până în prezent, cercetări microbiologice, imunologice și modele experimentale de laborator au aprofundat și explicat corelația dintre placa dentară și cele două afecțiuni majore ale cavității orale [9]. Astfel prevenția cariei dentare și a afecțiunilor parodontului marginal vizează în principal îndepărtarea biofilmelor orale existente și prevenirea formării acestora.

## APELE DE GURĂ - MIJLOC COMPLEMENTAR DE IGIENĂ ORALĂ

Îndepărtarea biofilmelor orale de la nivelul suprafețelor dentare se poate realiza profesional în cabinetul de medicină dentară prin detartraj și periaj profesional. Dar principala metodă de îndepărtare a plăcii dentare

rămâne periajul dentar efectuat individual la domiciliu. S-a demonstrat că în timpul periajului dentar nu se realizează igienizarea corectă a spațiilor interdentare [10], fiind necesară utilizarea unor mijloace adjuvante de igienizare a spațiilor interdentare, cum sunt așa dentară și periutele interdentare, care permit controlul nivelului de placă din aceste zone. Studiile au arătat că, în medie, în țările Vest Europene un adult practică periajul dentar în medie un minut zilnic [9], timp evident insuficient pentru a asigura o îndepărtare corectă a biofilmelor orale. Un alt factor limitant al eficacității periajului dentar este lipsa de motivație a pacienților în efectuarea igienizării orale, precum și dificultatea medicilor de a motiva pacienții în scopul menținerii unei igiene orale cât mai corecte. Timpul necesar pentru a reuși motivarea corectă a pacientului, exprimată prin reduceri semnificative ale indicelui de placă este de 3.5 ore [10], interval extrem de lung atât pentru medic, cât și pentru pacient [10]. Pentru a mări eficiența periajului dentar într-un timp mai scurt au apărut periile dentare electrice. Acestea permit reducerea mai eficientă a plăcii dentare, 45% față de 30% prin periajul manual, necesită un timp mai scurt de periaj, nu presupun o tehnică complicată și sunt active și asupra plăcii dentare subgingivale [10]. Chiar și în aceste condiții complianța pacienților față de acest instrument de igienă orală rămâne limitată, între 24-36% [11], la aceasta adăugându-se și prețul de cost relativ ridicat al acestor dispozitive.

Dificultățile de îndepărtare corectă a plăcii dentare datorită factorilor mai sus amintiți, precum și incidența mare a gingivitei induse de placă în rândul populației, reprezintă argumentul principal în favoarea introducerii unor mijloace complementare de igienă orală. Mai mult, mucoasa orală este colonizată de un număr mare de bacterii, majoritatea speciilor prezente în biofilmul plăcii dentare fiind regăsite și pe suprafețele mucoasei orale [12]. Prin exfolierea continuă a mucoasei, bacteriile trec în salivă, făcând posibilă recolonizarea suprafețelor dentare igienizate, mucoasa servind astfel ca un rezervor permanent de bacterii [13]. Existența acestor nișe la nivelul cavității orale, care nu sunt igienizate prin periaj, constituie un alt argument pentru completarea periajului dentar cu mijloace suplimentare [13]. Implicațiile bacteriilor orale în apariția afecțiunilor cardiovasculare, a endocarditei bacteriene, a pneumoniei de aspirație și asocierea cu nașteri premature [14] reprezintă încă un motiv pentru combaterea biofilmelor orale. Astfel se impune suplimentarea mijloacelor mecanice de îndepărtare a biofilmelor orale prin introducerea agenților antimicrobieni. Scopul acestora este de a crește eficiența periajului dentar și de a reduce încărcătura bacteriană de la nivelul cavității orale. Mecanismul lor de acțiune constă fie în prevenirea formării biofilmelor, fie în distrugerea biofilmelor deja formate, fie în împiedicarea creșterii și dezvoltării biofilmelor sau uciderea anumitor sușe bacteriene de la nivelul biofilmelor [15]. Agenții antimicrobieni, în principal substanțe chimice, sunt încorporați în ape de

gură, paste de dinți, gume de mestecat și altele.

Apele de gură sunt mijloace ieftine ce oferă beneficiul de a fi ușor de utilizat, fără a necesita o manualitate deosebită din partea pacientului. Apele de gură pătrund în toate zonele cavității orale, reducând numărul bacteriilor atât la nivelul suprafețelor dure, cât și la nivelul mucoasei orale [16]. Scopul lor este de a combate biofilmele orale, de a preveni apariția gingivitei [9] și progresia parodontopatiei marginale cronice [16]. Eficacitatea clinică a apelor de gură a fost demonstrată prin numeroase studii efectuate pe termen scurt, mediu și lung, care au arătat că diversele substanțe încorporate în apele de gură contribuie eficient la reducerea nivelului de placă și a inflamației gingivale [17]. Înainte de a fi testați clinic, agenții antiplacă sunt testați *in vitro* pentru a determina efectul antimicrobian și efectul asupra biofilmelor orale al acestora.

### TESTAREA EFICACITĂȚII AGENȚILOR ANTIPLACĂ

O caracteristică majoră a bacteriilor care trăiesc în biofilme o constituie rezistența acestora față de agenții antimicrobieni. Astfel celulele bacteriene din biofilme se comportă diferit față de agenții antimicrobieni, comparativ cu celulele în stare planctonică [1]. Apele de gură, în timpul scurt cât sunt aplicate asupra biofilmelor orale, trebuie să penetreze matricea extracelulară în vederea pătrunderii în grosimea biofilmelor pentru a fi eficiente asupra bacteriilor [18]. Din aceste considerente rezultatele obținute prin testarea efectului antimicrobian asupra celulelor în stare planctonică vor fi diferite față de rezultatele obținute prin testarea aceluiași produs asupra aceleiași sușe bacteriene, când aceasta se găsește în interiorul unui biofilm [18]. Pentru a evita aceste neajunsuri și pentru a obține condiții experimentale mai apropiate de condițiile din cavitatea orală în timpul cercetării biofilmelor *in vitro*, s-au dezvoltat multiple tehnici experimentale ce urmăresc formarea biofilmelor *in vitro*. Apariția acestor modele experimentale de formare a biofilmelor *in vitro* constituie un pas înainte în cercetarea produselor anti-placă, permițând testarea agenților antimicrobieni asupra biofilmelor orale [9]. Unele din aceste modele experimentale realizează formarea biofilmelor în stare dinamică, cum ar fi Constant Depth Film Fermenter, dezvoltat de Pratten et al. [19] sau formarea biofilmelor în dispozitive speciale, cum sunt spre exemplu camerele Ludin în care soluția bacteriană este angajată într-un flux continuu cu ajutorul unei pompe peristaltice. Alte modele experimentale se bazează pe formarea statică a biofilmelor. Dintre aceste metode, cea mai cunoscută este tehnica cristal violet de cercetare a biofilmelor sau modelul dezvoltat de Guggenheim et al., în care biofilmele sunt formate pe discuri de hidroxiapatită [20]. O nouă tehnică de cercetare a biofilmelor orale *in vitro* este Tehnologia Biofilm Ring Test®, dezvoltată de Biofilm Control® Saint Beazuire, Franța.

### TEHNOLOGIA BIOFILM RING TEST®

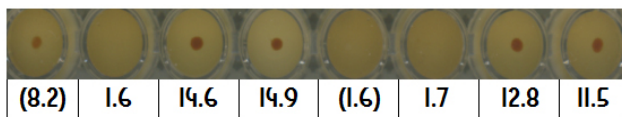
Dispozitivul Biofilm Ring Test® cuprinde un set de aparate necesare pentru formarea și evaluarea biofilmelor. Kit-ul complet de efectuare a analizei biofilmului prin tehnologia Biofilm Ring Test® cuprinde:

- Un flacon Toner 0.05 sau 0.06, care conține soluția cu bile magnetice;
- Un flacon soluție de contrast;
- 12 barete de polistiren a câte 8 godeuri fiecare;
- Un dispozitiv de magnetizare care prezintă 96 de poziții. În dispozitivul de magnetizare pot fi așezate 12 barete a câte 8 godeuri fiecare, deci pot fi magnetizate 12 barete odată. Baretele de polistiren sunt așezate în dispozitivul de magnetizare, astfel încât centrului fiecărui godeu să îi corespundă unui centru de magnetizare;
- Un scanner special – Biofilm Reader® (Saint Beazuire, France), utilizat pentru lecturarea baretelor înainte și după magnetizare;
- Un calculator dotat cu un software special, în care vor fi stocate și analizate datele primite de la scanner;
- Un software special – Biofilm Control Elements® (Saint Beazuire, France), conceput special pentru compararea imaginilor și calcularea Indicelui de Formare a Biofilmului BFI.

### PRINCIPIUL METODEI

Principiul metodei Biofilm Ring Test® a fost descris pe larg de Chavant et al. [21]. Se bazează pe adăugarea la soluția bacteriană a unor bile magnetice cu diametrul de 5 sau 6 microni. Bilele magnetice se găsesc în soluția de Toner, iar proporția de adăugare a Tonerului la soluția bacteriană este de 1%. Amestecul soluție bacteriană-bile magnetice va fi inoculat în barete de polistiren a câte 8 godeuri fiecare. Soluția bacteriană este apoi incubată timpul necesar pentru formarea biofilmelor, specific pentru fiecare bacterie în parte. Se vor respecta de asemenea condițiile de aerobioză sau anaerobioză necesare dezvoltării biofilmelor bacteriene. Odată cu inițierea formării biofilmelor bacteriile vor sintetiza matricea exopolizaharidică. Bilele magnetice adăugate la soluția bacteriană vor fi cuprinse în interiorul matricii exopolizaharidice, fiind reținute astfel ferm în interiorul biofilmului. După perioada de incubare în godeuri se va adăuga un lichid de contrast care va permite lecturarea baretelor în scannerul special Biofilm Reader®. După prima lectură datele culese de scanner vor fi trimise în calculator, fiind interpretate și stocate de software-ul special Biofilm Control Elements®. Baretele vor fi introduse apoi în dispozitivul special de magnetizare și vor fi magnetizate timp de 1 minut. Bilele care nu au fost reținute în matricea exopolizaharidică în timpul formării biofilmului, vor fi atrase spre centrul godeului, formând un inel de culoare roșie. După magnetizare se va efectua o a doua lectură care va permite detectarea bilelor magnetice depuse pe baza godeului (Fig. 1). Datele culese după această a doua lectură vor fi transmise, interpretate și stocate de asemenea în

calculator. Din compararea imaginilor obținute după prima și cea de-a doua lectură pentru fiecare godeu se va calcula o valoare denumită Indice de Formare a Biofilmului – BFI. Astfel un BFI inferior lui 2 indică formarea completă a biofilmului, un BFI superior lui 7 arată absența biofilmului, iar valorile intermediare se traduc prin biofilme în curs de formare [21].



**Fig. 1** Ilustrează imaginea afișată de calculator după a doua scanare a baretei. Godeurile 1,3,4,7,8 arată absența completă a biofilmului. Inelul roșu la baza godeului apare ca urmare a atracției bilelor magnetice în această arie în timpul magnetizării. În godeurile 2,5,6 lipsa inelului roșu exprimă prezența unui biofilm complet format.

#### METODE DE CERCETARE A BIOFILMELOR ORALE CU TEHNOLOGIA BIOFILM RING TEST®

Tehnica Biofilm Ring Test® poate fi aplicată în mai multe moduri în vederea cercetării efectului agenților antiplacă asupra biofilmelor orale.

O primă metodă o constituie pretratarea suprafețelor godeurilor o anumită perioadă de timp cu produsul care urmează să fie testat. Apoi din godeuri se elimină produsul testat și se aplică soluția bacteriană. Baretele se vor incuba în condiții corespunzătoare perioada de timp necesară formării biofilmelor. În următoarea etapă, baretele vor fi lecturate și se vor interpreta rezultatele în funcție de valorile BFI obținute. În absența formării biofilmelor, BFI mai mare decât 7, produsul poate fi considerat ca un produs eficient în inhibarea adeziunii bacteriilor pe suprafețele pretratate.

O altă modalitate de testare a acțiunii produselor asupra biofilmelor constă în formarea inițială a biofilmelor pe suprafața godeurilor. În acest sens soluția bacteriană va fi inoculată în godeuri și acestea vor fi incubate timpul necesar respectând condițiile de creștere a bacteriilor. Ulterior soluția bacteriană va fi eliminată prin aspirare atentă și în godeuri va fi inoculat produsul de testat și lăsat să acționeze asupra biofilmelor o anumită perioadă de timp. Baretele vor fi ulterior lecturate cu scannerul special, iar rezultatele vor fi interpretate în funcție de valorile BFI. Prin această metodologie de lucru se poate analiza capacitatea produsului testat de a detașa biofilmele deja formate de la nivelul suprafețelor unde acestea s-au constituit.

Un alt mecanism de acțiune care poate fi testat prin tehnologia Biofilm Ring Test® este acela al unor substanțe de a interfera cu formarea biofilmelor. În acest sens soluția bacteriană este mixată cu produsul de testat, iar acestea vor fi inoculate concomitent în godeuri și incubate în condiții optime. După lecturarea baretelor cu scanner-ul special, rezultatele sunt corelate cu valorile BFI. Un studiu a fost efectuat în acest sens cu furanona C30 care s-a dovedit a fi

un potențial inhibitor al formării biofilmelor de *Streptococcus mutans*, prin inhibarea semnalelor de tip quorum sensing trimise de aceste bacterii [22].

Tehnologia Biofilm Ring Test este o tehnică rapidă de studiu a dezvoltării biofilmelor, fiind potrivită și pentru studiul dinamic al formării biofilmelor, așa cum arată Nagant et al. [23].

#### CONCLUZII

Avantajele acestei metode sunt simplitatea de manipulare, rapiditatea și reproductibilitatea foarte mare [21]. Este o tehnică care nu necesită metode laborioase, care nu implică multiple faze de laborator sau tehnici sofisticate și nici o tehnologie foarte extinsă de laborator. Face posibilă efectuarea unui număr mare de teste simultan și permite testarea concomitentă a mai multor produse asupra biofilmelor în aceleași condiții experimentale.

#### Bibliografie

1. Donlan M, Costerton WJ. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002; 15:167–193
2. Thomas JC, Lindsay A, Nakaishi BS. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *JADA*, 2006; 137(Suppl 3):10-15
3. Sokransky S, Haffajee A. Periodontal microbial ecology. *Periodontology*, 2000 2005; 38:135–187
4. Marsh PD. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res*, 2004; 38:204–211
5. ten Cate J. Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology*, 2006; 94:1-9
6. Newman M.G, Takei H, Caranza F. "Caranza's Clinical Periodontology", Saunders Company, 9<sup>th</sup> Edition,
7. Petersen PE. WHO global policy for improvement of oral health – World Health Assembly 2007. *Journ Dent Res* 2008;58:115-121
8. Loe H, Theilande E, Jensen B. Experimental gingivitis in man. *Journ Period Res* ,1967;2: 282-289
9. Baehni P, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Diseases*, 2003; 9 (Suppl 1): S23–S29
10. Petersilka G, Ehmke B, Flemmig T. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontology*, 2000 2002; 28:56-71
11. McCracken G, Janssen J, Heasman L, et al. Assessing adherence with toothbrushing instructions using a data logger toothbrush. *Br Dent J*, 2005; 198:29-32;
12. Mager DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin of Period*, 2003; 30:644–654.
13. Barnett M. The rationale for the daily use of an antimicrobial mouthrinse. *JADA*, 2006;137( Suppl 3):16S-21S
14. Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y. Quantitative Analysis of Multi-Species Oral Biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clin Med Res*, 2005; 3: 176–185
15. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J. Med Microb*, 1996; 44 : 79-87
16. Lamster I. The Antimicrobial mouthrinses and the management of periodontal diseases: Introduction to the supplement. *JADA*, 2006; 137(Suppl 3):5S-9S

17. Gunsolley J. A meta-analysis of six month clinical studies of anti-plaque and anti-gingivitis agents. *JADA*, 2006;137:1649-1657
18. Barnett M. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice. Control of supragingival plaque and gingivitis. *JADA*, 2003; 134:699-704
19. Pratten J, Wills K, Barnett P, Wilson M. In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *S sanguis* biofilm formation. *Journ of Appl Microb*, 1998; 84:1149-1155
20. Guggenheim B, Giertsen E, Schupbachl P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res*, 2001; 80:363-370
21. Chavant P, Gaillard-Martinie B, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *J Microbiol Methods*, 2007; 68:605-612.
22. Wang Y, Wang Q, Hu Y. Effect of furanone C-30 on initial biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Biomedicine*, 2012; 3: 1-4
23. Nagant C, Tré-Hardy M, Devleeschouwer M, Dehaye JP. Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. *J Microbiol Methods*, 2010; 82:243-248