



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI MILANO-BICOCCA
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dottorato di Ricerca in Parodontologia Sperimentale

RAPPORTI FRA PARODONTOLOGIA ED
ORTODONZIA: VALUTAZIONE
DELL'ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DELLE
LEGATURE
ORTHOSHIELD SAFE-T-TIE
A RILASCIO D'ARGENTO NEI PAZIENTI
SOTTOPOSTI A TRATTAMENTO
ORTODONTICO.

Prof. Marco Coordinatore Baldoni

Tutore: Dott. Riccardo Monguzzi

Tesi di dottorato:

Dott. Emanuela Gerardi

Matricola 716416

Ciclo XXIII - Anno Accademico 2009/2010

Ringraziamenti:

Ringrazio il Chiar.mo Prof. Marco Baldoni per avermi trasmesso la passione scientifica per la Parodontologia Sperimentale e per i preziosi insegnamenti che mi ha dato in questi anni

Ringrazio il Dott. Riccardo Monguzzi per avermi seguito e consigliato durante la compilazione di questa tesi.

INDICE

1. Aspetti parodontali in ambito ortodontico	pag 7
2. La malattia parodontale	pag 15
2.1 Descrizione generale	pag 15
2.2 Eziopatogenesi	pag 16
2.3 Processo di colonizzazione batterica	pag 20
2.4 Aspetti sintomatologici in ambito parodontale	pag 22
2.5 Fattori microbiologici nella malattia parodontale	pag 23
2.6 Rilevanza Clinica del Test Microbiologico nella Malattia Parodontale	pag 24
2.7 Modalità di Esecuzione del Test Parodontale	pag 27
2.8 Pcr-Real Time	pag 28
3. Tecnologia all'argento	pag 31
3.1 Efficacia antimicrobica in vitro	pag 32
4. Scopo dello studio	pag 34
5. Materiali e metodi	pag 35
6. Risultati	pag 39
7. Casi clinici	pag 45
7.1 Caso clinico A	pag 45
7.2 Caso clinico B	pag 51

7.3 Caso clinico C	pag 57
7.4 Caso clinico D	pag 63
8. Conclusioni	pag 69
9. Bibliografia	pag 72

1. ASPETTI PARODONTALI IN AMBITO ORTODONTICO

L'accumulo di placca aumenta nel momento in cui vengono posizionati brackets, bande e apparecchi ortodontici fissi. La maggior parte dei pazienti, anche quelli con una buona igiene orale sviluppa una gengivite generalizzata in seguito al posizionamento di apparecchi fissi, ma in genere non presenta perdita di attacco. Alcuni studi, tuttavia, hanno riportato la perdita di attacco durante il trattamento ortodontico con apparecchi fissi.

Una manifestazione clinica della reazione infiammatoria è l'aumento della profondità di tasca per un'ipertrofia gengivale (pseudotasca). Sono state proposte diverse teorie per spiegare ciò: reazioni allergiche, irritazione meccanica, effetti citotossici delle bande/brackets o il legame del materiale e le modificazioni della flora sottogengivale.

Alcune interessanti scoperte sono state fatte dopo aver paragonato gruppi trattati ortodonticamente e gruppi non trattati ortodonticamente. In uno studio longitudinale Sadowsky et al.¹ paragonano soggetti che hanno subito un trattamento ortodontico durante l'adolescenza con un altro gruppo con malocclusioni che non sono state trattate. I gruppi sono stati confrontati per razza, sesso, età, stato socio economico, consapevolezza dell'igiene orale e dentale. Nonostante la prevalenza generale della malattia parodontale fosse

simile, una dettagliata analisi dei gruppi ha svelato che il gruppo trattato ortodonticamente aveva una leggera predisposizione alla malattia parodontale moderata nella regioni superiori posteriori e inferiori anteriori. Mentre il trattamento ortodontico nell'adolescenza non è un importante determinante della salute parodontale a lungo termine, alcuni cambiamenti parodontali non favorevoli possono essere trovati nei pazienti ortodontici adulti. Sono necessarie ulteriori ricerche per dimostrare se questi cambiamenti sono associati al tipo e alla durata del trattamento ortodontico. Al contrario, la mancanza di trattamento ortodontico nell'adolescenza non sembra influenzare lo sviluppo della malattia parodontale nell'adulto. Un significativo miglioramento nell'igiene orale può seguire il trattamento ortodontico. Davies e coll.² hanno registrato gli indici di placca, di sanguinamento e la condizione di irregolarità dentale dei denti anteriori nei bambini trattati o no ortodonticamente. I bambini sono stati riesaminati 3 anni dopo la valutazione iniziale. Hanno riportato significanti diminuzioni negli indici di placca e gengiviti su tutte le superfici dentali in entrambi i gruppi a 3 anni. I bambini che hanno ricevuto il trattamento ortodontico hanno mostrato maggiori riduzioni. Queste diminuzioni sembrano essere associate a fattori comportamentali piuttosto che all'allineamento dentale.

Glans, Larsson ed Øgaard B³ nel presente studio hanno esaminato ulteriormente il rapporto tra la iniziale salute gengivale e l'affollamento dentale durante la terapia ortodontica fissa. Un totale di 220 pazienti sono stati seguiti longitudinalmente durante il trattamento. In questa popolazione, 2 gruppi, uno composto da 45 pazienti con grave affollamento e 1 composto da 52 pazienti senza

affollamento, sono stati esaminati più da vicino. L'indice di sanguinamento gengivale (GBI) è stato registrata al bonding, a 12, 24 e 48 settimane dopo l'incollaggio, e al debonding. Al bonding, GBI è stata la stessa nei 2 gruppi. Tuttavia, il GBI è migliorata significativamente rispetto al bonding, dopo 12 settimane di debonding in pazienti con dentatura affollata, mentre i pazienti con dentatura senza affollamento non hanno mostrato cambiamenti. Le possibili ragioni di questa differenza sono stati identificate: per avere lo stesso GBI al bonding, nonostante l'affollamento grave, i pazienti di questo gruppo aveva probabilmente una migliore igiene orale. Quelli con dentature affollate avevano ricevuto più istruzione di igiene orale nei 2 anni prima del bonding di quelli con dentatura non affollata, in base ai registri della medicina generale. Quando l'affollamento è stato eliminato dopo circa 3 mesi, le condizioni per la pulizia dei denti sono migliorate e, di conseguenza, migliorare l'igiene orale dei pazienti ha comportato un abbassamento dei valori di GBI. Si potrebbe anche ipotizzare che la correzione dell'affollamento durante i primi mesi di trattamento ha avuto un effetto psicologico positivo, motivando i pazienti di utilizzare le competenze in materia di igiene orale che avevano adottato prima del trattamento.

Gli apparecchi ortodontici creano un favorevole ambiente per l'accumulo di microrganismi e residui alimentari che possono causare carie o malattia parodontale. Naranjo e coll.⁴ hanno osservato un cambiamento nei microrganismi che popolano la placca sottogengivale dopo il posizionamento dei brackets. Gli indici delle gengiviti da placca sono aumentati significativamente. I livelli di *P. gingivalis*, *P. intermedia*/*P. nigrescens*, *T. forsythia* e le specie di

Fusobacterium sono aumentate significativamente dopo il posizionamento di bracket rispetto a un gruppo di controllo non trattato.

Nel gruppo in trattamento sono stati trovati anche microrganismi super infettanti come *E. cloacae*, *K. oxytoca*, *K. Pneumoniae* e *S. marcescens*. Lee e coll.⁵ sono riusciti a individuare significative differenze nella placca dentale sottogengivale recuperate da aree con gengiviti in pazienti con o senza apparecchi fissi: *T. forsythia*, *T. denticola*, e *P. nigrescens* erano più comuni nei pazienti ortodontici. Questi risultati indicano che in seguito al posizionamento di apparecchi fissi, i microrganismi patogenetici della placca dentale sono aumentati con un conseguente aumento delle gengiviti. Non sono stati trovati aumenti nella profondità di tasca. Cambiamenti nei tipi di microrganismi sono limitati alla placca dentale sui denti supportati da apparecchi ortodontici.

Locali cambiamenti si sono verificati nei microrganismi e nei tessuti parodontali in seguito al posizionamento di apparecchi ortodontici. Huser e coll.⁶ hanno eseguito esami clinici e batteriologici all'inizio del trattamento ortodontico e a 90 giorni dal posizionamento degli apparecchi. Hanno riportato un aumento della placca e del sanguinamento sui denti bandati rispetto a quelli dei gruppi di controllo. La profondità di tasca, tuttavia, è rimasta in range normali. Hanno esaminato, inoltre, la composizione della placca con un microscopio in un campo scuro e hanno trovato aumenti nella percentuale di spirochete, bastoncelli con motilità, filamenti e fusiformi nei siti post-bandaggio. Dopo 90 giorni non ci sono stati

significativi cambiamenti nella distribuzione dei microrganismi nel gruppo di controllo.

In un piccolo gruppo di pazienti bandati e in un gruppo di controllo, Diamante-Kipioti e coll.⁷ hanno osservato un aumento nei pigmenti scuri batterici, ma non un aumento degli indici di placca e gengivali. Le scarse profondità di tasca sono aumentate dai livelli base nel gruppo sperimentale, ma non in quello di controllo. In uno studio simile Petti e coll.⁸ hanno paragonato l'influenza degli apparecchi fissi e rimovibili sulla flora sopra e sottogengivale. I loro dati indicano che mentre le gengiviti e le parodontiti non si presentano in pazienti con una buona igiene orale durante i primi 6 mesi del trattamento, cambiamenti nei microrganismi orali dopo suggeriscono che i pazienti con apparecchi fissi rischiano di sviluppare gengiviti e parodontiti. Gli studi sopramenzionati mostrano che i cambiamenti nel microambiente dopo il posizionamento di apparecchi fissi sono accompagnati da un aumento di gengiviti.

In uno studio di Attin e coll.⁹ viene valutata la ricolonizzazione dello *S. Mutans* dopo l'applicazione professionale di vernice o gel al 40% di clorexidina su denti con o senza attacchi ortodontici. L'analisi statistica indica che dopo 8 settimane dell'applicazione della vernice sui denti con apparecchi ortodontici la ricolonizzazione dello *S. Mutans* è stata più elevata ($P < 0,05$).

Ristic, Vlahovic Svabic, Sasic, Zelic¹⁰ in uno studio prospettico su 32 adolescenti è giunto alla conclusione che l'apparecchio ortodontico determina l'aumento del numero di pazienti positivi alla Prevothella intermedia e ad altri batteri anaerobi periodontopatici, aumento del numero totale di microrganismi, aumento dei valori di profondità di

tasca dal T0 prima dell'inizio della terapia al T2 dopo 2 mesi dall'inizio. Valori che diminuiscono 6 mesi dopo l'inizio della terapia ortodontica. Per cui l'apparecchio ortodontico dà una transitoria crescita di batteri peridontopatogeni risultante in una risposta infiammatoria dei tessuti gengivali ma senza effetto distruttivo sui tessuti periodontali profondi.

Al contrario in uno studio di Hamp et al.¹¹, il trattamento ortodontico a lungo termine di 53 pazienti adolescenti sottoposti a misure di prevenzione di corretta igiene orale prima e durante il trattamento ortodontico, ha portato ad una lieve ma significativa perdita di sostegno parodontale. Alla fine di $24 \pm 3,5$ mesi di terapia, la perdita media di attacco buccale era di 0,28mm, la perdita media di attacco linguale di 0,22mm. Una riduzione media dell'altezza ossea marginale interapprossimale di 0,29mm. Queste alterazioni sono irreversibili, ma non è stato rilevato ulteriore deterioramento nel corso di un successivo follow-up di 20 ± 30 mesi. Gli effetti dei differenti materiali usati nella moderna ortodonzia sui microrganismi e la salute parodontale non sono stati studiati completamente.

Turkkakraman et al.¹² hanno valutato l'influenza di differenti metodi di legature dell'arco (legature in acciaio contro anelli elastomerici) sulla flora batterica intra-orale e sulla salute parodontale. Nonostante i denti con anelli elastomerici presentino leggermente un più alto numero di microrganismi piuttosto che quelli con fili in acciaio, le differenze non sono statisticamente significative. Non ci sono differenze negli indici di placca gengivali o nella profondità di sondaggio dei denti legati. Tuttavia, le gengive intorno ai denti legati con anelli elastomerici sono inclini al sanguinamento.

Forsberg, Brattström, Malmberg¹³ hanno valutato due tipi di legature con fili metallici ed anelli elastomerici, valutando la loro associazione con la colonizzazione di streptococcus mutans e lactobacilli. Dodici pazienti sottoposti a trattamento ortodontico con apparecchiature fisse hanno preso parte a questo studio. In tutti i pazienti sono stati utilizzati gli anelli elastomerici per la legatura su un'emiarcata, mentre il filo di acciaio è stato utilizzato sul lato opposto. Il numero di microrganismi in campioni di placca, prelevati dalla superficie vestibolare degli incisivi laterali superiori, è stato registrato in cinque occasioni nel corso del trattamento. In contemporanea, sono stati registrati in campioni di saliva, i numeri di Streptococcus mutans e lactobacilli. Queste registrazioni sono state eseguite prima dell'inserimento dell'apparecchio fisso, e 6 settimane dopo il periodo di trattamento attivo. I risultati hanno dimostrato che, nella maggior parte dei pazienti, l'incisivo che è stato legato all'arco con un anello elastomerico, ha un maggior numero di microrganismi nella placca, rispetto all'incisivo legato con filo di acciaio. Dopo l'inserimento di apparecchi fissi il numero di S. mutans e lactobacilli nella saliva sono notevolmente aumentati. Le variazioni del numero di microrganismi nella saliva durante il trattamento attivo non è in relazione con l'aumento o la diminuzione della colonizzazione microbica delle legature elastomeriche e delle legature metalliche. L'uso di retainers dopo il trattamento attivo non è stata associato ad un aumento del numero di microrganismi nella saliva.

Sukontapatipark, El-Agroudi, Selliseth, Thunold, Selvig¹⁴ hanno fatto uno studio su 11 pazienti sottoposti a trattamento ortodontico con estrazioni di 2 o 4 premolari. Sono stati applicati brackets sui

premolari da estrarre con composito, sui brackets da una parte sono state usate legature elastiche, mentre sui brackets dei denti controlaterali sono state posizionate legature metalliche. I soggetti continuano il normale regime di igiene orale. I denti vengono estratti ad 1, 2 e 3 settimane dall' applicazione dei brackets. La valutazione al microscopio elettronico di questi denti ha dimostrato che il punto più critico per l'accumulo di placca è l'eccesso di composito intorno ai brackets perché si presenta ruvido e con piccoli spazi nell'interfaccia smalto-composito. Il metodo di legatura non influisce sulla morfologia batterica della superficie del composito o dello smalto.

Van Gastel et al.¹⁵ in un trial clinico randomizzato con split-mouth design, paragonano la crescita di placca, i parametri parodontali e il flusso del fluido crevicolare sui denti con 2 differenti tipi di brackets rispetto a denti privi. Mostrano che c'è un aumento significativo del numero di aerobi come pure di colonie di anaerobi sui primi. Ci sono anche differenze significative tra i denti con i differenti tipi di brackets. L'aspetto più importante è che c'è una significativa differenza nel rapporto tra le unità di aerobi e di anaerobi che indica la patogenicità dello strato della placca dentale. Questi Autori concludono dicendo che la forma del sistema di bracket ortodontici può rendere l'ambiente orale meno favorevole per lo sviluppo della placca.

2. LA MALATTIA PARODONTALE

2.1 Descrizione Generale

La malattia parodontale è ubiquitariamente diffusa nella popolazione mondiale, studi recenti stimano che nel 25% dei casi essa abbia andamento più o meno rapidamente distruttivo ed altamente invalidante.

Secondo i dati pubblicati dalla SIDP nel 2003, emerge che in Italia il 60% degli adulti sia affetto da vari gradi di malattia parodontale, di cui il 10-14% in forma grave ed avanzata. L'aumento dell'incidenza è drastico nel range di età tra i 35 ed i 44 anni. Secondo le ultime evidenze scientifiche^{58 59 60 61}, la parodontite inoltre costituisce un fattore di rischio per l'inizio e lo sviluppo di importanti patologie sistemiche.

L'elevata concentrazione di batteri patogeni nelle lesioni parodontali provoca episodi di batteriemia ed immissione in circolo di tossine, collegabili all'inizio ed alla progressione di importanti patologie sistemiche: malattie respiratorie, cardiovascolari, contaminazione batterica valvolare e delle placche ateromatose²⁵ (Seymour G.J. et al. 2007). È inoltre dimostrata l'esistenza di un legame bidirezionale con il diabete mellito (forte predisposizione del diabetico alla malattia parodontale e maggiore difficoltà del controllo metabolico glicemico

qualora essa non sia trattata^{62 63 64 65}(Lamster I.B. et al. 2008). Anche il filtro placentare può essere bypassato con conseguente aumento dei mediatori responsabili del parto prematuro e possibilità di nascite sottopeso^{66 67 68 69 70 71 72 73} (Marakoglu I. et al. 2008).

2.2 Eziopatogenesi

Il termine Malattia Parodontale o Parodontite identifica la patologia orale comunemente conosciuta come “piorrea” e tecnicamente definita come “perdita dell’attacco parodontale”. L’attacco parodontale collega la radice dei denti alla corticale dell’osso alveolare permettendo ai medesimi di avere stabilità e funzione corretta.

Si tratta di una malattia cronica a eziologia polimicrobica e sito specifica²² che colpisce i tessuti di sostegno dei denti: il cemento radicolare, l’osso alveolare, il legamento parodontale e la gengiva. Dati epidemiologici recenti indicano come la prevalenza e la possibilità di subire danni irreversibili con perdita di elementi dentali aumentino con l’età, con un picco di incidenza tra i 50 e 60 anni. Per quanto riguarda la distribuzione tra i sessi le donne risultano essere più colpite degli uomini; per il resto la malattia ha una diffusione ubiquitaria, anche se con specifiche predilezioni etniche e geografiche (influenti sono la razza e/o l’etnia, il background genetico, l’ubicazione geografica, i costumi sociali, lo status socio-economico, le pratiche alimentari di una popolazione).La malattia si manifesta in un primo tempo con un quadro clinico di gengivite marginale. Il paziente spesso racconta di gengive sanguinanti, arrossate,

tumefatte e dolenti. La presenza dei batteri a livello della gengiva marginale attiva la risposta immunitaria dell'ospite: i capillari si dilatano, aumenta il flusso sanguigno, afferiscono i globuli bianchi che, nella messa in opera del meccanismo di difesa, provocano attivazione di sistemi immunologici (interleuchine etc.) ed enzimatici (collagenasi) a cascata il cui funzionamento incontrollato attiva un distacco ed ad una distruzione delle fibre marginali che normalmente connettono la gengiva alla superficie radicolare. Così il solco gengivale, punto dove la gengiva produce una sorta di "anello fibroso-mucoso" che fa da barriera per impedire il passaggio batterico, e che normalmente ha una profondità massima di 2 millimetri, va gradualmente approfondendosi, e mano a mano che progredisce il fenomeno di distruzione delle fibre parodontali, si trasforma in una tasca parodontale. Si assiste contemporaneamente ad un marcato incremento della quota di batteri anaerobi obbligati che trovano proprio nella tasca parodontale, in assenza di ossigeno, il loro habitat ideale. Dunque il quadro clinico di infiammazione gengivale una volta instaurato e non trattato evolverà inevitabilmente, in una manifesta parodontite, caratterizzata dalla distruzione delle fibre e del tessuto osseo.

È ormai noto da molti anni che diversi sono i fattori coinvolti nello sviluppo e nella progressione della malattia parodontale¹⁹ (Socransky S.S. et al. 2005). Gli elementi che cooperano all'instaurarsi e al progredire di quest'infezione si distinguono in fattori principali e fattori concausali. Causa sufficiente e necessaria per l'instaurarsi dell'infezione è la presenza di batteri anerobi obbligati (qualità e quantità microbiologica della placca batterica). Vi sono poi tutta una

serie di concause primarie e secondarie, locali e sistemiche, che in assenza di batteri non provocano malattia ma, associate alla causa primaria, sono in grado di favorire ed accelerare notevolmente l'evoluzione in senso negativo della malattia stessa. Tra le concause sistemiche la primaria è la suscettibilità dell'ospite all'infezione, ovvero il tipo e l'importanza della risposta immunitaria individuale che l'ospite è in grado di attuare. Sono ormai note tutta una serie di concause secondarie sistemiche strettamente correlate alla parodontite:

- **Variazioni ormonali:** nelle donne i picchi ormonali legati ai periodi di gravidanza, allattamento, climaterio possono notevolmente accelerare la progressione della parodontite; va inoltre ricordato che spesso la malattia parodontale si conclama a climaterio avvenuto anche per il concomitante instaurarsi di un processo di osteoporosi.
- **Patologie endocrine:** è ormai riconosciuto il legame diretto tra diabete e parodontopatia infatti un elevato livello di zucchero nel sangue assicura alla componente batterica patogena una costante nutrizione e viceversa la presenza dell'infezione parodontale rende difficile il monitoraggio della glicemia nel diabetico.
- **Patologie sistemiche:** che in modo diretto e/o indiretto possono indurre alterazioni quali - quantitative della risposta aspecifica ed immunitaria dell'ospite rendendolo maggiormente suscettibile all'insulto infettivo (HIV, sindromi rare con difetto

quantitativo funzionale dei macrofagi e dei leucociti PMN es. Sindrome di Papillon – Lefevre, Sindrome di Chediak – Higashi) .

- **Fattori individuali:** il corredo genetico, lo stato di salute, la dieta, le procedure di igiene orale, il fumo, l'uso di droghe, lo stress e soprattutto le persone con le quali l'individuo interagisce e si relaziona nel contesto comunitario.

Tra le concause locali invece sono da annoverare:

- **Fattori anatomici:** ha infatti molta importanza, ai fini di un incipit dell'infezione, la natura ed il tipo di recettori batterici collocati sui tessuti duri e molli necessari per l'attacco iniziale delle specie microbiche, la natura delle specie batteriche che già colonizzano le superfici disponibili e la composizione del fluido crevicolare che nutre i microorganismi.
- **Fattori meccanici:** tutti quei fattori che influiscono sul livello di osso e quindi sulla stabilità biomeccanica del dente (es. trauma oclusale - sovraffollamento).
- **Anomalie e patologie dentarie:** ectopie, anomalie radicolari, riassorbimenti esterni della radice.

2.3 Processo di Colonizzazione Batterica

I denti rappresentano un ambiente particolare ed al tempo stesso unico in grado di facilitare notevolmente la colonizzazione^{19 20 21} da parte dei microrganismi. La superficie del dente infatti, è una superficie non soggetta a desquamazione e consente quindi lo sviluppo di biofilm (pellicole) molto complessi la cui composizione è influenzata dall'anatomia e dalla struttura tissutale della superficie stessa del dente, dagli organismi che abitano il biofilm e dalla composizione del fluido crevicolare. La fase iniziale di formazione del biofilm (pellicola) è senza dubbio mediata e modulata da alcune proteine, che variano a seconda del patrimonio genetico individuale, e che sono in grado di favorire la colonizzazione di alcuni microrganismi e di trattenere la specie pioniera. Quest'ultima è la frazione batterica (spesso costituita da *F. Nucleatum*) che pone le basi per la colonizzazione da parte degli altri batteri, fornendo punti di attacco per la co-aggregazione delle altre specie.^{22 23} Il processo di formazione e strutturazione del biofilm altera la composizione chimico-fisica dell'ambiente orale, e fornisce elementi nutritivi e sostanze che, avendo la capacità di degradare le macromolecole complesse, aumentano la concentrazione dei fattori nutrienti, che in ultimo creano l'ambiente necessario allo sviluppo e alla crescita di altri batteri. In questa cascata di eventi diviene di fondamentale importanza la natura delle prime specie colonizzatrici che si sviluppano nel biofilm, a questa è infatti strettamente correlata la natura delle altre specie batteriche che successivamente verranno a coesistere con la specie pioniera all'interno del biofilm. La composizione di questo habitat è

anche influenzata dalle caratteristiche e dalla composizione della saliva e dalla situazione infiammatoria dei tessuti gengivali. Un maggior volume di liquido gengivale, contenente un maggior numero di prodotti di degradazione, può stimolare la crescita batterica favorendo lo sviluppo di particolari specie, come *Porphyromonas Gingivalis* e *Treponema Denticola* che, per il loro accrescimento, richiedono prodotti di degradazione come proteine o peptidi.

La comparsa, dunque, di batteri anaerobici patogeni³² al di sotto del solco gengivale è da considerarsi la prima causa dell'insorgenza della malattia parodontale, ma, la semplice presenza di batteri può non essere sufficiente a generare l'infezione. Il verificarsi del danno anatomico e funzionale a carico del parodonto, causato dalla presenza dei batteri, è infatti strettamente correlato, come emerge da dati di letteratura, anche al tipo e alle alterazioni della risposta immunitaria individuale che l'ospite è in grado di attuare. Ci sono fattori genetici individuali che predispongono, a parità di condizioni microbiologiche dell'ecosistema, allo sviluppo ed alla progressione della malattia parodontale (Kinane D.F. et al. 2005; Yen-Chum G. et AL. 2010; Teles R. et al. 2010). Questa interazione tra fattori microbiologici e genetici è stata recentemente definita infetto-genomica.^{41 42 43 44 45 46 47}

L'interazione fra tutti questi fattori genera la malattia e ne determina il grado di espressività clinica.

2.4 Aspetti Sintomatologici in Ambito Parodontale

La prima manifestazione clinica¹⁷ della Parodontite, osservabile direttamente dal paziente, è in genere il sanguinamento gengivale spontaneo o allo spazzolamento. La perdita volumetrica delle papille, la recessione gengivale, un cambiamento, anche se lento e modesto, di posizione dei denti sono segni di Parodontite di media gravità.

Una maggiore velocità di spostamento dei denti, con mobilità percepita dal paziente come anomala, e l'apertura repentina di spazi interdentali (diastemi) fino allo sventagliamento degli elementi frontali, sono indice di riacutizzazione della malattia con passaggio ad una fase avanzata.

All'esame obiettivo del cavo orale si possono osservare lesioni (tasche) di varia profondità in più siti. Ci può essere sanguinamento al sondaggio, e talora essudazione sieropurulenta.

L'alitosi è un'altra fastidiosa conseguenza della Parodontite.

L'assenza di un'efficace terapia o la presenza di una patologia refrattaria (che rappresenta circa il 6% dei casi) porta inevitabilmente alla perdita degli elementi colpiti.

L'assenza di una corretta diagnosi in fase precoce della malattia parodontale produce quindi, oltre a danni anatomici e funzionali, anche importanti danni estetici spesso di difficile o impossibile risoluzione.

Un mancato trattamento della Parodontite in fase precoce aumenta esponenzialmente la necessità di eseguire terapie più invasive e costose, come quelle implantoprotesiche, e di conseguenza incrementa il costo biologico ed economico per il paziente.

2.5 Fattori Microbiologici nella Malattia Parodontale

La parodontite è un'infezione polimicrobica causata da batteri patogeni organizzati in biofilm che agiscono sinergicamente con strategie di colonizzazione del sistema che li accomunano in complessi, recentemente riclassificati secondo Socransky¹⁶ (Oral Microbiol. and Immunol., 2008).

La reazione infiammatoria secondaria all'accumulo del biofilm oltre i limiti tollerati dall'individuo, provoca la distruzione dei tessuti parodontali.

Nella diagnosi e nella prognosi della malattia parodontale^{24 26 27 28 29} si rende quindi necessaria l'identificazione, la quantificazione e la sottotipizzazione dei principali patogeni coinvolti nelle specifiche forme di parodontite. Infatti è stata dimostrata una stretta correlazione tra i parametri clinici di infiammazione gengivale^{30 31 32} e il profilo microbiologico.

Complesso rosso

- *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*
- *Tannerella forsythensis*
- *Porphyromonas gingivalis*
- *Treponema denticola*

La presenza di questi batteri è prevalentemente associata alla parodontite avanzata (tasche profonde almeno 6 mm) ed alla perimplantite.

Clinicamente questi batteri sono correlati con la profondità di tasca e con il sanguinamento al sondaggio. Una loro maggiore concentrazione è associata ad un aumento progressivo della profondità della tasca, con un'azione sinergica dei tre batteri principali.^{33 34 35 36 37 38 39 40}

Complesso arancione

- *Fusobacterium nucleatum* ssp
- *Prevotella intermedia*

La presenza di questi batteri è prevalentemente associata alle forme iniziali o moderate di malattia parodontale, oppure nelle fasi di guarigione. Inoltre questi batteri sembrano precedere la colonizzazione del complesso rosso e la loro presenza contemporanea è frequente in tasche profonde.

2.6 Rilevanza Clinica del Test Microbiologico nella Malattia Parodontale

È uno strumento indispensabile per l'identificazione e la quantificazione dei principali patogeni nella fase diagnostica della malattia parodontale e della perimplantite.^{48 49 50 51 52 53 54 55 56 57}

È uno strumento di misurazione del fattore “presenza di batteri parodontopatogeni” al fine di redigere un profilo di rischio accurato.

È uno strumento di controllo oggettivo dell'intervento terapeutico e del protocollo di mantenimento.

È uno strumento utile al miglioramento della compliance del paziente che, adeguatamente informato riguardo al suo personale profilo microbiologico, aderirà in maniera più consapevole al piano terapeutico.

È uno strumento diagnostico accurato nell'analisi di pazienti e/o siti recidivanti alla terapia.

È uno strumento all'avanguardia utilizzabile nella ricerca clinica.

Il test microbiologico è uno strumento all'avanguardia indispensabile per l'identificazione e la quantificazione e la sottotipizzazione dei principali batteri patogeni responsabili dell'insorgenza della malattia parodontale e della perimplantite.

Il test che offre una valutazione In fase diagnostica accurata della microflora sub gengivale, con un'approfondita valutazione dei pattern di colonizzazione batterica nelle diverse situazioni patologiche.

La presenza/assenza dei diversi complessi di batteri con le loro proporzioni reciproche, e la presenza di sottotipi ad alta patogenicità chiarisce il livello di aggressività della parodontite. Queste informazioni sono fondamentali per:

1. Stabilire sequenza terapeutica
2. Stabilire intervalli nel follow-up
3. Pianificare il mantenimento o l'avulsione di elementi dubbi
4. Facilitare l'adesione da parte del paziente al piano di trattamento
5. Migliorare la compliance del paziente per l'igiene orale domiciliare e professionale

6. Certificare l'avvenuta guarigione o una eventuale necessità di supplemento terapeutico mediante analisi post-op
7. Monitorare la stabilità dei risultati ottenuti mediante analisi di controllo da eseguita periodicamente.

2.7 Modalità di Esecuzione del Test Parodontale

Il test parodontale si esegue con semplici tecniche di prelievo dai siti prescelti. La raccolta dei campioni è rapida per l'operatore e totalmente indolore per il paziente. La raccolta dei campioni microbiologici si realizza collocando mediamente nelle cinque tasche più profonde della bocca le punte di carta sterili. Tali punte devono essere inserite nelle tasche parodontali più significative, generalmente le più profonde di ogni quadrante, per un tempo minimo di un minuto. E' necessario scegliere le tasche in base alla profondità di sondaggio ricordandosi di segnalare il CAL (Clinical Attachment Level) registrando le recessioni e la presenza di sanguinamento e/o suppurazione. E' consigliato effettuare il prelievo da una tasca per quadrante più una quinta significativa. Al fine di scegliere correttamente i siti per il prelievo, è consigliabile eseguire preliminarmente un sondaggio parodontale completo e/o un'analisi radiografica quale lo status radiologico endorale e/o la OPT.

Dopo aver scelto il sito di prelievo, eliminare, qualora fosse presente, la placca sopragengivale con uno scaler. Porre quindi un rullo di cotone a protezione della zona, asciugare con getto d'aria ed inserire con un movimento deciso la punta di carta nella profondità della tasca con l'aiuto di una pinzetta. Qualora non entri correttamente, è possibile utilizzare una sonda per far penetrare il cono di carta all'interno della tasca stessa. È raccomandabile mantenere l'area di prelievo il più possibile asciutta anche dopo aver inserito il cono. Ogni singolo cono di carta una volta estratto dalla tasca deve essere riposto nell'apposita provetta sterile. Nel caso di analisi microbiologica mix,

una volta effettuato il prelievo, tutte le punte vanno riposte in un'unica provetta; nel caso di analisi microbiologica sito-specifica ogni cono deve essere riposto in una delle quattro provette colorate che individuano ciascuna un sito di prelievo specifico che deve essere riportato con attenzione su ciascuna provetta. La compilazione dei moduli in ogni loro parte consente al laboratorio di redigere un referto completo e dettagliato. Per questo è necessario specificare numero del dente, sito di prelievo, PPD, REC, BOP e PUS se fumatore, malattie concomitanti e stato di gravidanza oltre a sesso e data di nascita del paziente. Nel caso in cui si effettuino esami microbiologici di controllo è essenziale prelevare la placca batterica all'interno delle tasche parodontali già precedentemente analizzate: sarebbero altrimenti impossibili valutazioni comparative tra prima e dopo. Pertanto, qualora vi fossero dubbi sulla mantenibilità di uno o più elementi usati come siti di prelievo, sarebbe meglio includere da subito un maggior numero di siti nell'analisi.

2.8 Pcr-Real Time

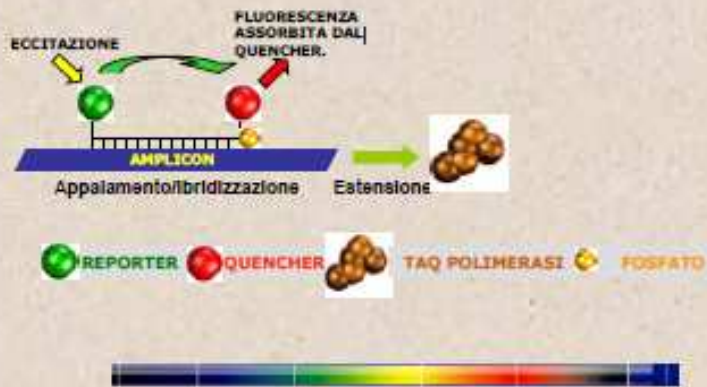
La PCR in tempo reale permette una quantificazione precisa e affidabile dei batteri del campione sub-gengivale. Il metodo è altamente specifico e sensibile. Il DNA (informazione genetica) isolato e purificato rappresenta il punto di partenza per i passi successivi. La PCR convenzionale (polymerase chain reaction) è un metodo biologico molecolare per l'individuazione di minime quantità di DNA. Un enzima (Taq polimerasi) duplica i frammenti genetici

specie-specifici (sequenze target). Per ogni sequenza target vengono usati dei primer specifici (corti frammenti di DNA) come punto di partenza per la Taq polimerasi. Numerose copie delle sequenze target vengono sintetizzate in modo esponenziale. Il risultato della reazione può quindi essere visualizzato mediante ulteriori misurazioni di laboratorio, come l'elettroforesi su gel. Tuttavia la PCR convenzionale con determinazione del punto finale fornisce solo informazioni molto limitate relative al numero di batteri presenti nel campione. Non è possibile una conta batterica affidabile. Al contrario la PCR real time permette una quantificazione precisa delle sequenze target. L'osservazione diretta del processo di amplificazione permette di determinare il numero preciso dei batteri nel campione esaminato.

Oltre ai primer specifici, la PCR in tempo reale usa un ulteriore frammento di DNA specie-specifico, la sonda TaqMan, che si lega alla sequenza target. Questa ulteriore sonda garantisce l'elevata specificità del metodo. Durante la duplicazione della sequenza target, la sonda TaqMan viene separata dalla sequenza target per distruzione dall'attività di esonucleasi della Taqpolimerasi. Nel corso di questa disgregazione della sonda, viene emesso un segnale fluorescente che viene misurato online e registrato immediatamente mediante un sistema laser di rilevazione automatica nella piastra di reazione. L'intensità del segnale fluorescente dà quindi la misura della quantità di prodotto formato ed è direttamente proporzionale alla quantità iniziale di patogeni parodontali nel campione del paziente. Contrariamente alle procedure PCR convenzionali, la PCR in tempo reale rende superflui ulteriori fasi di lavoro in laboratorio.

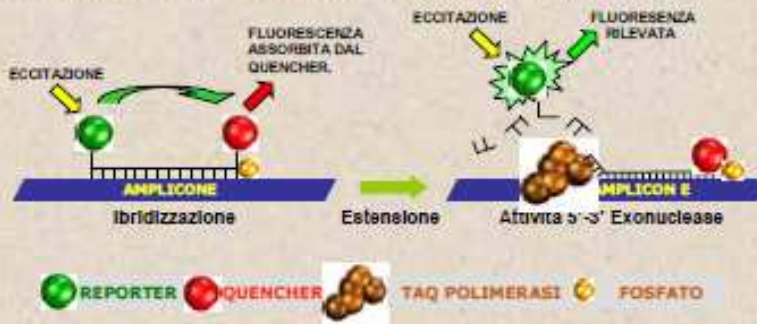
Real-Time PCR: SISTEMA TAQMAN

La vicinanza del quencher al reporter impedisce l'emissione di fluorescenza.
L'attività 5'-3' esonucleasica del TAQ polimerasi libera il reporter.



Real-Time PCR: SISTEMA TAQMAN

La vicinanza del quencher al reporter impedisce l'emissione di fluorescenza.
L'attività 5'-3' esonucleasica del TAQ polimerasi libera il reporter.



Le sonde TAQMAN vengono distrutte durante la PCR

3. TECNOLOGIA ALL'ARGENTO

Dall'esame della letteratura^{1 2 3} emerge l'importanza di una buona igiene orale e di una buona collaborazione da parte del paziente. Nonostante numerosi dispositivi siano stati commercializzati al fine di combattere le situazioni di igiene orale inadeguata, l'ortodontista si trova ancora nella necessità di affidarsi alla collaborazione del paziente al fine di mettere a disposizione in maniera efficace i prodotti e seguire le indicazioni igieniche.

Uno dei prodotti studiati per superare i limiti della collaborazione da parte del paziente sono le legature OrthoShield Safe-T-Tie della Ortho Organizers. La tecnologia Ortho-Shield si basa sulle caratteristiche antimicrobiche presenti in natura nell'argento.

Tali effetti sono stati scoperti per la prima volta negli anni '60. Le caratteristiche battericide e fungicide altamente efficaci dell'argento, abbinate alla scarsa allergenicità dello stesso, ne hanno fatto un buon agente antimicrobico. L'argento, così come altri metalli nobili, sono da tempo riconosciuti come potenziali alleati nella lotta contro gli organismi dannosi, in particolare nei confronti dei batteri resistenti agli antibiotici presenti nelle ferite.⁷⁶

Il nitrato d'argento e la sulfadiazina d'argento sono stati utilizzati localmente o sotto forma di medicinali al fine di prevenire o ridurre l'insorgenza di infezioni nelle ferite da ustione.

La resistenza batterica ai metalli pesanti quali l'argento o il mercurio, seppur possibile, rimane estremamente rara. La maggior parte degli isolati clinici resistenti all'argento documentati si riferisce a ferite da ustione, in cui la sulfadiazina d'argento o il

nitrato d'argento sono stati applicati sotto forma di crema per uso locale.⁷⁷ La tecnologia OrthoShield è incorporata in una ceramica porosa che controlla il rilascio d'argento verso la superficie dell'anello elastomerico, fornendo ulteriori misure di sicurezza contro la resistenza e nel contempo una durevole soluzione antimicrobica (Figura 1).

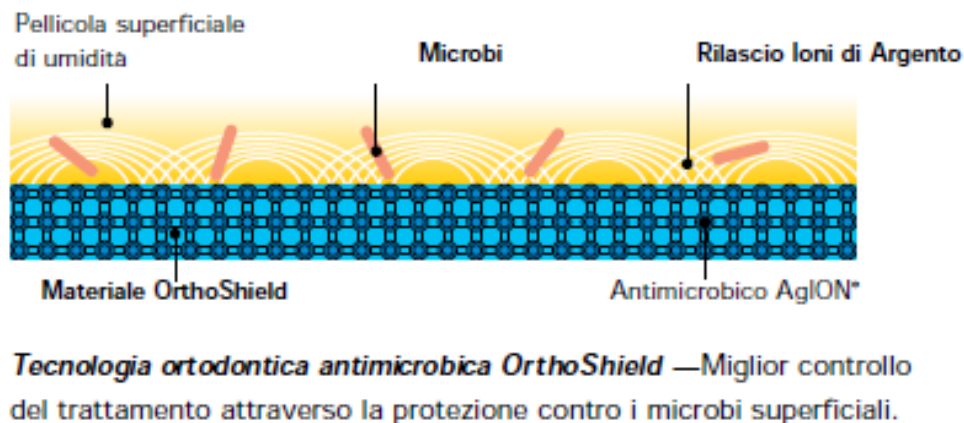


Figura 1. Meccanismo di rilascio d'argento

3.1 Efficacia Antimicrobica in Vitro

La caratteristica antimicrobica dell'argento si basa sulla sua capacità a destabilizzare la parete delle cellule batteriche, interrompere il metabolismo cellulare ed inibire la produzione delle stesse. Con l'uso di tali tecniche, la tecnologia OrthoShield è in grado di ridurre il numero di alcuni organismi del 99.9% nell'arco di appena alcune ore (Figura 2).

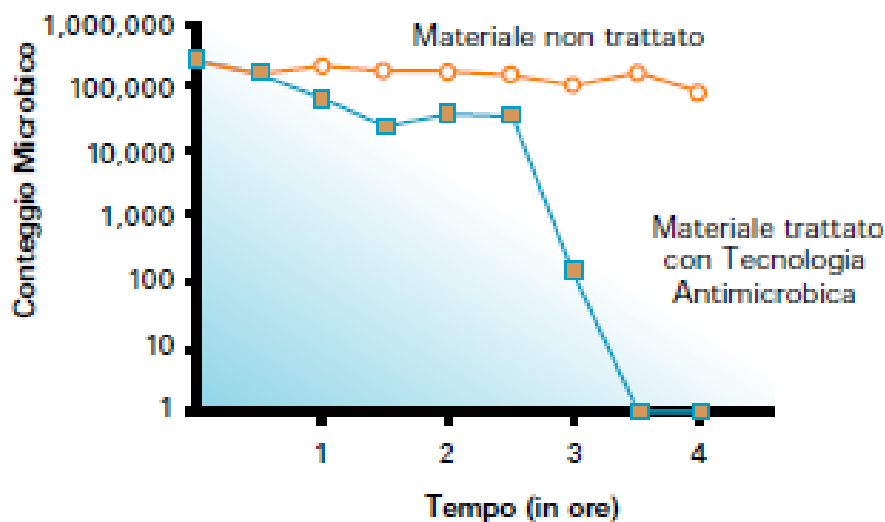


Figura 2. Riduzione rapida dei microbi superficiali

Le legature forniscono una protezione continua per tutto il tempo cui il materiale rimane a contatto con i microbi ed è efficace per 30 giorni.

Tenendo in conto il rischio per la salute associato all'igiene orale così come la tendenza dei pazienti ad andare incontro ad un aumento della placca e degli agenti patogeni periodontali subito dopo l'inizio di un trattamento ortodontico, per gli ortodontisti è di vitale importanza tenere in considerazione un metodo efficace e rapido per il controllo dell'igiene orale. Ciò facendo, l'ortodontista sarà in grado di aiutare i pazienti a mantenere non solo una buona salute orale ma anche ad affrontare un trattamento ortodontico di minor durata.

Ciò di cui gli ortodontisti nella loro pratica hanno maggior bisogno sono strumenti in grado di eliminare il fattore "collaborazione del paziente" dai risultati del trattamento.

4. SCOPO DELLO STUDIO

Valutare le conseguenze parodontali degli apparecchi ortodontici fissi misurando gli indici parodontali di placca (PI di Silness e Loe 1964) e di sanguinamento (GI di Loe e Silness 1963) con due metodi di legature, il primo che utilizza legature elastomeriche, il secondo che utilizza legature elastomeriche a rilascio d'argento (orthoshield safe-tie) in pazienti adolescenti, in modo da poter delineare le conseguenze biologiche sulla salute parodontale di entrambi i tipi legature.

5. MATERIALI E METODI

Nell'ambito del nostro studio vengono selezionati 50 pazienti ortodontici di sesso femminile e maschile dagli 11 ai 20 anni tra i pazienti di un Ambulatorio Ortodontico Ospedaliero.

Sono stati inclusi tutti i pazienti in dentizione permanente, liberi da placca e motivati per una buona igiene orale. Tutti i pazienti devono essere in cura con apparecchio ortodontico fisso su entrambe le arcate. Sono stati esclusi i pazienti con patologie sistemiche o in trattamento antibiotico.

A tutti i 50 pazienti vengono date informazioni sulle corrette tecniche di igiene orali .

Gli Indici Parodontali vengono misurati a circa 6 mesi dal bandaggio (T0), quindi sostituzione delle legature elastomeriche standard in tutti i 50 pazienti ed applicazione delle legature elastomeriche a rilascio d'argento e nuova misurazione degli Indici Parodontali dopo 1 mese (T1).

Gli Indici Parodontali sono stati misurati sui denti bandati sia del mascellare superiore sia della mandibola prendendo in considerazione solo gli incisivi laterali e i canini destri e sinistri, quindi facendo due valutazioni per ogni quadrante.

I dati raccolti sono stati inseriti su delle tabelle di Excel, dove ogni paziente è indicato con le prime tre lettere del cognome e del nome e l'anno di nascita, sulla verticale sono indicati i denti dove si esegue la misurazione e sull'orizzontale sono indicati i valori degli indici di placca (PI), e i valori degli indici gengivali (GI) (Tabella 1).

paziente:		cognome	nome	anno					
		tod	ste	1996					
T0		P1				G1			
		0	1	2	3	0	1	2	3
12		1				1			
13		1				1			
22		1				1			
23		1				1			
32				1				1	
33				1				1	
42				1				1	
43				1				1	
occorrenze:		4	0	4	0	4	0	4	0
T1		P1				G1			
		0	1	2	3	0	1	2	3
12									
13									
22									
23									
32									
33									
42									
43									
occorrenze:		0	0	0	0	0	0	0	0

Tabella 1. Esempio di Tabella per la raccolta dati.

Inoltre a T0 viene eseguito un esame microbiologico parodontale (PCR-real time) di tipo mix, esame ripetuto sugli stessi pazienti al T1, per identificare, quantificare e sotto tipizzare i principali patogeni presenti nei pazienti ortodontici trattati con legature elastomeriche standard e valutare eventuali variazioni microbiologiche con l'utilizzo delle legature a rilascio d'argento.

Per la misurazione viene utilizzato l'indice di placca PLI (Silness e Loe 1964) che valuta la quantità di placca nel seguente modo:

0. assenza di placca
1. placca regione cervicale evidenziabile con la sonda o con la soluzione rivelatrice
2. placca in regione cervicale visibile ad occhio nudo
3. placca in regione cervicale in quantità abbondante.

L'indice di sanguinamento utilizzato è GI (Loe e Silness 1963) che valuta l'infiammazione gengivale:

0. gengiva normale
1. infiammazione lieve, lieve variazione di colore ed edema, assenza di sanguinamento al sondaggio
2. infiammazione moderata, arrossamento, edema, sanguinamento al sondaggio
3. infiammazione grave, arrossamento ed edema marcati, sanguinamento spontaneo.

Il prelievo dei campioni per il test microbiologico della placca(PCRreal-time) viene eseguito nel solco gengivale mesiale al canino, in ogni quadrante e in un sito di controllo nel solco gengivale del laterale del quarto quadrante, usando delle punte di carta sterile. L'esame è semplice ed indolore per il paziente: dopo aver inserito un apribocca, si elimina manualmente la placca sopragengivale, si asciuga con getto d'aria la sede del prelievo, quindi si inseriscono le punte di carta sterile nei siti prescelti con l'aiuto di una pinzetta. Le punte vengono lasciate in situ per circa un minuto, poi rimosse e inserite in un contenitore sterile per l'invio in laboratorio. L'esame di tipo mix prevede il prelievo in cinque siti, uno per quadrante, più un sito di controllo (Figura 3).



Figura 3. Prelievi per il test microbiologico.

6. RISULTATI

Per quanto riguarda l'indice di placca, su 400 denti analizzati al TO, 82(20,5%) presentavano indice di placca 0, 128(32%) presentavano indice di placca 1, 128(32%) presentavano indice di placca 2, 62(15,5%) presentavano indice di placca 3. (Figura4),(Tabella2).

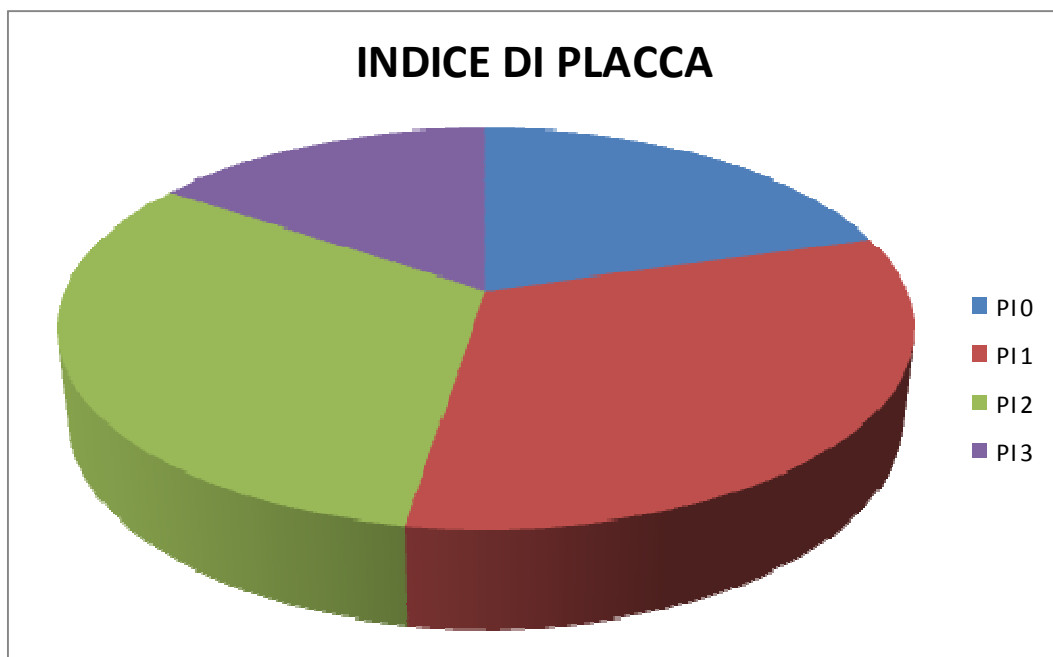


Figura 4. Indici di placca(PI) al TO

Circa la valutazione dell'indice di sanguinamento (GI), tra tutti i denti analizzati nel T0 128 (32%) presentavano indice 0, 142(35,5%) indice 1, 107(26,75%) indice 2 e 23(5,75%) presentavano indice 3. (Figura5),(Tabella2)

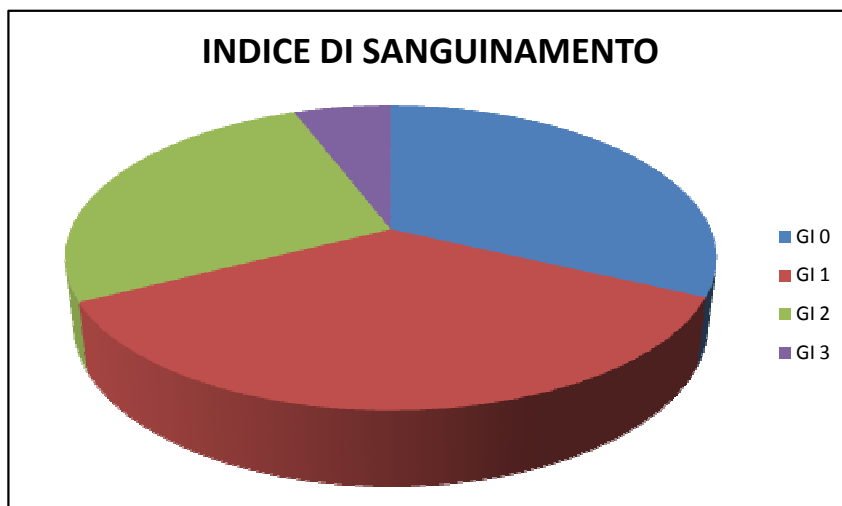


Figura 5. Indice di sanguinamento (GI) al T0

TOTALI								
T0	PI				GI			
	0	1	2	3	0	1	2	3
	82	128	128	62	128	142	107	23

Tabella 2. Dati totali di placca e di sanguinamento al T0

Circa la valutazione degli indici di placca al T1, 114(28,5%) denti presentavano indice di placca 0, 194(48,5%) presentavano indice di placca 1, 80(20%) presentavano indice di placca 2 e 12 (3%) un indice di placca 3(Figura6),(Tabella2)

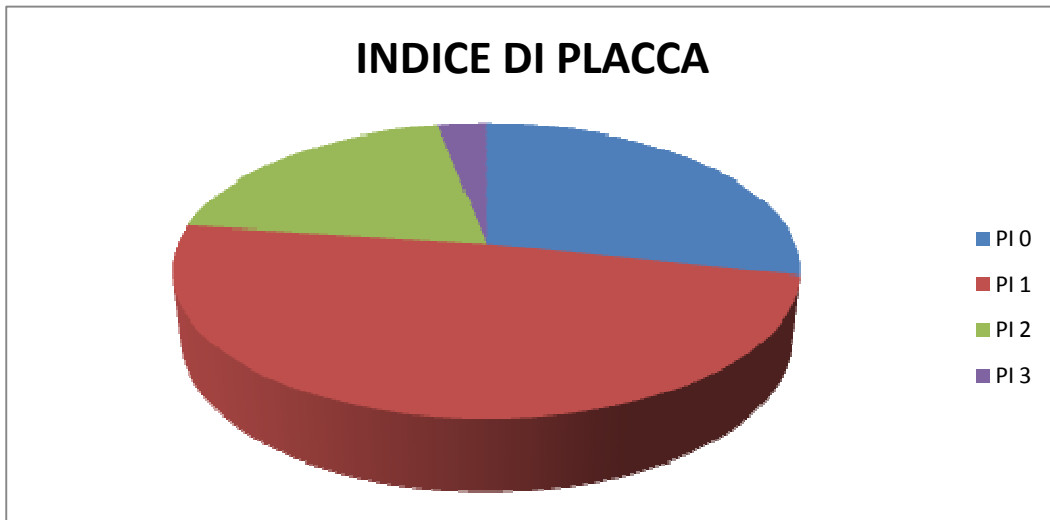


Figura 6. Indici di placca PI al T1

Per la valutazione dell'indice di sanguinamento (GI) sempre al T1, 230(57,5%) denti presentavano un indice 0, 137(34,25%) presentavano un indice 1, 33(8.25%) presentavano un indice 2.(Figura 7),(Tabella3)

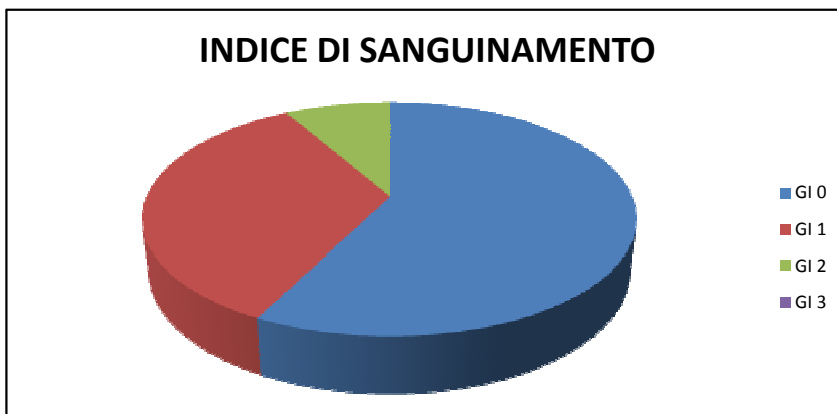


Figura 7. Indici di sanguinamento al T1

T1	PI					GI			
	0	1	2	3		0	1	2	3
	114	194	80	12		230	137	33	0

Tabella 3 . Dati totali di indice di placca e di sanguinamento al T1

Fondamentale è stata l'analisi del test microbiologico (PCR-realtime) sia con le legature elastomeriche tradizionali (T0), sia dopo la sostituzione delle stesse con legature a rilascio d'argento (T1).

In entrambe le situazioni si sono riscontrati la presenza di batteri parodontopatici: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*.

La percentuale di batteri patogeni nell'ambito della carica batterica totale al T0 va mediamente dal 3,8% al 8,6%.

Contrariamente al T1 la percentuale di batteri patogeni nell'ambito della carica batterica totale va mediamente dal 1,9% al 4,3%. (Figura 8).

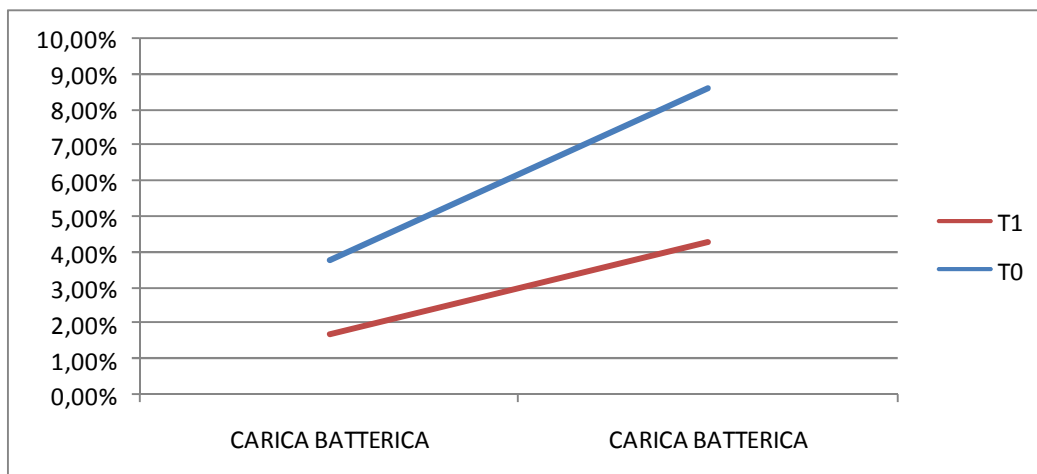


Figura 8. Confronto tra percentuale carica batteri al T0 e al T1.

Dal confronto del grafico in Figura 9, emerge chiaramente un'aumento di circa 10% degli elementi con indice di placca 0, un aumento di circa il 20% degli elementi con indice di placca 1, una riduzione di oltre il 10% degli elementi con indice di placca 2, e una riduzione di circa il 12% degli elementi con indice di placca 3 tra il T0 e il T1, dati che evidenziano chiaramente che le legature a rilascio d'argento riducono la placca rispetto alle legature elastomeriche tradizionali. (Figura 9).

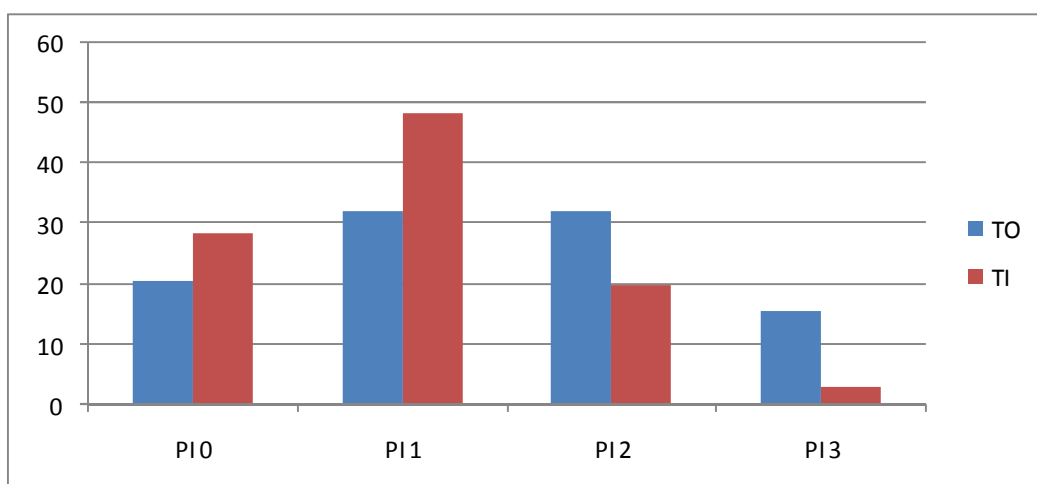


Figura 9. Confronto percentuali Indici di Placca al T0 e al T1.

Dal confronto del grafico in Figura 10, emerge un'importante aumento del 25% degli elementi con indice di sanguinamento 0, una riduzione di circa 18% degli elementi con indice di sanguinamento 2 ed una assenza di elementi con indice di sanguinamento 3, dati che dimostrano che le legature a rilascio d'argento riducono l'infiammazione gengivale .(Figura10). Questi ultimi dati sono perfettamente in accordo con i risultati degli esami microbiologici (PCR), dove abbiamo riscontrato una riduzione di circa il 50% dei batteri patogeni fra il T0 e il T1 cioè fra gli esami eseguiti con le legature elastomeriche e le legature a rilascio d'argento. (Figura 8).

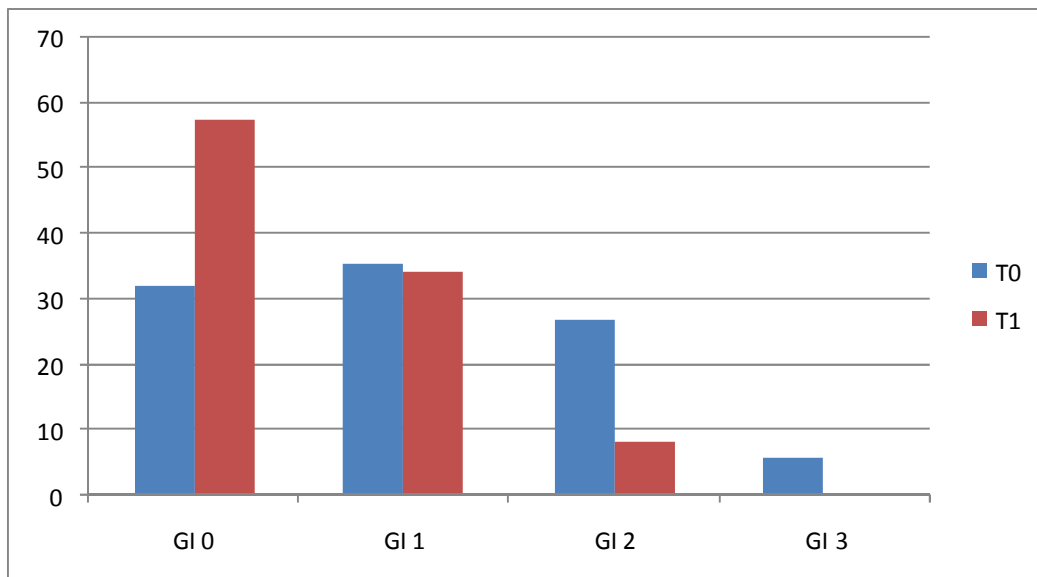


Figura 10. Confronto percentuali Indici di Sanguinamento al T0 e al T1.

7. CASI CLINICI

7.1 Caso Clinico A



Paziente A al T0

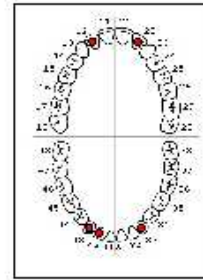
In questo caso trattasi di un paziente di anni 14, di sesso femminile, in buona salute, in terapia ortodontica su entrambe le arcate da circa 6 mesi. All'inizio della cura sono state date le corrette indicazioni d'igiene orale e ad ogni controllo successivo la paziente è stata rimotivata. Nell'ambito dello studio si è presentata alla mia osservazione presentando placca abbondante su tutti i denti di entrambe le arcate, gengive ipertrofiche, ma assenza di sanguinamento anche al sondaggio come si può meglio valutare dagli indici di placca e sanguinamento raccolti. (Figura 11).

Come indicato dal protocollo di ricerca, in questa fase (T0) ho raccolto gli indici PI e GI ed eseguito il prelievo per il test microbiologico(PCR), quindi ho sostituito le legature standard con le legature a rilascio d'argento e predisposto il controllo dopo un mese senza dare ulteriori indicazioni di igiene orale e senza spiegare le caratteristiche chimiche delle legature(T1).

Paziente:		cognome	nome	anno					
		sal	chi	1996					
T0	PI				GI				
		0	1	2	3	0	1	2	3
	12			1			1		
	13			1			1		
	22			1				1	
	23			1				1	
	32			1				1	
	33			1				1	
	42			1				1	
	43			1				1	
occorrenze:	0	0	8	0	0	2	6	0	

Figura 11.Indici PI e GI al T0.

I risultati della PCR, indicano la presenza nell'ambito della carica batterica totale del 3,8% di batteri patogeni, tra i quali la presenza di Tannerella Forsythenys, Fusobacterum Nucleatum, e Campylobacter Rectus.(Figura12).



paziente SAL CHI
 data di nascita 25/07/1998
 sesso F
 data prelievo 13/05/2010
 richiedente GERARDI EMANUELA

numero del campione B-0605
 data 19/05/2010

DENTE	SITO	PROFONDITA' DELLA TASCA	BOF	PUS	
12	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
22	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
43	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
33	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
42	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca

NOME BATTERIO	CONTA BATTERICA	x	% RELATIVA
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Tannerella forsythensis</i>	4,11 · 10 ²	++	0,2222 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Treponema denticola</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Peptostreptococcus micros</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Prevotella intermedia</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusobacterium nucleatum ssp</i>	3,14 · 10 ³	++	1,6973 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Campylobacter rectus</i>	3,27 · 10 ³	+++	1,7676 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Elkenella corrodens</i>	3,58 · 10 ²	++	0,1935 %
<input type="checkbox"/> Carica batterica totale	1,85 · 10 ³		100,0000 %

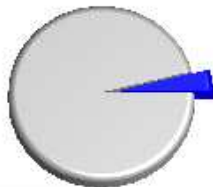
Genotipo *Actinobacillus actinomycetemcomitans*:
 Genotipo JP2 maggiore patogenicità rispetto al genotipo 552

Genotipo *Porphyromonas gingivalis* FimA:
 FimA Tipo I: Scarsa patogenicità - FimA Tipo II-IV: Alta patogenicità.

*** LEGENDA**
 + batterio individuato
 ++ batterio presente in quantità elevata
 +++ batterio presente in quantità molto elevata
 Carica batterica elevata richiede eventuale terapia

- Grafico 1

Carica batterica totale



■ 1,85 · 10³ (100%)
 ■ 4,11 · 10² (22,22%)
 ■ 3,14 · 10³ (169,73%)
 ■ 3,27 · 10³ (176,76%)
 ■ 3,58 · 10² (19,35%)

NOTE:

- Grafico 2

Percentuali relative alla carica dei patogeni
 (escluso il totale grafico 1)

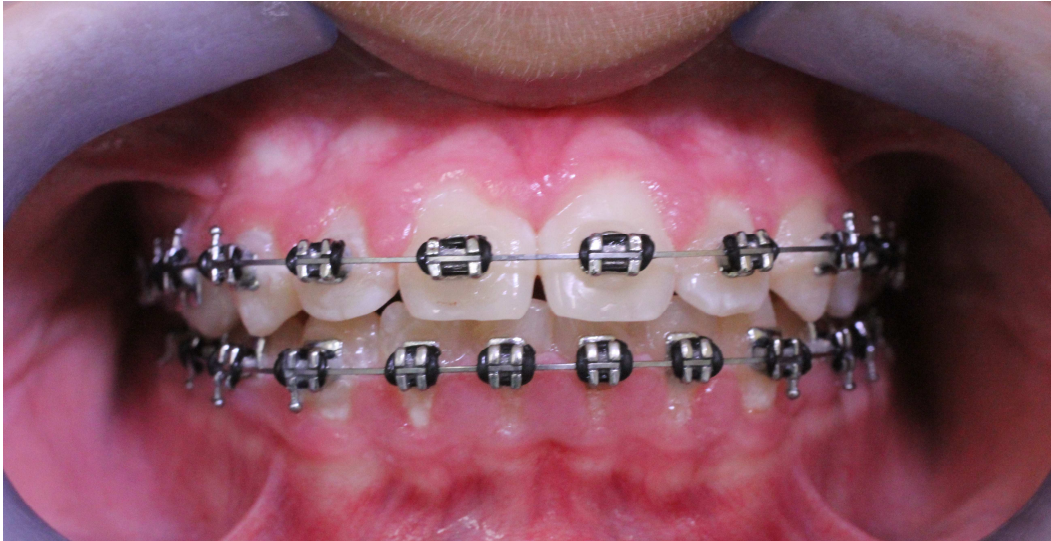


■ 3,14 · 10³ (72,8%)
 ■ 3,27 · 10³ (76,4%)
 ■ 3,58 · 10² (82,1%)

Direttore Sanitario
 Dott.ssa Elena Fanti



Figura 12. PCR al T0



Paziente A al T1

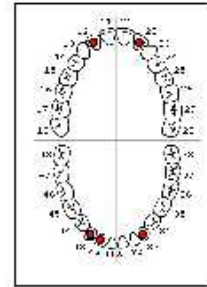
Dopo un mese (T1), la paziente si ripresenta clinicamente con una lieve diminuzione della placca e con riduzione del livello di infiammazione gengivale come confermano i dati raccolti.(Figura 13).

T1	PI					GI			
	0	1	2	3		0	1	2	3
12		1				1			
13		1				1			
22		1				1			
23		1				1			
32		1					1		
33		1					1		
42		1					1		
43		1					1		
occorrenze:	0	8	0	0		4	4	0	0

Figura 13. PI e GI al T1

I risultati della PCR eseguita in questa fase confermano i risultati clinici, in quanto abbiamo nell'ambito della carica batterica totale una

percentuale dell'1,9% di batteri patogeni, costituiti quasi completamente da batteri del complesso arancione cioè meno aggressivi dal punto di vista parodontosico. (*Fusocacterum Nucleatum* e *Campylobacter rectus*) e da una percentuale trascurabile di *Peptostreptococcus micros*.(Figura 14).



paziente SAL CHI
 data di nascita 25/07/1996
 sesso F
 data prelievo 21/06/2010
 richiedente GERARDI EMANUELA

numero del campione B-0802
 data 29/06/2010

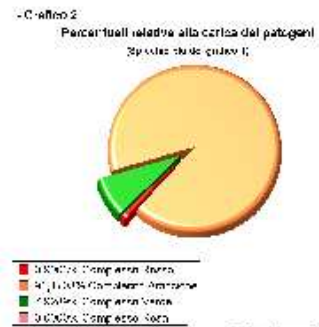
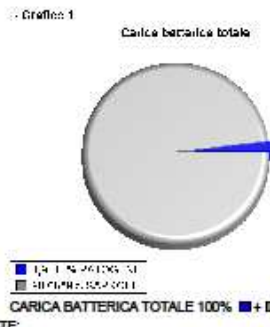
DENTE	BITO	PROFONDITA' DELLA TASCA	BIOP	PUS	
12	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
22	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
43	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
42	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
33	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca

NOME BATTERIO	CONTA BATTERICA	x	% RELATIVA
<input type="checkbox"/> Aggregatibacter actinomycetemcomitans	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> Porphyromonas gingivalis	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> Tannerella forsythensis	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> Treponema denticola	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> Peptostreptococcus micros	3,94 · 10 ²	+	0,0172 %
<input type="checkbox"/> Prevotella intermedia	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> Fusobacterium nucleatum ssp	1,73 · 10 ⁴	++	0,7555 %
<input checked="" type="checkbox"/> Campylobacter rectus	2,26 · 10 ⁴	+++	0,9869 %
<input checked="" type="checkbox"/> Eikenella corrodens	3,47 · 10 ⁴	++	0,1515 %
<input type="checkbox"/> Carica batterica totale	2,29 · 10 ⁴		100,0000 %

Genotipo Actinobacillus actinomycetemcomitans:
 Genotipo JP2 maggiore patogenicità rispetto al genotipo 552

Genotipo Porphyromonas gingivalis FimA:
 FimA Tipo I: Scarsa patogenicità. - FimA Tipo II-IV: Alta patogenicità.

*** LEGENDA**
 + batterio individuato
 ++ batterio presente in quantità elevata
 +++ batterio presente in quantità molto elevata
 Carica batterica elevata richiede eventuale terapia



NOTE:

Direttore Sanitario
 Dott.ssa Elena Fantì

Figura 14. PCR al T1

7.2 Caso Clinico B



Paziente B al T0

In questo caso trattasi di un paziente di anni 11, di sesso femminile, in buona salute, in terapia ortodontica su entrambe le arcate da circa 6 mesi. All'inizio della cura sono state date le corrette indicazioni d'igiene orale e ad ogni controllo successivo la paziente è stata rimotivata. Nell'ambito dello studio si è presentata alla mia osservazione presentando placca abbondante su tutti i denti di entrambe le arcate, gengive ipertrofiche, presenza di sanguinamento al sondaggio su 13 e 12 come si può meglio valutare dagli indici di placca e sanguinamento raccolti. (Figura 15).

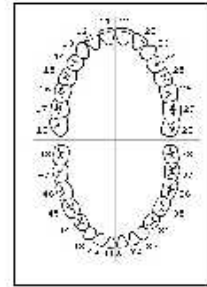
Come indicato dal protocollo di ricerca, in questa fase (T0) ho raccolto gli indici PI e GI ed eseguito il prelievo per il test microbiologico (PCR-real time), quindi ho sostituito le legature standard con le legature a rilascio d'argento e predisposto il controllo

dopo un mese senza dare ulteriori indicazioni di igiene orale e senza spiegare le caratteristiche chimiche delle legature(T1).

paziente:	cognome	nome	anno					
	tra	gia	1999					
T0	PI				GI			
	0	1	2	3	0	1	2	3
	12			1			1	
	13			1			1	
	22			1		1		
	23			1		1		
	32			1		1		
	33			1		1		
	42			1		1		
	43			1		1		
occorrenze:	0	0	0	8	0	6	2	0

Figura 15. PI e GI al T0

I risultati della PCR, indicano la presenza nell'ambito della carica batterica totale del 5,27% di batteri patogeni, tra i quali la presenza di *Tannerella Forsythenys*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella Intermedia*, *Fusobacterium Nucleatum*, e *Campylobacter Rectus*.(Figura16).



paziente TRA GIA
 data di nascita 18/04/1999
 sesso F
 data prelievo 08/07/2010
 richiedente GERARDI EMANUELA

numero del campione B-0901
 data 20/07/2010

DENTE	BITO	PROFONDITA' DELLA TASCA	BOP	PUS	
13	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
23	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
33	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
43	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
42	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca

NOME BATTERIO	CONTA BATTERICA		% RELATIVA
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Actinobacillus actinomycesomitans</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Tannerella forsythensis</i>	1,25 · 10 ³	+++	0,8278 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Treponema denticola</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Peptostreptococcus micros</i>	2,17 · 10 ²	++	0,1437 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Prevotella intermedia</i>	1,04 · 10 ³	+++	0,0069 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusobacterium nucleatum ssp</i>	3,7 · 10 ³	+++	2,4503 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Campylobacter rectus</i>	2,2 · 10 ³		1,4570 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Elkenella corrodens</i>	5,82 · 10 ²		0,3854 %
<input type="checkbox"/> Carica batterica totale	1,51 · 10 ⁷		100,0000 %

Genotipo *Actinobacillus actinomycesomitans*:
 Genotipo JP2 maggiormente patogeno rispetto al genotipo 652.

Genotipo *Porphyromonas gingivalis*:
 FimA Tipo I: Scarsa patogenicità. - FimA Tipo II-IV: Alta patogenicità.

*** LEGENDA**
 + batterio individuato
 ++ batterio presente in quantità elevata
 +++ batterio presente in quantità molto elevata
 Carica batterica elevata richiede eventuale terapia

Gráfico 1



CARICA BATTERICA TOTALE 100% ■+■

Gráfico 2



NOTE:

Direttore Sanitario
 Dott.ssa Elena Fantì

Biomolecular Diagnostic

Figura 16. PCR al T0



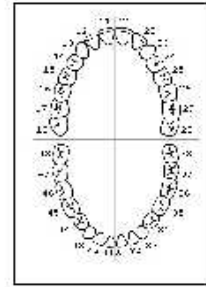
Paziente B al T1

Dopo un mese (T1), la paziente si ripresenta clinicamente con una diminuzione della placca su tutti i denti ad eccezione di 12 e 13 dove permane placca visibile ad occhio nudo e con assenza di infiammazione gengivale come confermano i dati raccolti.(Figura 17).

T1	PI				GI			
	0	1	2	3	0	1	2	3
12			1			1		
13			1			1		
22	1				1			
23	1				1			
32		1			1			
33		1			1			
42		1			1			
43		1			1			
occorrenze:	2	4	2	0	6	2	0	0

Figura 17 PI e GI al T1

I risultati della PCR eseguita in questa fase confermano i risultati clinici, in quanto abbiamo nell'ambito della carica batterica totale una percentuale di 2,51% di batteri patogeni, costituiti quasi completamente da batteri del complesso arancione cioè meno aggressivi dal punto di vista parodontosico (Prevotella intermedia, Fusocacterum Nucleatum e Campylobacter rectus) e da una percentuale trascurabile di Peptostreptococcus micros. (Figura 18).



paziente TRA GIA
 data di nascita 18/04/1999
 sesso F
 data prelievo 02/09/2010
 richiedente GERARDI EMANUELA

numero del campione B-1073
 data 09/09/2010

DENTE	BITO	PROFONDITA' DELLA TASCA	BOF	PUS
nd				

NOME BATTERIO	CONTA BATTERICA	x	% RELATIVA
Actinobacillus actinomycetemcomitans	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
Porphyromonas gingivalis	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
Tannerella forsythensis	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
Treponema denticola	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
Peptostreptococcus micros	3,09 · 10 ²		0,0339 %
Prevotella intermedia	4,45 · 10 ²	+	0,0049 %
Fusobacterium nucleatum ssp	7,17 · 10 ²	++	0,7862 %
Campylobacter rectus	1,19 · 10 ³		1,3048 %
Elkenella corrodens	3,52 · 10 ³		0,3860 %
Carica batterica totale	9,12 · 10 ³		100,0000 %

Genotipo Actinobacillus actinomycetemcomitans:
 Genotipo JP2 maggiormente patogeno rispetto al genotipo 652.

Genotipo Porphyromonas gingivalis:
 FimA Tipo I: Scarsa patogenicità. - FimA Tipo II-IV: Alta patogenicità.

LEGENDA
 + batterio individuato
 ++ batterio presente in quantità elevata
 +++ batterio presente in quantità molto elevata
 Carica batterica elevata richiede eventuale terapia

Gráfico 1



CARICA BATTERICA TOTALE 100% ■ + ■

Gráfico 2



■ FUSOBACTERIUM NUCLEATUM SPP
 ■ CAMPYLOBACTER RECTUS
 ■ ELKENELLA CORRODENS

NOTE:

[Empty box for notes]

www.biomoleculardiagnostic.com - info@biomoleculardiagnostic.com

Direttore Sanitario
 Dott.ssa Elena Fanti

**Biomolecular
Diagnostic**

Figura 18. PCR al T1

7.3 Caso Clinico C



Paziente C al T0

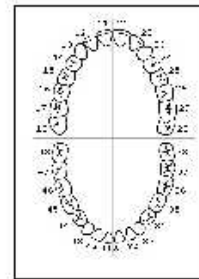
In questo caso trattasi di un paziente di anni 13, di sesso maschile, in buona salute, in terapia ortodontica su entrambe le arcate da circa 6 mesi. All'inizio della cura sono state date le corrette indicazioni d'igiene orale e ad ogni controllo successivo il paziente è stata rimotivato. Nell'ambito dello studio si è presentato alla mia osservazione presentando placca abbondante su tutti i denti di entrambe le arcate, gengive ipertrofiche, presenza di sanguinamento al sondaggio su 13,12,43, sanguinamento spontaneo su 22,33,32,42 come si può meglio valutare dagli indici di placca e sanguinamento raccolti. (Figura 19).

Come indicato dal protocollo di ricerca, in questa fase (T0) ho raccolto gli indici PI e GI ed eseguito il prelievo per il test microbiologico(PCR-real time), quindi ho sostituito le legature standard con le legature a rilascio d'argento e predisposto il controllo dopo un mese senza dare ulteriori indicazioni di igiene orale e senza spiegare le caratteristiche chimiche delle legature(T1).

paziente:	cognome	nome	anno								
	pel	ale	1997	T0							
				PI				GI			
				0	1	2	3	0	1	2	3
12						1				1	
13						1				1	
22						1					1
23						1					1
32						1					1
33						1					1
42						1					1
43						1				1	
occorrenze:				0	0	8	0	0	0	3	5

Figura 19. PI e GI al T0

I risultati della PCR, indicano la presenza nell'ambito della carica batterica totale di 8,64% di batteri patogeni, tra i quali la presenza di Actinobacillus Actinomycetemcomitans, Tannerella Forsythenys, Treponema Denticola, Peptostreptococcus micros, Fusobacterium Nucleatum, e Campylobacter Rectus.(Figura20).



paziente PEL ALE
 data di nascita 24/08/1997
 sesso M
 data prelievo 19/07/2010
 richiedente GERARDI EMANUELA

numero del campione B-0936
 data 23/07/2010

DENTE	SITO	PROFONDITA' DELLA TASCA	BOP	PUS	
13	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
23	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
43	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
42	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
33	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca

NOME BATTERIO	CONTA BATTERICA		% RELATIVA
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Actinobacillus actinomycesomitans</i>	4,96 · 10 ²		+ 0,0038 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Tannerella forsythensis</i>	7,33 · 10 ²		+ 0,0056 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Treponema denticola</i>	1,98 · 10 ³		+++ 1,5231 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Peptostreptococcus micros</i>	1,45 · 10 ²		0,1115 %
<input type="checkbox"/> <i>Prevotella intermedia</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Fusobacterium nucleatum ssp</i>	7,77 · 10 ²		+++ 5,9769 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Campylobacter rectus</i>	1,08 · 10 ²		0,8308 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Elkenella corrodens</i>	2,52 · 10 ²		0,1938 %
<input type="checkbox"/> Carica batterica totale	1,3 · 10 ²		100,0000 %

Genotipo *Actinobacillus actinomycesomitans*:
 Genotipo JP2 maggiormente patogeno rispetto al genotipo 652. **652**

Genotipo *Porphyromonas gingivalis*:
 FinA Tipo I: Scarsa patogenicità - FinA Tipo II-IV: Alta patogenicità.

*** LEGENDA**
 + batterio individuato
 ++ batterio presente in quantita' elevata
 +++ batterio presente in quantita' molto elevata
 Carica batterica elevata richiede eventuale terapia

• Grafico 1

Carica batterica totale



CARICA BATTERICA PATOGENI
 CARICA BATTERICA NON PATOGENI
 CARICA BATTERICA TOTALE 100% ■+■

• Grafico 2

Particellari relativi alla carica dei patogeni (Spettro delle cariche I)



Fusobacterium nucleatum ssp
 Treponema denticola
 Campylobacter rectus
 Tannerella forsythensis

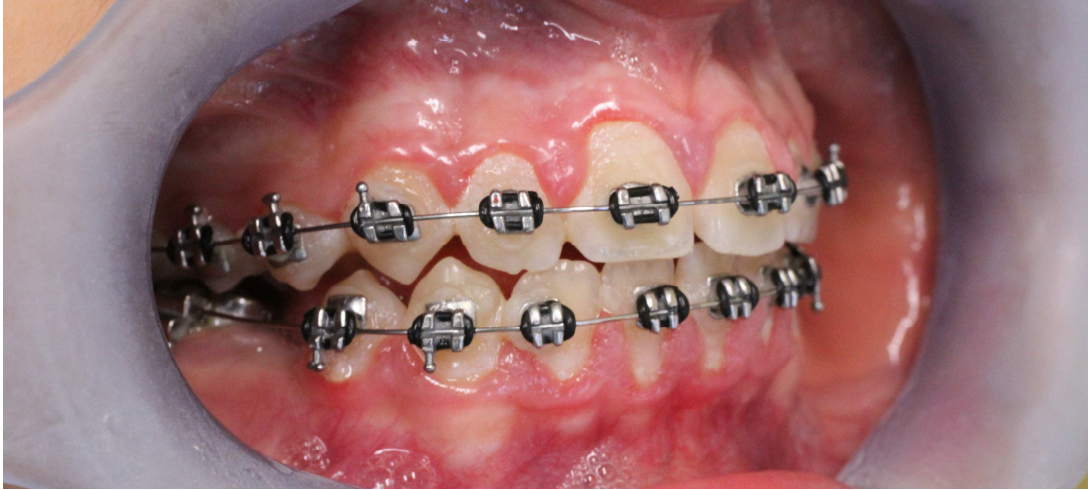
NOTE:

www.biomoleculardiagnostic.com - info@biomoleculardiagnostic.com

Direttore Sanitario
Dott.ssa Elena Fanti



Figura 20. PCR al T0



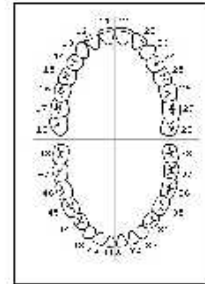
Paziente C al T1

Dopo un mese (T1), il paziente pur non presentando clinicamente una diminuzione della placca su tutti i denti, presenta un miglioramento del quadro infiammatorio come confermano i dati raccolti.(Figura 21)

T1	PI					GI			
	0	1	2	3		0	1	2	3
12			1				1		
13			1				1		
22			1				1		
23			1				1		
32			1				1		
33			1			1			
42			1			1			
43			1			1			
occorrenze:	0	0	8	0		0	3	5	0

Figura 21. PI e GI al T1

I risultati della PCR in questa fase(T1), indicano la presenza nell'ambito della carica batterica totale di 4,38% di batteri patogeni, tra i quali la presenza di *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*, *Tannerella Forsythenys*, *Treponema Denticola*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium Nucleatum*, e *Campylobacter Rectus*. In questo caso le legature all'argento hanno determinato un dimezzamento della carica di batteri patogeni ma alcuna variazione qualitativa rimanendo per questo paziente un rischio elevato di parodontopatia (Figura22).



paziente PEL ALE
 data di nascita 24/06/1997
 sesso M
 data prelievo 02/09/2010
 richiedente GERARDI EMANUELA

numero del campione B-1072
 data 09/09/2010

DENTE	SITO	PROFONDITA' DELLA TASCA	BOF	PUS	
13	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
23	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
43	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
42	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
33	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca

NOME BATTERIO	CONTA BATTERICA	x	% RELATIVA
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Actinobacillus actinomycescomitans</i>	7,7 · 10 ²	+	0,0051 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Tannerella forsythensis</i>	8,31 · 10 ²	++	0,0554 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Treponema denticola</i>	7,82 · 10 ²	++	0,5213 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Peptostreptococcus micros</i>	4,6 · 10 ²		0,0307 %
<input type="checkbox"/> <i>Prevotella intermedia</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input type="checkbox"/> <i>Fusobacterium nucleatum ssp</i>	3,6 · 10 ²	+++	2,4000 %
<input type="checkbox"/> <i>Campylobacter rectus</i>	1,69 · 10 ²		1,1267 %
<input type="checkbox"/> <i>Eikenella corrodens</i>	3,71 · 10 ²		0,2473 %
<input type="checkbox"/> Carica batterica totale	1,5 · 10 ⁷		100,0000 %

Genotipo *Actinobacillus actinomycescomitans*:
 Genotipo JP2 maggiormente patogeno rispetto al genotipo 652. **652**

Genotipo *Porphyromonas gingivalis*:
 FimA Tipo I: Scarsa patogenicità - FimA Tipo II-IV: Alta patogenicità.

LEGENDA
 + batterio individuato
 ++ batterio presente in quantità elevata
 +++ batterio presente in quantità molto elevata
 Carica batterica elevata richiede eventuale terapia

Gráfico 1

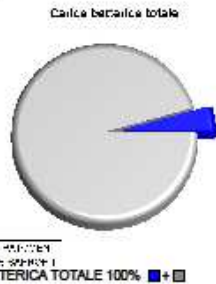


Gráfico 2



NOTE:

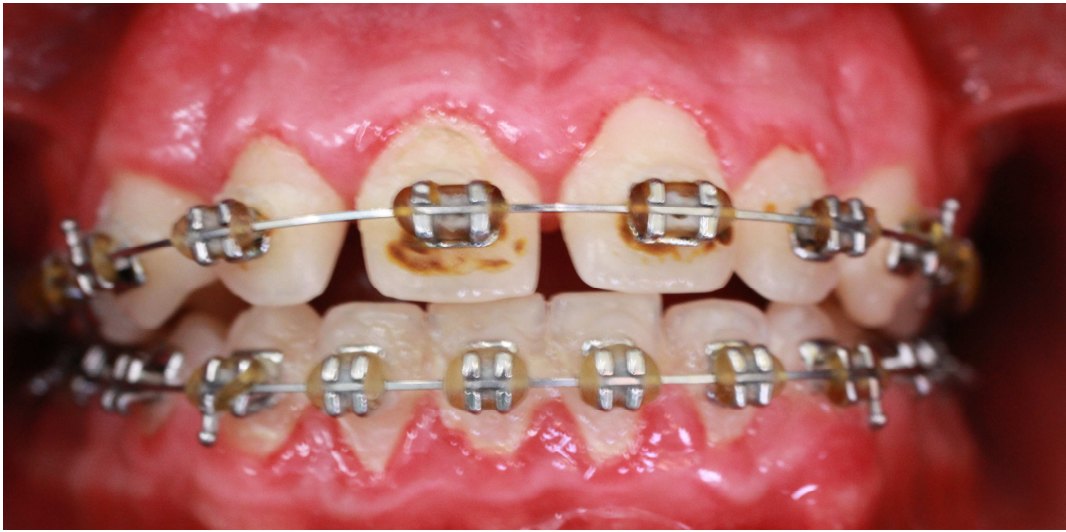
www.biomoleculardiagnostic.com - info@biomoleculardiagnostic.com

Direttore Sanitario
Dott.ssa Elena Fanti



Figura 22. PCR al T1

7.4 Caso Clinico D



Paziente D al T0

In questo caso trattasi di un paziente di anni 14, di sesso maschile, in buona salute, in terapia ortodontica su entrambe le arcate da circa 6 mesi. All'inizio della cura sono state date le corrette indicazioni d'igiene orale e ad ogni controllo successivo il paziente è stata rimotivato. Nell'ambito dello studio si è presentato alla mia osservazione presentando placca abbondante su tutti i denti di entrambe le arcate, gengive ipertrofiche, presenza di sanguinamento al sondaggio su 13,12,22,23, sanguinamento spontaneo su 33,32,43,42 come si può meglio valutare dagli indici di placca e sanguinamento raccolti. (Figura 23).

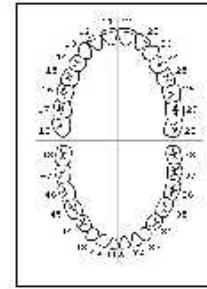
Come indicato dal protocollo di ricerca, in questa fase (T0) ho raccolto gli indici PI e GI ed eseguito il prelievo per il test microbiologico(PCR-real time), quindi ho sostituito le legature standard con le legature a rilascio d'argento e predisposto il controllo

dopo un mese senza dare ulteriori indicazioni di igiene orale e senza spiegare le caratteristiche chimiche delle legature(T1).

paziente:		nome	cognome	anno					
		chi	mar	1996					
T0		PI			GI				
		0	1	2	3	0	1	2	3
	12				1			1	
	13				1			1	
	22				1			1	
	23				1			1	
	32				1				1
	33				1				1
	42				1				1
	43				1				1
occorrenze:	0	0	0	8	0	0	4	4	

Figura 23. PI e Gi al T0

I risultati della PCR, indicano la presenza nell'ambito della carica batterica totale di 6,84% di batteri patogeni, tra i quali la presenza di Porphiromonas Gingivalis, Tannerella Forsythenys, Treponema Denticola, Peptostreptococcus micros, Fusobacterium Nucleatum, e Campylobacter Rectus.(Figura24).



paziente **CHI MAR**
 data di nascita **24/11/1995**
 sesso **M**
 data prelievo **19/07/2010**
 richiedente **GERARDI EMANUELA**

numero del campione **B-0934**
 data **23/07/2010**

DENTE	BITO	PROFONDITA' DELLA TASCA	BIOP	PUS	
13	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
23	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
43	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
42	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
33	ND	0 mm	<input checked="" type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca

NOME BATTERIO	CONTA BATTERICA	x	% RELATIVA
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Porphyromonas gingivalis</i>	2,58 · 10 ⁴	++	0,2704 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Tannerella forsythensis</i>	2,96 · 10 ⁴	+++	3,1027 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Treponema denticola</i>	2,06 · 10 ⁴	+++	2,1593 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Peptostreptococcus micros</i>	3,26 · 10 ³		0,0342 %
<input type="checkbox"/> <i>Prevotella intermedia</i>	< 1,00 · 10 ²		0,0000 %
<input type="checkbox"/> <i>Fusobacterium nucleatum ssp</i>	3,16 · 10 ³	++	0,0331 %
<input type="checkbox"/> <i>Campylobacter rectus</i>	1,03 · 10 ⁴		1,0797 %
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Eikenella corrodens</i>	1,6 · 10 ⁴		0,1677 %
<input type="checkbox"/> Carica batterica totale	9,54 · 10 ⁴		100,0000 %

Genotipo *Actinobacillus actinomycetemcomitans*:
 Genotipo JP2 maggiormente patogeno rispetto al genotipo 652.

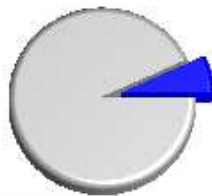
Genotipo *Porphyromonas gingivalis*:
 FmA Tipo I: Scarsa patogenicità. - FmA Tipo II-IV: Alta patogenicità.

TIPO II

*** LEGENDA**
 + batterio individuato
 ++ batterio presente in quantità elevata
 +++ batterio presente in quantità molto elevata
 Carica batterica elevata richiede eventuale terapia

- Grafico 1

Carica batterica totale



■ EIKENELLA CORRODENS
 ■ PORPHYROMONAS GINGIVALIS
 ■ TANNERELLA FORSYTHENSIS
 ■ TREPONEMA DENTICOLA
 ■ PEPTOSTREPTOCOCCUS MICROS
 ■ CAMPYLOBACTER RECTUS
 ■ FUSOBACTERIUM NUCLEATUM SPP
 ■ ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS
 ■ PREVOELLA INTERMEDIA
 CARICA BATTERICA TOTALE 100% ■+■

- Grafico 2

Percentuali relative alla carica dei patogeni (Spettro di patogeni II)



■ PORPHYROMONAS GINGIVALIS
 ■ TANNERELLA FORSYTHENSIS
 ■ EIKENELLA CORRODENS

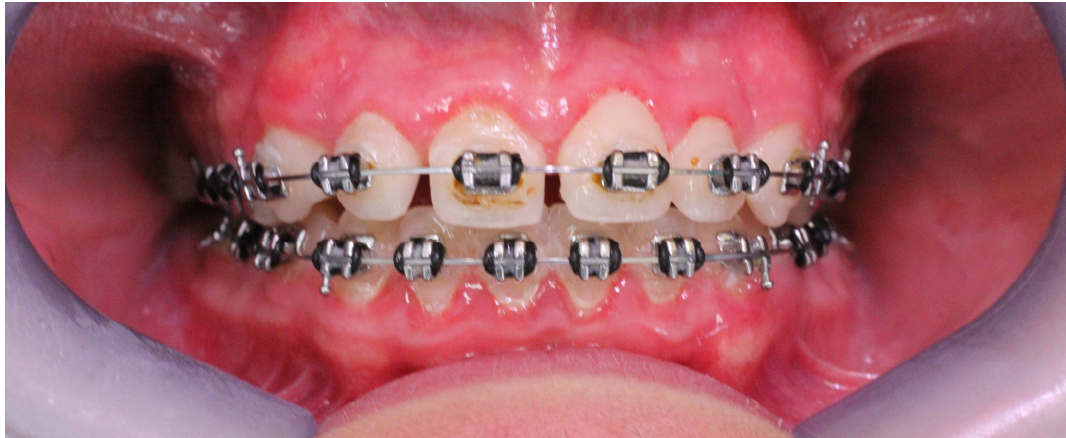
NOTE:

www.biomoleculardiagnostic.com - info@biomoleculardiagnostic.com

Direttore Sanitario
Dott.ssa Elena Fanti



Figura 24. PCR al T0



Paziente D al T1

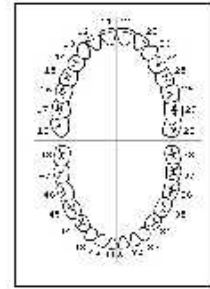
Dopo un mese (T1), il paziente presenta clinicamente una diminuzione della placca su tutti i denti e un miglioramento del quadro infiammatorio con assenza di sanguinamento al sondaggio e spontaneo, come confermano i dati raccolti. (Figura 25)

T1	PI					GI			
	0	1	2	3		0	1	2	3
12		1				1			
13		1				1			
22		1				1			
23		1				1			
32		1				1			
33		1				1			
42		1				1			
43		1				1			
occorrenze:	0	8	0	0		0	8	0	0

Figura 25. PI e GI al T1

I risultati della PCR in questa fase (T1), indicano la presenza nell'ambito della carica batterica totale di 3,658% di batteri patogeni, tra i quali la presenza di Porphyromonas Gingivalis, Tannerella

Forsythenys, Treponema Denticola, Peptostreptococcus micros, Fusobacterium Nucleatum, e Campylobacter Rectus. In questo caso le legature all'argento hanno determinato un dimezzamento della carica di batteri patogeni, alcuna variazione qualitativa ma una riduzione notevole dei batteri del complesso rosso, più aggressivi. Rimane per questo paziente un rischio elevato di parodontopatia (Figura26).



paziente **CHI MAR**
 data di nascita **24/11/1995**
 sesso **M**
 data prelievo **06/09/2010**
 richiedente **GERARDI EMANUELA**

numero del campione **B-1085**
 data **13/09/2010**

DENTE	BITO	PROFONDITA' DELLA TASCA	BIOP	PUS	
13	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
23	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
33	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
42	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca
43	ND	0 mm	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	<input type="checkbox"/> si <input checked="" type="checkbox"/> no	Provetta Bianca

NOME BATTERIO	CONTA BATTERICA	% RELATIVA
Actinobacillus actinomycetemcomitans	< 1,00 · 10 ²	0,0000 %
Porphyromonas gingivalis	1,48 · 10 ²	0,0019 %
Tannerella forsythensis	5,26 · 10 ²	0,0659 %
Treponema denticola	6,57 · 10 ²	0,0823 %
Peptostreptococcus micros	1,46 · 10 ²	0,0183 %
Prevotella intermedia	< 1,00 · 10 ²	0,0000 %
Fusobacterium nucleatum ssp	1,64 · 10 ³	2,0551 %
Campylobacter rectus	9,59 · 10 ²	1,2018 %
Eikenella corrodens	1,83 · 10 ²	0,2293 %
Carica batterica totale	7,98 · 10 ²	100,0000 %

Genotipo Actinobacillus actinomycetemcomitans:
 Genotipo JP2 maggiormente patogeno rispetto al genotipo 552.

Genotipo Porphyromonas gingivalis:
 FmA Tipo I: Scarsa patogenicità. - FmA Tipo II-IV: Alta patogenicità.

TIPO II+IV

*** LEGENDA**
 + batterio individuato
 ++ batterio presente in quantità elevata
 +++ batterio presente in quantità molto elevata
 Carica batterica elevata richiede eventuale terapia



NOTE:

Direttore Sanitario
 Dott.ssa Elena Fanti

Biomolecular Diagnostic

Figura 26. PCR al T1

8. CONCLUSIONI

La letteratura dimostra chiaramente che gli apparecchi ortodontici fissi determinano un aumentato accumulo di placca, colonizzazione batterica e decalcificazione dello smalto.^{1 2 3} Tuttavia, solo alcuni studi hanno valutato il contributo all'aumento di placca dei materiali di legatura. Forsberg e coll¹³ hanno valutato la colonizzazione microbica dei 12 pazienti trattati con apparecchi ortodontici fissi e hanno riferito che l'incisivo laterale legato all'arco con anello elastomerico presentava un maggior numero di microrganismi nella placca dell'incisivo legato con filo metallico. Inoltre essi hanno segnalato un aumento significativo del numero di *S. mutans* e lactobacilli nella saliva dopo l'inserimento di apparecchi fissi.

D'altra parte, Sukontapatiparke coll¹⁴, hanno usato il microscopio a scansione per valutare la colonizzazione batterica associata agli apparecchi ortodontici fissi ed hanno riferito che il metodo di legatura non influenza la morfologia batterica sulle superfici di composito e smalto.

Turkkakraman e coll¹². hanno valutato l'influenza di differenti metodi di legature dell' arco (legature in acciaio contro anelli elastomerici) sulla flora batterica intra-orale e sulla salute parodontale. Nonostante i denti con anelli elastomerici presentino leggermente un più alto numero di *S. mutans* e lactobacilli nella placca piuttosto che quelli con fili in acciaio, le differenze non sono statisticamente significative. Non ci sono differenze negli indici di placca gengivali o nella profondità di sondaggio dei denti legati. Tuttavia, le gengive intorno ai denti legati con anelli elastomerici sono inclini al sanguinamento.

Nel presente studio abbiamo voluto valutare le conseguenze parodontali degli apparecchi ortodontici fissi e con l'utilizzo di due metodi di legature per cui il protocollo redatto ha previsto la valutazione a sei mesi dall'inizio della terapia per evitare transitori cambiamenti legati ad un miglioramento dell'iniziale malocclusione (affollamento), sia la stabilizzazione dell'igiene orale che nelle fasi iniziali della terapia può essere migliore; inoltre in uno studio di Petti e coll.⁸ si è riscontrato nessun sviluppo di gengiviti e parodontiti in pazienti con una buona igiene orale nei primi 6 mesi, dopo i primi 6 mesi invece si è riscontrato una variazione nella microbiologia della placca con un aumento del rischio di sviluppare malattia parodontale. Oltre agli indici di placca e gengivali si è voluto valutare microbiologicamente la placca subgengivale sia con le legature elastomeriche(T0) che dopo un mese(T1) con le legature a rilascio d'argento utilizzando la metodica della PCR-realttime.

I risultati ottenuti sono coerenti con la letteratura per quanto riguarda l'aumento di placca in seguito all'applicazione dei brachets e bande infatti tra i 400 denti esaminati nei 50 pazienti, solo 82 nel T0 e 114 nel T1 presentavano un indice di placca 0, restando con entrambi i tipi di legature numerosi elementi con presenza di placca da poca ad abbondante. In nessun caso si è riscontrato formazioni di tasche parodontali, ma solo ipertrofia gengivale con conseguente pseudotasche e gengiviti. Gli indici di sanguinamento raccolti indicano un valore più interessante di differenza fra i due tipi di legature con un passaggio di 128 denti con indice di sanguinamento 0(GI) al T0 a 230 denti al T1 indicando la capacità delle legature d'argento di influenzare microbiologicamente la placca. Infatti dal confronto delle

PCR al T0 e al T1 è emerso non una variazione qualitativa dei microbi componenti la placca subgingivale ma un dimezzamento della carica dei batteri patogeni. Infatti con entrambe le legature, la placca è costituita da *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, *Treponema denticola*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*: composizione coerente con i dati raccolti dalla letteratura internazionale^{4 5 6 7 10} che spiega la presenza di gengiviti dopo il posizionamento di attacchi con la colonizzazione batterica della placca da parte di batteri parodontopatici, senza differenze microbiologiche a secondo del tipo di legatura. In questo studio il miglioramento degli indici gengivali dopo l'applicazione delle legature antimicrobiche è quindi esclusivamente da attribuire al dimezzamento della carica dei batteri patogeni rispetto alle legature elastomeriche standard. Si può pertanto concludere che le legature orthoshield safe-t-tie a rilascio d'argento possono essere un valido strumento di controllo della placca nei pazienti ortodontici poco collaboranti. Una prospettiva futura è uno studio che preveda l'uso di legature antimicrobiche sostituite ogni 30 giorni come da indicazioni del produttore per 6 mesi e la valutazione microbiologica della placca con PCR-real time a 3 mesi e a 6 mesi per verificare una eventuale influenza dell'argento sulla colonizzazione batterica.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Sadowsky C, BeGole EA, Long-term effects of orthodontic treatment on periodontal health. *Am J Orthod* 1981;80: 156-72.
2. Davies TM, Shaw WC, Worthington HV, Addy M, Dummer P, Kingdon A. The effect of orthodontic treatment on plaque and gingivitis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;99:156-61.
3. Glans R, Larsson E, Øgaard B Longitudinal changes in gingival condition in crowded and noncrowded dentitions subjected to fixed orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003 Dec;124(6):679-82.
4. Naranjo AA, Trivino ML, Jaramillo A, Berancourth M, Botero JE. Changes in the subgingival microbiota and periodontal parameters before and 3 months after bracket placement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;130:275.e17-22.
5. Lee SM, Yoo SY, Kim HS, Kim KW, Yoon YJ, Lim SH, Shin HY, Kook JK. Prevalence of putative periodontopathogens in subgingival dental plaques from gingivitis lesions in Korean orthodontic patients. *J Microbiol*. 2005 Jun;43(3):260-5.

6. Huser MC, Baehni PC, Lang R. Effects of orthodontic bands on microbiologic and clinical parameters. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1990;97:213-18.
7. Diamanti-Kipiotti A, Gusberti FA, Lang NP. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances. *J Clin Periodontol* 1987;14:326-33.
8. Petti S, Barbato E, Simonetti D'Arca A. Effect of orthodontic therapy with fixed and removable appliances on oral microbiota: a six-month longitudinal study. *New Microbiol.* 1997 Jan;20(1):55-62.
9. Attin R, Thon C, Schlagenhaut U, Werner C, Wiegand A, Hannig C, Attin T. Recolonization of mutans streptococci on teeth with orthodontic appliances after antimicrobial therapy. *Eur J Orthod.* 2005 Oct;27(5):489-93. Epub 2005 Jun 16.
10. Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, Zelic O. Effects of fixed orthodontic appliances on subgingival microflora. *Int J Dent Hyg.* 2008 May;6(2):129-36. -6.
11. Hamp SE, Lundström F, Nyman S. Periodontal conditions in adolescents subjected to multiband orthodontic treatment with controlled oral hygiene. *Eur J Orthod.* 1982 May;4(2):77-86.

12. Türkkahraman H, Sayin MO, Bozkurt FY, Yetkin Z, Kaya S, Onal S. Archwire ligation techniques, microbial colonization, and periodontal status in orthodontically treated patients. *Angle Orthod.* 2005 Mar;75(2):231-6.
13. Forsberg, C.M. and Brattstrom, V. Malmberg E, Nord CE. Ligation Wires and Elastomeric Rings: Two Methods of Ligation and their Association with Microbial Colonization of *Streptococcus mutans* and *Lactobacilli*. *Eur J Orthod.* Oct;13(5):416-20
14. Sukontapatipark W, el-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod.* 2001 Oct;23(5):475-84.
15. van Gastel JL, Quirynen M, Teughels W, Coucke W, Carels C, Influence of bracket design on microbial and periodontal parameters in vivo. *J Clin Periodontol* 2007;34:423-31.
16. Haffajee A.D., Socransky S.S., Patel M.R., Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral microbial immunol.* 2008 Jun; 23(3).196-205.

17. Teles R: P., Patel M., Socransky S.S., Haffajee A.D. Disease progression in periodontally healthy and maintenance subjects. *J Periodontol.* 2008 May; 79(5): 784-94.
18. Haffayee.A.D., Socransky S.S. Introduction to microbial aspects of periodontal biofilm communities, development and treatment. *Periodontol 2000.* 2006;42:7-12.
19. Socransky S., Haffayee A. D. Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000* 2005; 38: 135-187.
20. Shibli J.A., Melo L., Ferrari D.S., Figueiredo L.C., Faveri M., Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Oct; 19(10):975-82.
21. Rylev M, Kilian M. Prevalence and distribution of principal pathogens worldwide. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep; 35(8 suppl):346-61.
22. Mineoka T., Awano S., Rikimaru T., Kurata H., Yoshida A., Ansai T., Takehara T. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. *J Periodontol.* 2008 Apr; 79(4):670-6.

23. Sasamoto M., Nagai A., Sakagami R., Kitamura K., Miki T. Individual architecture of subgingival microflora in chronic periodontitis. *J Acad Periodontol.* 2009 Jan; 11(1):138-46.
24. Kawada M., Yoshida A., Suzuki N., Nakano Y., Saito T., Oho T., Koga T. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 289-292.
25. Kazarov E., Sweier D., Shelburne C., Progulsk-Fox A., Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes and Infection* 2006; 8: 687-693.
26. Morillo J. M., Lau L., Sanz M., Herrera D., Silva A. Quantitative Real-Time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res* 2003; 38: 518-524.
27. Sakamoto M., Takeuchi Y., Umeda M., Ishikawa I., Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by Real-Time PCR. *Microbiol Immunol* 2001; 45(1): 39-44.
28. Sanz M., Lau L., Herrera D., Morillo J. M., Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in

periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J. Clin. Periodontol* 2004; 31: 1034-1047.

29. Suzuki N., Yoshida A., Nakano, Y. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clinical Medicine and Reserch* 2005; 3: 176-185.
30. Yoshida A., Kawada M., Suzuki N., Nakano Y., Oho T., Saito T., Yamashita Y. TaqMan real-time polymerase chain reaction array for the correlation of *Treponema denticola* members with the severity of periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 196-200.
31. Apatzidou D.A., Papa A. A real-time PCR probe for the quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Dis.* 2009 Jan;15(1):119.
32. Athie M.A. Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol.* 2008 Sep; 79(9): 1620-9.
33. Haubek D., Ennibi O.K., Poulsen K., Benzarti N., Baelum V. The highly leukotoxic JP2 Clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and progression of periodontal attachment loss. *I Dent Res* 2004; 83(10): 767-770.

34. Haubek D., Ennibi O.K., Poulsen K., Vaeth M., Poulsen S., Kilian M. Risk of aggressive periodontitis in adolescent carriers of the JP2 clone of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* in Morocco: a prospective longitudinal cohort study. *Lancet*. 2008 Jan 19; 371(9608):237-42.
35. Seki M., Poulsen K., Heubek D., Kilian M. Novel loop-mediated amplification method for detection of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in subgingival plaque. *J Clin Microbiol*. 2008 Mar; 46(3).
36. Haubek D., Poulsen K., Kilian M. Microevolution and patterns of dissemination of the JP2 clone and *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*. *Infect immune*. 2007 Jun; 75(6):3080-8.
37. Orrù G., Marini M.F., Ciusa M.L., Isola D., Cotti M., Baldoni M., Piras V., Pisano E., Montaldo C. Usefulness of real-time PCR for the differentiation and quantification of 652 and JP2 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* genotypes in dental plaque and saliva. *BMC Infect Dis*. 2006 Jun 13; 6:98.
38. Yoshimura F., Murakami Y., Nishikawa K., Hasegawa Y., Kawaminami S. Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 2008 Oct 7.

39. Enersen M., Olsen I., Caugant D.A. Genetic diversity of porphyromonas gingivalis isolates recovered from single “refractory” periodontitis sites. *Appl Environ microbial.* 2008 Sep; 74(18):5817-21.
40. Inaba H., Nakano K., Kato T., Nomura R., Kawai S., Kuboniwa M., Ishihara K., Ooshima T., Amano A. Heterogenic virulence and related factors among clinical isolates of Porphyromonas gingivalis with type II fimbriae. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Feb; 23(1):29-35.
41. Amano A., Nakagawa I., Okahashi I., Hamada N. Variation of Porphyromonas gingivalis fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal res.* 2004 Apr; 39(2): 136-42.
42. Brett P.M., Zygogianni P., Griffiths G.S., Tomaz M., Parkar M., D’Aiuto F., Tonetti M. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res* 2005; 84(12): 1149-1153.
43. Ferreira S.B., Trombone A.P., Repeke C.E., Cardoso C.R., Martins W Jr, Santos C.F., Trevilatto P.C., Avila-Campos M.J., Campanelli A.P., Silva J.S., Garlet G.P. An interleukin 1-beta (IL-1beta) single-nucleotide polymorphisms at position 3954 and red complex periodontopathogens independently and additively modulate the levels of IL-1beta in diseased periodontal tissues. *Infect Immun.* 2008 Aug; 76(8): 3725-34.

44. Kowalski J., Gorska R., Dragan M., Kozak I. Clinical state of patients with periodontitis, IL-1 polymorphisms and pathogens in periodontal pocket-is there a link?(An introductory report). *Adv Med Sci.* 2006; 51 Suppl 1:9-12.
45. Cullinan M.P., Westerman B., Hamlet S.M., Palmer J.E., Faddy M.J., Seymour G.J., Middleton P.G., Taylor J.J. Progression of periodontal disease and interleukin-10 gene polymorphism. *J Periodontal Res.* 2008 Jun; 43(3); 328-33.
46. Wagner J., Kaminski W.E., Aslanidis C., Moder L., Hiller K.A. Prevalence of OPG and IL-1 gene polymorphisms in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2007 Oct; 34(10):823-7.
47. Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. The IL-1A(-889) gene polymorphisms is associated with chronic periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *J Periodontal Res.* 2007 Feb; 42(1):23-30.
48. Laine M.L., Leonhardt A., van Winkelhoff A.J., Renvert S. IL-1RN gene polymorphisms is associated with periimplantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Aug; 17(4):380-5.
49. Moreira P.R., Lima P.M., Sathler K.O., Imanishi S.A., Costa J.E., Gomes R.S., Gollob K.J., Dutra W.O. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity

of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. Clin.Exp.Immunol. 2007 Apr; 148(1);119-126.

50. Tai H., Endo M., Shimada Y., Gou E., Orima K., Kobayashi T., Yamazaki K., Yoshie H. Association of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with early onset periodontitis in Japanese. J Clin Periodontol 2002; 29: 882-888.
51. Takashiba S., Naruishi K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. Periodontology 2000. 2006; 40: 94-106.
52. Tervonen T., Raunio T., Knuutila M., Karttunen R. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. J Clin Periodontol 2007 May; 34(5): 377-383.
53. Trevilatto P.C., Scarel-Caminaga R.M., de Brito R.B., de Souza A.P., Line S.R.P. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. J Clin Periodontol 2003; 30:438-442.
54. Parkhill J.M. Hennig B.J.W., Chapple I.L.C., Heasman P.A., Taylor J.J. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with earlyonset periodontitis. J clin Periodontol 2000; 27: 682-689.

55. McDevitt M.J., Wang H.Y. et al. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J Periodontol* 2000; 71:156-163.
56. McDowell T.L., Symons J.A. et al. A genetic association between juvenile rheumatoid arthritis and a novel interleukin-1 alpha polymorphism. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 221-228.
57. McGuire M.K., Nunn M.E. Prognosis versus actual outcome. IV. The effectiveness of clinical parameters and IL-1 genotype in accurately predicting prognoses and tooth survival. *J Periodontol* 1999; 70:49-56.
58. Seymour G.J., Ford P.J., Cullinan M.P., Leishman S., Yamakazi K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect.* 2007 Oct; 13 Suppl 4:3-10.
59. Kinane D., Bouchard P., Group E European Workshop on Periodontology. Periodontal diseases and health: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 2008 Sep;(Suppl):333-7.
60. Martos R., Martn I. Correlations between dental-oral infections and cardiovascular disease. *Fogorv Sz.* 2008 Jun; 101(3):101-5.
61. Leuckfeld I., Obregon-Whittle M.V., Lund M.B., Geiran O., Bjortuft O., Olsen I. Severe chronic obstructive pulmonary

disease: association with marginal bone loss in periodontitis. *Respir Med* 2008 Apr; 102(4):488-94. Epub 2008 Jan 11.

62.Lamster I.B., Ialla E., Borgnakke W.S., Taylor G.W. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc.* 2008 Oct; 139 Suppl:19S-24S.

63.Mealey B.L., Rose L.F. Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008 Apr;15(2):135-41.

64.Salvi G.E., Carollo-Bittel B., Lang N.P. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions:update on associations and risks. *J Clin Periodontol.* 2008 Sep;(8 Suppl): 398-409.

65.Makiura N., Ojima M., Kou Y., Furuta N., OkN., Shizukuishi S., Amano A. Relationship of Porphyromonas gingivalis with glycemic level in patients with type 2 diabetes following periodontal treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Aug;(4):348-51.

66.Radnai M., Pal A., Novak T., Urban E., Eller J., Heffter N., Horvath G., Gorzo I. The possible effect of basic periodontal treatment on the outcome of pregnancy. *Fogorv Sz.* 2008 Oct; 101(5):179-85.

67. Manau C., Echeverria A., Agueda A., Guerrero A., Echeverria J.J. Periodontal disease definition may determine the association between periodontitis and pregnancy outcomes. *J Clin periodontal*. 2008 May;35(5):385-97. Epub 2008 Mar 12.
68. Irwin C., Mullally B., Ziada H., Byrne P.J., Allen E. Periodontics:9. Periodontitis and systemic conditions-is there a link? *Dent Update*. 2008 Mar;35(2):92-4, 07.8, 100-1.
69. Sacco G., Carmagnola D., Abati S., Luglio P.F., Ottolenghi L., Villa A., Maida C. Campus G. Periodontal disease and preterm birth relationship: a review of the literature. *Minerva Stomatol*. 2008 May; 57(5):233-46,246-50.
70. Marakoglu I., Gursoy U.K., marakoglu K., Cakmak H., Ataoglu T. Periodontitis as a risk factor for prterm low birth weight. *Yonsei Med J*. 2008 Apr 30; 49(2):200-3.
71. Batleja-gromada K., Banach J., kaczmarek A., Mnichowska-Polanowska M., gierdrys-Kalembe S. Anaerobic bacteria of periodontal pockets in course and premature labor. *Med Dosw mikrobiol*. 2008; 60(1):71-8.
72. Agueda A., Echeverria A., Manau C. Association between periodontitis in pregnancy and preterm or low birth weight: Review of literature. *Med Oral patol oral Circ Bucal*. 2008 Sep 1; 13(9):E609-15.

73. Mayer Y., Levin L., Oettinger-Barak O., Machtei E. Pregnancy and periodontal disease-is there a relation? Refuat hapeh vehashinayim. 2008 Jan;25(1).24-33, 82.
74. Schwarz F., Aoki A., Sculean A., Becker J. The impact of laser application on periodontal and peri-implant wound healing. Periodontology 2000 2009 Oct; 51(1) : 79-108.
75. Haubek D., Ennibi O.K., Vaeth M., Poulsen S., Poulsen K. Stability of the JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. J Dent Res. 2009 Sep;88(9):856-60.
76. Tredget EE, Shankowsky HA, Grenneveld A, Burrell R. A matched-pair, randomized study evaluating the efficacy and safety of Acticoat silver-coated dressing for the treatment of burn wounds. J Burn Care Rehabil. 1998; 19:531-537.
77. Davis IJ, Richards H, Mullany P. Isolation of silver and antibiotic-resistant *Enterobacter cloacae* from teeth. Oral Microbiology Immunology. 2005;20:191-194.