

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE GENERALI e SCIENZE DEI SERVIZI**

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 06/F1

Settore Scientifico disciplinare: MED/28

***Caratterizzazione microbiologica ed epidemiologica del
microbiota del cavo orale mediante metodiche colturali
e molecolari***

Presentata da: Paolucci Michela

Coordinatore Dottorato

Prof. Nicola Rizzo

Relatore

Prof.ssa Maria Paola Landini

Indice generale

Prefazione e scopo del lavoro

Pag. 4

Valutazione microbiologica ed epidemiologica dello stato di salute orale in pazienti affetti da cardiopatie congenite in età evolutiva

1. Introduzione alla malattia cardiaca congenita (CHD)	9
2. Embriologia e patogenesi delle CHD	9
3. Epidemiologia delle CHD	10
3.1 Classificazione	10
3.2 Eziologia	20
3.3 Incidenza o prevalenza alla nascita	22
3.4 Sopravvivenza e mortalità	23
4. Complicazioni	24
4.1 Deficit neurologici	25
4.2 Aritmie	26
4.3 Re-intervento	27
4.4 Insufficienza cardiaca	27
4.5 Ipertensione polmonare	28
4.6 Endocarditi	29
5. Stato di salute orale nei bambini con CHD	30
5.1 Ruolo di <i>Streptococcus mutans</i>	32
5.2 Indici e metodi di valutazione dello stato di salute orale	34
6. Materiali e Metodi	36
6.1 Pazienti, valutazioni cliniche e raccolta dei campioni	36
6.2 Esame clinico	40
6.3 Analisi microbiologica	43
6.4 Analisi statistica	43
7. Risultati	44
8. Discussione	48
9. Conclusioni	52
10. Bibliografia	53

Prevalenza di sei patogeni parodontali in campioni sottogengivali di pazienti adulti affetti da parodontite cronica

1. Introduzione alla malattia parodontale	60
2. Epidemiologia della malattia parodontale	63
3. Patogenesi della malattia parodontale	66
3.1 Le cellule residenti e la risposta immunitaria innata	66

3.2	I leucociti e la risposta immunitaria adattativa	67
3.3	Le citochine coinvolte nel riassorbimento osseo	68
4.	Microbiologia parodontale	69
4.1	Fattori di virulenza dei patogeni parodontali	70
4.2	Patogeni coinvolti nella malattia parodontale distruttiva	71
4.2.1	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	71
4.2.2	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	72
4.2.3	<i>Tannerella forsythia</i>	73
4.2.4	<i>Treponema denticola</i>	73
4.2.5	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	74
4.2.6	<i>Prevotella intermedia</i>	74
4.2.7	<i>Campylobacter rectu</i>	75
4.2.8	<i>Eikenella corrodens</i>	75
4.2.9	<i>Parvimonas micra</i>	75
4.3	Ecologia tra le specie batteriche e l'ospite	76
4.4	Metodologia applicata negli studi microbiologici	76
4.4.1	Coltura	77
4.4.2	Test immunometrici	77
4.4.3	Test di biologia molecolare	78
5.	Diagnosi di malattia parodontale	79
5.1	Anamnesi medica e dento-parodontale	80
5.2	Esame obiettivo	80
5.3	Mobilità	81
5.4	Sondaggio parodontale	81
5.5	L'esame radiografico endorale periapicale	81
5.6	Esami di laboratorio	81
5.7	Esame microbiologico	82
6.	Terapia della malattia parodontale	82
6.1	Terapia causale	82
6.2	Terapia meccanica non chirurgica	82
6.3	Terapia antimicrobica	83
6.3.1	Terapia antimicrobica sistemica	83
6.3.2	Terapia antimicrobica topica	83
6.4	Terapia chirurgica	83
6.4.1	Terapia chirurgica per eliminazione e/o riduzione delle tasche	83
6.4.2	Terapia chirurgica rigenerativa	84
6.4.3	Chirurgia muco-gengivale	84

7. Materiali e metodi di studio	84
7.1 Pazienti, valutazioni cliniche e raccolta dei campioni	84
7.2 Analisi microbiologica	85
7.3 Analisi statistica	86
8. Risultati	87
9. Discussione	88
10. Conclusioni	91
11. Bibliografia	93

Prefazione e scopo del lavoro

L'incidenza di patologie di interesse odontoiatrico permane elevata nonostante gli indubbi miglioramenti ottenuti in termini di salute generale.

E' importante promuovere e favorire programmi di prevenzione e cura delle patologie più diffuse della bocca (carie, malattia parodontale, neoplasie) al fine anche di evitare l'insorgenza di situazioni cliniche quali l'edentulismo che comporta invalidanti menomazioni psico-fisiche con conseguente impegno di cospicue risorse finanziarie per la terapia riabilitativa. Ben conosciuta è l'eziologia, la patogenesi, l'evoluzione delle patologie di cui sopra ed il fatto che la prevenzione rappresenta una misura fondamentale in termini di efficacia e favorevole rapporto costo-benefici. Inoltre, in considerazione del fatto che diversi fattori di rischio per le malattie del cavo orale (batteri, dieta non adeguata, fumo, abitudini di vita scorretti) sono comuni ad altre malattie cronico-degenerative, qualsiasi misura di prevenzione messa in atto va considerata come misura più ampia di promozione della salute globale dell'individuo.

In questo studio si prendono in considerazione sole le patologie più frequenti del cavo orale, la carie (in modo particolare in bambini affetti da cardiopatia congenita) e le malattie parodontali (in particolare la parodontite cronica) in quanto rappresentano di gran lunga le malattie infettive e croniche odontoiatriche più diffuse tra la popolazione di ogni età.

La patologia cariosa è una malattia infettiva a carattere cronico-degenerativo, trasmissibile, ad eziologia multifattoriale, che interessa i tessuti duri dentali determinandone la distruzione [1]. Rappresenta ancora oggi una delle patologie più diffuse nella popolazione [2-4]. Secondo il diagramma proposto da Keyes nel 1962 e tuttora ritenuto valido, affinché si sviluppi un processo carioso, sono necessari tre fattori di rischio fondamentali: la presenza di una flora batterica cariogena, una dieta ricca di carboidrati fermentabili e le ridotte difese dell'ospite.

Per quel che riguarda i batteri, nel cavo orale sono presenti centinaia di specie microbiche per lo più normali commensali. Almeno 20 specie batteriche hanno la capacità di produrre acidi deboli; il batterio più importante nell'eziopatogenesi della carie è lo *Streptococcus mutans*, anche se nelle lesioni cariose si possono rinvenire altri germi cariogeni, tra cui altri streptococchi (*S. oralis*, *S. sanguis*, *S. mitis*), lattobacilli e actinomiceti.

I problemi di salute orale sono notoriamente comuni nei bambini con cardiopatie congenite

(CHD) severe, soprattutto negli stadi precoci della malattia, e un numero sempre crescente di pazienti si sottopone a cure dentali. Alcuni studi dimostrano che l'incidenza di lesioni cariose è significativamente più alta nei bambini affetti da CHD rispetto ai bambini sani. Quando un bambino con CHD si sottopone a cure dentali, bisogna tenere in considerazione alcuni aspetti molto importanti: il rischio di endocardite infettiva (IE), il rischio di sanguinamento in pazienti che assumono anticoagulanti e il rischio di esacerbare ogni insufficienza cardiaca coesistente.

La malattia parodontale è una patologia cronica del "sistema parodontale" caratterizzata da infiammazione gengivale, formazione di tasche parodontali, mobilità dentaria, riassorbimento dell'osso alveolare con perdita, negli stadi più avanzati, degli elementi dentari.

La malattia parodontale rappresenta un problema di salute globale [5] che colpisce la maggior parte della popolazione adulta dopo i 35-40 anni di età. Inizia con un gengivite in gioventù che, se non curata, degenera, fino ad arrivare alla parodontite progressiva e distruttiva; il primo Consensus dell'European Workshop on Periodontology, infatti, ha stabilito che la parodontite è sempre preceduta dalla gengivite; la prevenzione della gengivite, pertanto, consente un'efficace opera di prevenzione della parodontite. La parodontite (ad insorgenza precoce aggressiva, dell'adulto cronica, necrotizzante) si manifesta con perdita radiografica di osso in presenza di perdita di attacco al sondaggio; segno patognomonico è la tasca parodontale; insorge quando il processo degenerativo supera l'attacco connettivale dell'elemento dentario. La distruzione delle strutture di sostegno del dente è il risultato dell'inefficace azione dei sistemi di difesa dell'ospite in risposta all'accumulo della placca microbica. Questo processo patogeno è diverso per estensione e gravità da individuo ad individuo ed all'interno dello stesso individuo.

Nel corso degli anni molti studi epidemiologici si sono focalizzati sulla prevalenza della malattia parodontale [6]; secondo questi studi la percentuale di individui con un parodonto sano (assenza di infiammazione e profondità di sondaggio non superiore a 4 mm) diminuisce con l'aumentare dell'età e non rappresenta più del 10% della popolazione adulta [7].

I dati epidemiologici relativi alla prevalenza della malattia parodontale variano in misura considerevole da studio a studio. In Europa e nel Nord America sono stati riportati tassi di

prevalenza della gengivite che oscillano dal 70 al 95% negli adulti. Studi più recenti hanno evidenziato una modificazione nei tassi di prevalenza con valori di gengivite compresi tra il 40 e il 50% negli adulti [8]. I valori di prevalenza della malattia parodontale nella popolazione italiana sono molto alti (circa 60%). La prevalenza di forme gravi o avanzate è elevata (10-14%) e aumenta drasticamente nelle fasce di età a partire da 35-44 anni.

L'attività di ricerca svolta ha lo scopo di focalizzare l'attenzione in termini epidemiologici su due problematiche odontoiatriche molto importanti:

- valutazione dello stato di salute orale in pazienti in età evolutiva affetti da cardiopatia congenita (CHD) rispetto ad un gruppo di controllo omogeneo per età e sesso. In questo contesto sono state valutate le possibili correlazioni della malattia e i diversi indici di salute orale e la popolazione microbica orale.
- prevalenza di alcuni tra i più importanti parodontopatogeni e la loro associazione con parametri clinici in un'ampia popolazione di pazienti adulti affetti da parodontite cronica.

Bibliografia

1. Featherstone, J.D., *The caries balance: contributing factors and early detection*. J Calif Dent Assoc, 2003. **31**(2): p. 129-33.
2. Hugoson, A., et al., *Oral health of individuals aged 3-80 years in Jonkoping, Sweden during 30 years (1973-2003). II. Review of clinical and radiographic findings*. Swed Dent J, 2005. **29**(4): p. 139-55.
3. Selwitz, R.H., A.I. Ismail, and N.B. Pitts, *Dental caries*. Lancet, 2007. **369**(9555): p. 51-9.
4. Tinanoff, N., M.J. Kanellis, and C.M. Vargas, *Current understanding of the epidemiology mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children*. Pediatr Dent, 2002. **24**(6): p. 543-51.
5. Scherp, H.W., *Current Concepts in Periodontal Disease Research: Epidemiological Contributions*. J Am Dent Assoc, 1964. **68**: p. 667-75.
6. Jenkins, W.M. and P.N. Papapanou, *Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents*. Periodontol 2000, 2001. **26**: p. 16-32.
7. Van der Velden, U., *Effect of age on the periodontium*. J Clin Periodontol, 1984. **11**(5): p. 281-94.
8. Oliver, R.C., L.J. Brown, and H. Loe, *Periodontal diseases in the United States population*. J Periodontol, 1998. **69**(2): p. 269-78.

**Valutazione microbiologica ed epidemiologica dello
stato di salute orale in pazienti affetti da cardiopatie
congenite in età evolutiva**

1. Introduzione alla malattia cardiaca congenita (CHD)

La malattia cardiaca congenita (CHD) è un devastante complesso di malattie legato allo sviluppo difettivo del cuore ed è una delle più comuni anomalie congenite nei bambini. L'incidenza delle forme severe e moderate è di 6-8 ogni 1000 nati vivi [2, 3].

Nonostante i progressi nella diagnosi e nel trattamento, CHD rappresenta il 3% di tutte le morti infantili e il 46% di morte per malformazioni congenite [4]. L'ultimo decennio ha cambiato il volto delle cardiopatie congenite nei neonati perché in precedenza si sapeva poco su CHD e, in molti casi, non si riusciva a definire l'anomalia causa di morte. Dall'inizio degli anni 1990, la sopravvivenza e la qualità della vita nei neonati con malattia cardiaca sono migliorate e negli ultimi 10 anni, i progressi in ecocardiografia, angiografia, cateterismo cardiaco, miglioramento delle tecniche chirurgiche e una più completa conoscenza della fisiologia del neonato hanno migliorato la capacità diagnostica diminuendo il rischio per il paziente. Oggi il 96% dei neonati con malformazioni cardiache congenite che sopravvive al primo anno di vita sarà ancora vivo a 16 anni di età [5]. Tuttavia, questa sopravvivenza è contrassegnata da morbidità a livello neurologico [6] e ancora oggi CHD rappresenta la principale condizione che favorisce l'insorgenza dell'endocardite infettiva (IE) in bambini di oltre di 2 anni d'età [7].

CHD può essere definita come un complesso di anomalie strutturali del cuore o dei grandi vasi toracici che si manifestano con un difetto funzionale [8]. In questa definizione sono quindi comprese quelle patologie clinicamente rilevanti che hanno beneficiato sostanzialmente dei progressi degli ultimi anni e la cui epidemiologia è molto cambiata.

2. Embriologia e Patogenesi delle CHD

Il cuore fetale inizia a formarsi intorno al 18° giorno di gravidanza con la formazione di un tubo. Questo tubo si allunga e si sviluppano dilatazioni e contrazioni che formano il ventricolo e alcuni tratti del sistema di efflusso. Lo sviluppo anormale durante questo tempo risulta nella trasposizione corretta e destrocardia. Il setto atriale e quello ventricolare si formano durante la quarta e quinta settimana di vita fetale. Lo sviluppo anormale può provocare il difetto del setto ventricolare (VSD), il difetto del setto atriale (ASD), difetti del canale atrioventricolare e l'assenza, stenosi o atresia delle valvole tricuspide o mitrale. In

questo periodo, inoltre, il tronco arterioso unico si separa in aorta e arteria polmonare; l'anormale separazione del tronco può provocare il tronco arterioso, la tetralogia di Fallot (TOF), l'atresia o stenosi della valvola aortica o polmonare, la trasposizione dei grandi vasi (TGV) o il ventricolo destro a doppia uscita. Il cuore fetale batte con ritmo sinusale normale fino alla sedicesima settimana di gestazione [9].

La circolazione fetale differisce dalla circolazione postnatale in quanto in utero i polmoni non sono necessari per lo scambio di gas. Così la maggior parte del sangue dal ventricolo destro non passa attraverso i polmoni e passa attraverso il dotto arterioso, che collega l'arteria polmonare e l'aorta. La circolazione neonatale normale prevede che il sangue passi nei polmoni per gli scambi di gas ed è garantita se subito dopo la nascita si è avuta la corretta chiusura del dotto arterioso e del forame ovale.

Altri fattori sono associati alle lesioni cardiache. Nel genere maschile si osservano più frequentemente la coartazione dell'aorta, la stenosi aortica, TGV, e la sindrome del cuore sinistro ipoplasico (HLHS). Al sesso femminile sono associati ASD e la pervietà del dotto arterioso (PDA) [6]. Il rischio di ricorrenza aumenta da tre a quattro volte quando un genitore o un fratello ha una malattia cardiaca congenita e aumenta di 10 volte se due parenti di primo ordine hanno CHD [6].

3. Epidemiologia delle CHD

3.1 Classificazione

I pazienti che hanno quadri di CHD più severe hanno una prognosi peggiore e hanno più frequenti e severe complicazioni rispetto ai pazienti con quadri patologici meno severi; di conseguenza hanno necessità di controlli ravvicinati e di cure specializzate.

I difetti cardiaci congeniti sono classificati in base a diversi sistemi.

1. Le CHD possono essere suddivise in lesioni cianogene e non cianogene.

- I difetti cianogeni sono caratterizzati da uno shunt destro-sinistro prevalente. Questi includono HLHS, stenosi aortica, coartazione aortica, arco aortico interrotto, TOF, TGV, atresia della valvola tricuspide, tronco arterioso, sindrome del cuore destro ipoplasico, anomalia di Ebstein e stenosi aortica [6]. I bambini affetti da CHD cianogene presentano spesso una notevole riduzione della capacità respiratoria che comporta ridotta

resistenza allo sforzo fisico, dispnea, tendenza ad assumere posizioni di ortopnea compensatoria e ritardo di crescita e sviluppo.

- I difetti acianogeni sono caratterizzati da uno shunt sinistro-destro prevalente e includono VSD, ASD e PDA.

2. Un altro modo di classificare le CHD si basa sui difetti del flusso polmonare, aumentato o diminuito.

- I difetti con un flusso di sangue polmonare aumentato comprendono PDA, VSD, ASD, canale atrioventricolare, coartazione dell'aorta e stenosi aortica [6].
- Le lesioni cardiache con ridotto flusso polmonare sono: TOF, stenosi polmonare, atresia polmonare e atresia della valvola tricuspide.

3. Classificazione secondo la frequenza con cui i pazienti vengono osservati e monitorati. Questa classificazione prende origine dalle classificazioni usate per le CHD degli adulti (Tab. 1) [10].

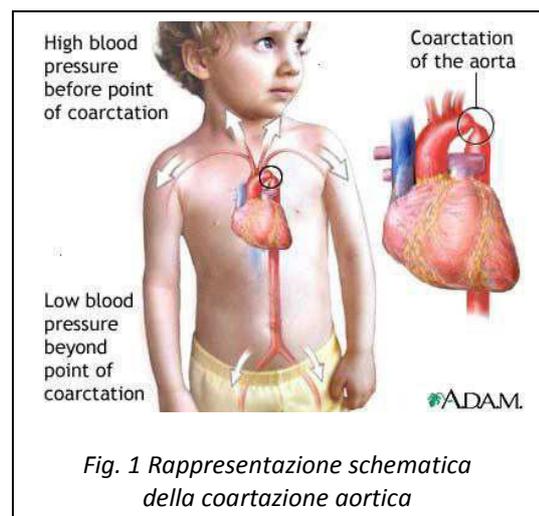
Tab. 1 Classificazione delle CHD secondo la frequenza di monitoraggio

CHD SEVERE	CHD MODERATE	CHD SEMPLICI
Pazienti che dovrebbero essere monitorati <u>regolarmente</u> presso un centro specializzato in CHD	Pazienti che dovrebbero essere monitorati <u>periodicamente</u> presso un centro specializzato in CHD	Pazienti che possono essere curati presso gli ospedali comunitari
Malattia congenita cianogena	Fistola aorta-ventricolo sinistro	Patologia isolata congenita della valvola aortica
Ventricolo sinistro a doppia uscita	Anomalo efflusso venoso polmonare	Patologia isolata congenita della valvola mitralica
Sindrome di Eisenmenger	Difetti del canale atrio-ventricolare	Forame ovale pervio isolato o piccoli difetti interatriali
Esito della procedura di Fontan	Coartazione aortica	Piccolo difetto del setto interventricolare isolato
Atresia mitralica	Anomalia di Ebstein	Difetto del setto interatriale tipo "ostium secundum" o seno venoso trattato
Ventricolo unico	Difetto atriale tipo seno venoso	Difetto del setto interventricolare trattato
Atresia polmonare	Difetto settale ostium primum	Stenosi polmonare lieve
Malattia ostruttiva vascolare-polmonare	Dotto arterioso pervio	Dotto arterioso precedentemente legato o occluso
Trasposizione dei grandi vasi	Insufficienza della valvola polmonare	
Atresia della tricuspide	Stenosi della valvola polmonare	
Tronco arterioso o emitronco	Fistola o aneurisma del seno del Valsalva	
Connessione anormale atrio-ventricolare o ventricolo-arteriale	Stenosi aortica sopra o sotto-valvolare	
	Tetralogia di Fallot	
	Difetto del setto interventricolare	
	Insufficienza aortica	
	Patologia della valvola mitralica	

4. Il quarto sistema di classificazione ordina i difetti secondo la pervietà del dotto arterioso.

- Le lesioni dotto-dipendente sono causate dalla continua pervietà del dotto arterioso.
- a) La **coartazione dell'aorta** rappresenta il 3-5% di tutte le malformazioni cardiache congenite [6] ed è una delle più difficili da diagnosticare nel periodo fetale [11]. È il difetto cardiaco più comune che si presenta nella seconda settimana di vita. È una lesione più frequente nei maschi che nelle femmine con un rapporto di 2:1. La coartazione della aorta è causata dal restringimento di una porzione alla fine dell'arco aortico trasverso o del dotto arterioso. Il sito più comune di restringimento è appena sotto l'origine dell'arteria succlavia sinistra (Fig. 1).

La coartazione prima del dotto arterioso è associata con ipoplasia dell'arco aortico e altri difetti come VSD, PDA, e TGV. I sintomi clinici includono insufficienza cardiaca (CHF), che può anche essere severa e manifestarsi con collasso cardiovascolare se il dotto è chiuso, e nelle estremità inferiori si presenta con pelle a chiazze, pallida e fredda e diminuisce o è assente il polso.

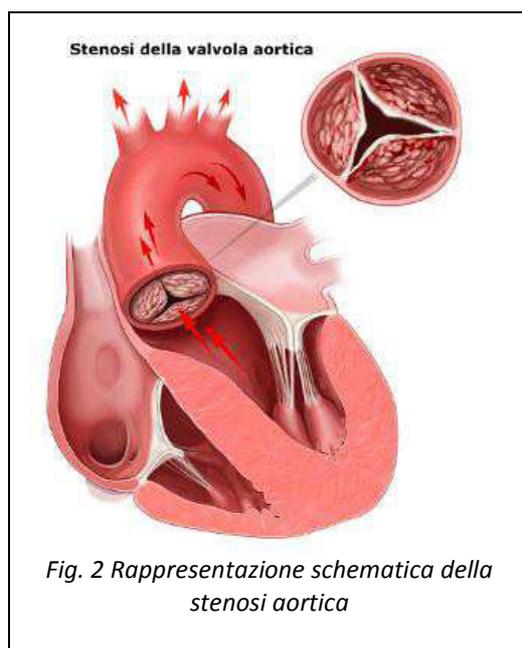


Nelle coartazioni più critiche si osserva un innalzamento della pressione sanguigna (>15mmHg) nelle estremità superiori. L'ecocardiografia può rilevare il difetto se il dotto arterioso è evidente [12]. La risonanza magnetica (RM) può essere utilizzata per determinare il sito della coartazione. Il cateterismo cardiaco è diagnostico e di solito viene eseguito prima dell'intervento chirurgico. Se la diagnosi viene fatta dopo la chiusura del dotto arterioso, il clinico interviene con un approccio aggressivo della CHF e somministra prostaglandine E₁ (PGE₁). Se il neonato è gravemente malato, un'angioplastica palliativa può essere effettuata prima della correzione chirurgica. La

correzione chirurgica può essere fatta con la resezione e anastomosi termino-terminale o un allargamento del tratto stenotico con lembo di succlavia. Uno dei principali inconvenienti della riparazione col lembo della succlavia è la perdita del polso nel braccio sinistro dopo l'intervento chirurgico, anche se questo viene solitamente ripristinato tramite circuiti collaterali. La resezione e anastomosi delle terminazioni è la procedura più comune e ha un basso tasso di ri-coartazione (3%) [13]. La mortalità chirurgica rimane al 2-10%, e la più frequente complicazione è l'ipertensione.

b) La **stenosi aortica** (Fig. 2) ha un'incidenza di 1 ogni 24.000 nati vivi ed è quattro volte più probabile nei bambini di sesso maschile. La stenosi può essere sottovalvolare, valvolare, o sopravalvolare e il miocardio del ventricolo sinistro è ipertrofico. La stenosi valvolare è la forma più comune e di solito è associata con una valvola aortica bicuspidale.

Se un feto presenta stenosi aortica severa, di solito ha anche ipoplasia del ventricolo sinistro. Questa condizione è di solito asintomatica alla nascita, ma se la lesione è severa, si sviluppa rapidamente insufficienza cardiaca che progredisce man mano che il dotto arterioso si chiude, e il neonato va incontro ad un improvviso deterioramento clinico. CHF e shock cardiogeno devono essere trattati in modo aggressivo con restrizione dei liquidi, digossina, diuretici, correzione di

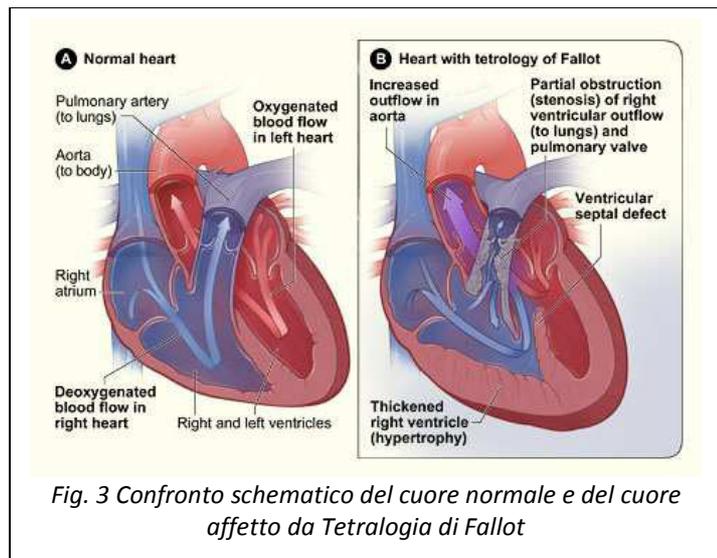


acidosi, profilassi antibiotica, e infusione di PGE_1 per prevenire l'ipossia. Il trattamento precoce è preferibile con valvuloplastica, che comporta una mortalità del 11%. Possono essere necessari trattamenti multipli nell'età pediatrica [14]. La gestione chirurgica comprende la valvulotomia aortica o la sostituzione della valvola, ma questi trattamenti sono riservati ai casi in cui la valvuloplastica non ha successo. I fattori che

contribuiscono all'aumento della mortalità nel caso di sostituzione della valvola aortica sono l'età inferiore a 6 mesi e un basso peso [15].

c) **TOF** è la lesione cardiaca cianogena più comune e ha un'incidenza di 1 ogni 5000 nati vivi. Questo difetto cardiaco è composto da quattro anomalie cardiache: stenosi polmonare o assenza della valvola polmonare, VSD, "aorta a cavaliere" e ipertrofia ventricolare destra (Fig. 3).

Le manifestazioni cliniche dipendono principalmente dalla restrizione del flusso sanguigno polmonare. Con una grave stenosi polmonare, il sangue è deviato da destra a sinistra attraverso il VSD, con conseguente ipossia e cianosi. In casi di stenosi lieve, la deviazione è da



sinistra a destra, con conseguente CHF. In casi di stenosi moderata, la deviazione attraverso il VSD è minima finché non interviene qualche fattore, come il pianto, che determina uno squilibrio nella resistenza vascolare polmonare o sistemica. Infatti, i neonati con TOF sono rosa a riposo e diventano blu quando piangono, in quanto il pianto causa la deviazione da destra a sinistra. Questo fenomeno - dispnea parossistica e grave cianosi - viene chiamato "tet spell" ed è comune nei bambini con TOF. L'esame clinico del neonato con stenosi severa rivela marcata cianosi, ipossia, dispnea. La radiografia toracica mostra un cuore di dimensioni normali a forma di stivale con un sistema vascolare polmonare marcatamente ridotto. Il trattamento dei neonati ipercianotici consiste nell'infusione con propanololo e PGE₁ per mantenere la pervietà del dotto arterioso fino all'intervento chirurgico. La chirurgia correttiva è preferibile prima dei 6 mesi di età e include la riparazione del VSD e, se necessario, una riparazione per ingrandire il tratto di efflusso polmonare [14]. Se la stenosi è

grave o è presente atresia, viene eseguito uno shunt palliativo di tipo Blalock-Taussig con la riparazione completa in un periodo successivo [16]. La mortalità postoperatoria rimane meno del 5% per i casi non complicati, e aumenta nelle forme più severe [17].

d) **TGV** si verifica in 1 caso ogni 5000 nati vivi e colpisce in prevalenza maschi rispetto alle femmine (rapporto di 2:1). TGV è la causa cardiaca più comune di cianosi. In questo difetto l'arteria polmonare è collegata al ventricolo sinistro e l'aorta si origina dal ventricolo destro. In assenza di altri difetti la circolazione è parallela. Il sangue ossigenato dai polmoni entra nell'atrio e ventricolo sinistro e torna ai polmoni attraverso l'arteria polmonare. Il sangue non ossigenato torna nell'atrio e ventricolo destro e ritorna nel circolo sistemico attraverso l'aorta. La miscelazione avviene a livello del dotto arterioso ed è necessaria per la sopravvivenza. Il neonato si presenta con cianosi, che peggiora rapidamente entro le prime 24 ore dalla nascita. La radiografia del torace può mostrare una forma cardiaca normale in dimensioni ma con l'aspetto di un "uovo sulla corda". L'ecocardiografia è il metodo di diagnosi standard. La gestione medica è finalizzata ad alleviare l'acidosi metabolica e a mantenere la pervietà duttale mediante infusione di PGE₁ finché non sia possibile effettuare una procedura palliativa [4]. La procedura di scelta è la settostomia atriale, che consiste nell'inserire un palloncino attraverso un catetere per creare un ASD. La procedura del bendaggio dell'arteria polmonare è usata per diminuire CHF e prevenire la malattia vascolare polmonare. Il trattamento chirurgico di scelta è lo switch arterioso (procedura Jatene), effettuata a 1 o 2 settimane di vita, che stacca l'aorta, le arterie coronarie, e l'arteria polmonare e le riattacca ai ventricoli corretti. Questa procedura permette la correzione anatomica e fisiologica. La sopravvivenza dopo intervento di switch arterioso è superiore al 98% a 4 anni.

e) **HLHS** si osserva in 2.6 neonati ogni 10.000 nati vivi, è responsabile dell'1-4% di tutti i difetti cardiaci congeniti e rappresenta il 25% di tutte le morti cardiache nella prima settimana di vita [18]. HLHS è caratterizzata da stenosi o atresia della valvola mitrale, ipoplasia del ventricolo sinistro, stenosi o atresia della valvola aortica, e ipoplasia dell'arco aortico (Fig. 4).

Tutte queste condizioni si traducono nell'incapacità delle strutture del cuore sinistro di supportare la circolazione sistemica. La procedura di Norwood, insieme all'infusione di PGE₁ sono le procedure palliative più comuni per HLHS finché non sia possibile intervenire chirurgicamente. I neonati

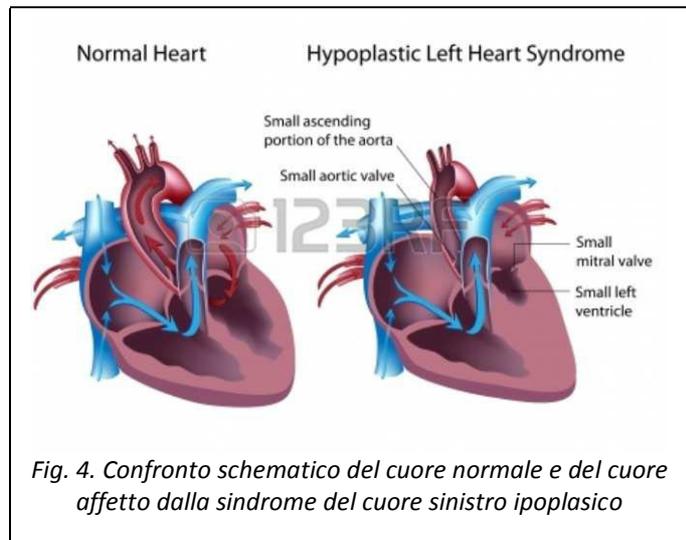


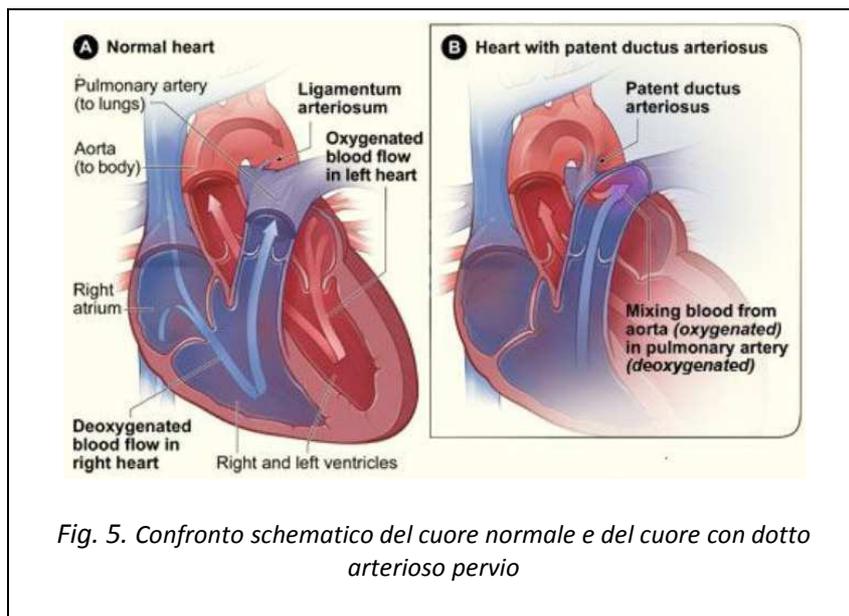
Fig. 4. Confronto schematico del cuore normale e del cuore affetto dalla sindrome del cuore sinistro ipoplasico

con HLHS sono asintomatici alla nascita, ma lo stato clinico si deteriora rapidamente appena il dotto arterioso si chiude. I segni sono tachipnea e dispnea, CHF a 24-48 ore di vita, pallore, polsi notevolmente diminuiti, collasso cardiocircolatorio e shock cardiogeno. Questa condizione di solito è riconosciuta al momento dello screening ecografico ostetrico di routine e la diagnosi prenatale si effettua con ecocardiografia fetale a 18 a 22 settimane di gestazione.

I recenti progressi nella diagnosi fetale hanno consentito di effettuare interventi nel feto nel tentativo di prevenire lo sviluppo di HLHS [19, 20]. La diagnosi postnatale è effettuata mediante ecocardiografia e viene utilizzato per determinare la funzione della valvola atrioventricolare, la dimensione dell'aorta ascendente, e la comunicazione interatriale. Le opzioni di trattamento sono due: l'approccio chirurgico multifasico o il trapianto cardiaco che hanno entrambi ottime riuscite in termini di tassi di sopravvivenza. La gestione iniziale include l'infusione di PGE₁ per mantenere aperto o riaprire il dotto arterioso e la circolazione sistemica, l'inalazione di una miscela di ossigeno e azoto per mantenere la saturazione di ossigeno al 70-85%. Questo può massimizzare il flusso di sangue sistemico e la saturazione di ossigeno [21]. La settostomia atriale mediante palloncino transcatetere o la puntura atriale transcatetere seguita da dilatazioni seriali del palloncino possono essere eseguite per decomprimere l'atrio sinistro [22].

- I difetti NON dotto-dipendenti.

a) **PDA** (Fig. 5) rappresenta la quarta lesione più comune e si verifica quando il dotto arterioso non si chiude entro pochi giorni dopo la nascita. Si è visto nel 45% dei neonati di peso inferiore a 1750 g alla nascita e nell'80% di quelli con peso inferiore a 1200 g alla nascita. PDA è tre volte più comune nelle femmine che nei maschi. I neonati con PDA hanno necessità di quantità maggiori di ossigeno e un supporto ventilatorio da 4 fino a 7 giorni di vita. La diagnosi viene confermata mediante ecocardiografia, che dettaglia la dimensione del difetto e documenta la direzione e il volume di sangue che viene deviato attraverso il dotto. Il primo passo nella gestione del paziente con PDA è tipicamente medica e consiste nella restrizione di liquidi, diuretici, indometacina o ibuprofene [23]. Il trattamento chirurgico è riservato a quei bambini in cui la gestione medica non ha successo. La prognosi a lungo termine è eccellente.



b) **VSD**, il difetto di cardiopatia congenita più comune, colpisce 1 ogni 3000 nati vivi ed è caratterizzato da un'apertura nel setto tra il ventricolo destro e sinistro. I sintomi clinici dipendono dalla grandezza dell'apertura: se il difetto è poco esteso VSD è asintomatico e il 50-75% di questi difetti guarisce spontaneamente. Un VSD moderato può presentarsi con affaticamento nell'alimentazione e ricorrenti infezioni

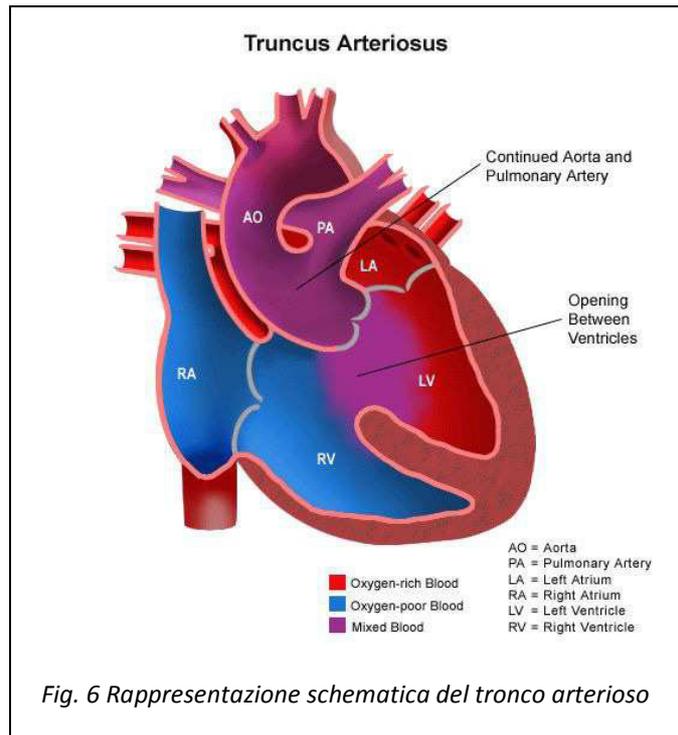
respiratorie. Gravi VSD solitamente si presentano con CHF da 1 a 2 mesi dopo la nascita. I segni clinici di una grave VSD sono epatomegalia e aumento dell'attività precordiale. La diagnosi è fatta mediante ecocardiografia. Il 20% di queste gravi lesioni si rimpiccioliscono o si chiudono senza intervento. La gestione medica comprende digossina e diuretici. Il trattamento chirurgico può essere palliativo per diminuire il flusso sanguigno attraverso l'arteria polmonare, oppure può essere correttivo per suturare o riparare il difetto attraverso una ventricolotomia. In alcune lesioni è possibile usare dispositivi transcateretere. Il tasso di mortalità per VSD è di circa 5% nei neonati.

c) **ASD** si verifica con un'incidenza di 1 ogni 5000 nati vivi e rappresenta il 7-10% di tutti i difetti cardiaci. Le femmine hanno il doppio di probabilità rispetto ai maschi di esserne affette. Un ASD è un'apertura anomala nel setto tra l'atrio destro e sinistro. Se isolato, ASD è di solito asintomatico e non viene neanche riconosciuto alla nascita. Entro il primo anno di vita il 50% dei bambini diventa sintomatico, si presenta con CHF, ritardo di crescita, infezioni respiratorie ricorrenti. La chiusura spontanea può verificarsi in piccoli difetti. La gestione medica di CHF e la riparazione chirurgica posticipata sono usati per trattare ASD con CHF. In caso di CHF non trattabile, i pazienti possono essere sottoposti a riparazione chirurgica precoce per suturare il difetto. Il trattamento chirurgico ha delle complicanze, come il residuo della derivazione, aritmie, ed embolizzazione del device. I dispositivi di chiusura transcateretere vengono utilizzati con lievi ASD e se il paziente pesa almeno 8 kg. L'impianto del dispositivo è guidato da una ecocardiografia transesofagea. La sopravvivenza è rispettivamente del 97% e 90% a 5 e 10 anni dopo l'intervento di riparazione [24].

d) Il **canale atrioventricolare** colpisce 1 neonato ogni 9000 nati vivi ed è il difetto cardiaco più comunemente associato alla sindrome di Down. Il difetto può variare da una semplice fenditura della valvola mitrale o tricuspide all'assenza dell'intero setto superiore e inferiore. Questi difetti determinano degli shunt sinistra-destra, oltre che ASD e VSD. I sintomi si presentano 1-2 settimane dopo la nascita se il rigurgito atrioventricolare è grave. La gestione mira ad evitare la malattia ostruttiva vascolare-

polmonare. La gestione medica include il trattamento con digossina e diuretici per controllare CHF. Il trattamento chirurgico consiste nella riparazione primaria mediante la chiusura del ASD e VSD e la ricostruzione della valvola mitrale e tricuspide [17]. La chirurgia generalmente viene eseguita entro i 6 mesi d'età postnatale se è presente il canale atrioventricolare completo, e da 6 a 12 mesi se il canale atrioventricolare è parziale.

e) Il **tronco arterioso** (Fig. 6) si verifica in 1 caso ogni 33.000 nati vivi ed è pari al 1-2% dei difetti cardiaci congeniti. Si possono descrivere tre tipi di tronco arterioso: *tipo I*, il più comune, con una arteria polmonare corta proveniente dalla base del tronco comune, che poi si divide in arteria destra e sinistra; *tipo II*, in cui le arterie polmonari destra e sinistra provengono dalla superficie posteriore del tronco comune, e *tipo III*, dove le arterie



polmonari destra e sinistra hanno origini distinte dalle pareti laterali del tronco comune. Il tronco arterioso si presenta con CHF, con polso forte e con aumento della pressione del polso. Si può anche presentare cianosi intermittente. L'ecocardiografia è l'esame diagnostico standard. La gestione medica è volta al trattamento di CHF con l'uso di diuretici, digossina e inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina. La riparazione chirurgica viene eseguita da 6 a 8 settimane dalla nascita e consiste in un homograph tra ventricolo destro e arteria polmonare, nella chiusura di VSD e nella separazione delle arterie polmonari dal tronco. Il tasso di mortalità post-chirurgico è inferiore al 10% e la sopravvivenza a 10-20 anni è superiore all'80%.

f) L'**anomalo ritorno venoso polmonare totale (TAPVR)** si verifica in 1 caso ogni 17.000 nati vivi ed è caratterizzato da vene polmonari che drenano direttamente o indirettamente nell'atrio destro. La sopravvivenza dipende dalla presenza del forame ovale o ASD. I tre tipi di TAPVR includono: *sopracardiaco*: rappresenta la forma più comune, che si verifica quando le vene polmonari si congiungono alla vena cava superiore sopra il diaframma; *cardiaca*, che viene diagnosticata quando le vene polmonari si attaccano direttamente al seno coronarico, drenante nell'atrio destro, e *intracardiaco*, che viene rilevato quando le vene polmonari si attaccano al sistema portale sotto il diaframma e convergono poi nella vena cava inferiore; questa è la forma più grave. Gli shunt TAPVR portano sangue ossigenato direttamente nell'atrio destro. Appena diminuisce la resistenza dei vasi polmonari, aumenta il flusso di sangue polmonare e aumenta anche il flusso di sangue nel lato destro del cuore. L'ecocardiografia mostra una dilatazione ventricolare destra. Se il ritorno venoso polmonare è ostacolato, il paziente sviluppa edema polmonare, con sintomi che includono profonda cianosi e distress respiratorio. La gestione medica è solo una misura temporanea per alleviare i segni di CHF e cianosi. La chirurgia è finalizzata a correggere la ASD e al trapianto delle vene anomale all'atrio sinistro. Il tasso di mortalità per i neonati che si sottopongono a chirurgia è del 12-20% [14].

3.2 Eziologia

L'eziologia della CHD è per gran parte sconosciuta. Infatti solo nel 15% dei casi di CHD è possibile stabilire la causa. Esistono diverse aneuploidie cromosomiche ben riconosciute che causano le sindromi di malformazione che comprendono le CHD. Le aneuploidie cromosomiche rappresentano circa l'8-10% di tutti i casi di CHD e comprendono, tra le altre, la trisomia 13, trisomia 18, la sindrome di Down, la sindrome di Turner e la sindrome DiGeorge. I difetti nei singoli geni rappresentano circa il 3-5% dei casi di CHD e sono spesso associati a malformazioni non cardiache, come la sindrome di Alagille, la sindrome Holt-Oram e la sindrome di Noonan [25-27]. L'eziologia delle CHD non associate ad una sindrome è poco chiara. Circa il 2% di tutti i casi di CHD può essere attribuito a fattori ambientali noti [28]. Il diabete mellito materno, la condizione di fenilchetonuria, l'obesità materna, l'uso di alcol, infezioni dal virus della Rosolia, la malattia febbrile, l'uso di alcuni farmaci (come

anticonvulsivanti [6], inibitori dell'enzima di conversione dell'angiotensina [10], thalidomide e acido retinoico) e l'esposizione ai solventi organici sono documentati come fattori di rischio per lo sviluppo di CHD. L'esposizione materna agli erbicidi, l'età materna che supera i 40 anni e l'età paterna superiore ai 35 anni sono stati esaminati come fattori di rischio per CHD, ma le informazioni disponibili sono ancora limitate per poter valutare il loro contributo nel rischio [29]. Anche la nutrizione è stato considerato come fattore di rischio: infatti il consumo di complessi multivitaminici che contengono acido folico in età gestazionale previene i difetti del tubo neurale, ma anche le CHD [30].

L'eziologia dei restanti casi di CHD non sindromiche è considerata essere multifattoriale, ovvero legata all'interazione tra fattori genetici ed ambientali [31-33]. Comunque solo pochi studi pubblicati documentano l'interazione e/o l'effetto cumulativo di diversi fattori, quindi non è possibile trarre delle conclusioni sul modello multifattoriale [34-37]. Inoltre, alcuni studi hanno riportato un più alto rischio di ricorrenza di CHD in una famiglia dove un membro è affetto rispetto al modello multifattoriale (dove il rischio di ricorrenza è fino al 5%) [38-41]. Si è valutato che se in una famiglia un soggetto è affetto da CHD e i genitori sono sani, il rischio di ricorrenza per un altro figlio è compreso tra 1-6% [38-41]. Quando due fratelli sono affetti da CHD, il rischio di ricorrenza può aumentare al 10%. Il rischio cambia a seconda del diverso tipo di CHD (Tab. 2) [38-41].

Tab.2 Rischio di ricorrenza di CHD non sindromiche in fratelli con genitori sani

Tipo di lesione	Rischio di ricorrenza quando un bambino è affetto (%)	Rischio di ricorrenza quando due bambini sono affetti (%)
Complessiva	1-6	3-10
VSD	3	10
ASD	2-3	8
AVSD	3-4	NR
Anomalia di Ebstein	1	3
Coartazione aortica	2	6
Stenosi aortica	2	6
Stenosi polmonare	2	6
Tetralogia di Fallot	2-3	8
Cuore sinistro ipoplastico	3	10
Atresia della valvola tricuspidale	1	3
Atresia polmonare	1	3
TGA	1-2	5
ccTGA	5-6	NR

Abbreviazioni: ASD, difetti del setto atriale; AVSD, difetti del setto atrioventricolare; ccTGA, trasposizione dei grandi vasi congenita corretta; CHD, malattia cardiaca congenita; NR, non riportato; TGA, trasposizione dei grandi vasi; VSD, difetti del setto ventricolare. Dati estrapolati dai lavori di Nora et al. [42] e Calcagni et al. [38]

Il rischio di ricorrenza per i figli di genitori affetti da CHD è lievemente più alto rispetto a quello di figli di genitori sani. Quando un genitore è affetto da CHD il rischio di ricorrenza è approssimativamente del 4%, anche se varia in funzione della tipologia di CHD [34]. Inoltre i figli di donne affette da CHD hanno un rischio di circa 2,5 volte superiore ai figli di uomini cardiopatici (Tab.3) [34, 41, 43].

Tab.3 Rischio di ricorrenza di CHD non sindromiche nei figli con un genitore affetto

Tipo di lesione	Se la madre è affetto(%)	Se il padre è affetto (%)
Complessiva	12-20	1-5
VSD	9-10	2-3
ASD	6	1-2
Coartazione aortica	4	2-3
Stenosi aortica	15-20	5
Stenosi polmonare	6-7	2
Tetralogia di Fallot	2-3	1-2

Abbreviazioni: ASD, difetti del setto atriale; CHD, malattia cardiaca congenita; VSD, difetti del setto ventricolare. Dati estrapolati dai lavori di Nora et al. [42]

Ad oggi oltre 40 diversi geni sono stati implicati nello sviluppo di CHD non sindromiche [44]. Alcuni esempi di mutazioni che causano malattia non sindromica sono quelle che si verificano a carico dei geni GATA4 e NKX2-5, che sono regolatori trascrizionali essenziali per la formazione del cuore [45, 46].

3.3 Incidenza o prevalenza alla nascita

A causa delle diverse definizioni di CHD, delle diverse caratteristiche della popolazione e dei diversi metodi di studio, l'incidenza di CHD varia da 4 a 50 casi ogni 1000 nati vivi [2, 47]. La ricerca dell'incidenza reale di CHD è molto complicata. Le difficoltà si riscontrano nelle diverse casistiche esaminati dai vari studi:

- studi condotti sui dati di una vasta popolazione ospedalizzata sono affetti da bias di campionamento perché l'inclusione nel database dipende dall'accesso alle cure o dal rinvio;
- alcuni studi condotti su pochi pazienti ricercano attivamente CHD eseguendo degli screening su tutti i neonati mediante ecocardiografia. La popolazione reclutata in questi piccoli studi può non essere rappresentativa dell'intera popolazione;
- La durata del follow-up dei neonati può influenzare la prevalenza perché oltre il 35% dei pazienti riceve diagnosi di CHD dopo l'infanzia o anche in età adulta [48].

- I neonati morti prima della diagnosi non sono mai inclusi in questi studi.

Considerando questi fattori, Hoffman e Kaplan hanno stimato che l'incidenza di CHD negli USA è di circa 10 casi ogni 1000 nati vivi [2]. Tuttavia, molti tra i più ampi studi pubblicati successivamente hanno documentato una prevalenza alla nascita molto più bassa, che varia dai 3 ai 6 casi ogni 1000 nati vivi [49-52].

La prevalenza alla nascita di CHD severa o moderata è di circa 1,5 casi ogni 1000 nati vivi per ciascuno di questi quadri [2, 47, 53].

Sono state inoltre descritte variazioni razziali e/o etniche nella prevalenza alla nascita di CHD [49, 54]. Le differenze geografiche sono difficili da valutare a causa dell'eterogeneità dei metodi applicati nei diversi studi e anche per la diversa qualità e accesso alle cure nei diversi paesi [47, 51].

Nell'ambito delle CHD, alcune anomalie si verificano più spesso tra i neonati maschi rispetto alle femmine e viceversa. Ad esempio alcune tra le patologie che compromettono l'afflusso al cuore, come il prolasso della valvola mitralica, difetti del setto atriale secundum, il dotto arterioso persistente, i difetti del setto atrioventricolare sono più frequenti tra le bambine [55, 56]. Tra i bambini maschi, invece, si osservano più frequentemente quelle patologie che compromettono l'efflusso cardiaco, come la trasposizione dei grandi vasi, la stenosi della valvola aortica, la coartazione, la tetralogia di Fallot, e il cuore con un unico ventricolo [55-57].

Con l'avvento dei programmi di screening prenatali mediante ultrasuoni, oltre un terzo delle malformazioni cardiache congenite e il 57-83% delle lesioni cardiache critiche vengono diagnosticate prima della nascita [58, 59]. Alcuni studi riportano che il 28-58% delle donne gravide interrompe la gravidanza appena viene diagnosticata una CHD [59-61]. Questi atteggiamenti hanno un effetto sulla riduzione della prevalenza di CHD. Inoltre, si è osservato che anche l'integrazione di acido folico in gravidanza ha contribuito alla riduzione della prevalenza alla nascita di CHD [62].

3.4 Sopravvivenza e mortalità

Il 96% dei neonati con CHD che sopravvive al primo anno d'età sopravvive almeno fino a 16 anni [48]. L'età mediana dei pazienti affetti da CHD severa è aumentata da 11 anni nel 1985

fino a 17 anni nel 2000 e l'età mediana della morte dei pazienti con cardiopatia congenita è aumentata da 37 anni nel 2002 a 57 anni nel 2007 (Fig. 7) [63, 64]. Nelle ultime due decadi, la mortalità tra i pazienti affetti da CHD è diminuita tra il 50-70%, a seconda della lesione [65]. La riduzione più consistente si è registrata nel gruppo dei pazienti con lesioni di entità moderata o severa [65]. Il confronto tra i diversi gruppi di età mostra che la riduzione più significativa si ha nel gruppo 1-4 anni, seguito dal gruppo 5-14 anni [66].

Nel corso del tempo si è osservato anche un cambiamento nel contributo relativo delle diverse cause di morte in pazienti con CHD. Il fattore che ha maggiormente contribuito alla morte è stato ed è ancora l'aritmia, seguita dall'insufficienza cardiaca congestizia [65]. Comunque nell'ultima decade sono aumentati i casi di decessi tra gli adulti con CHD causati dall'infarto del

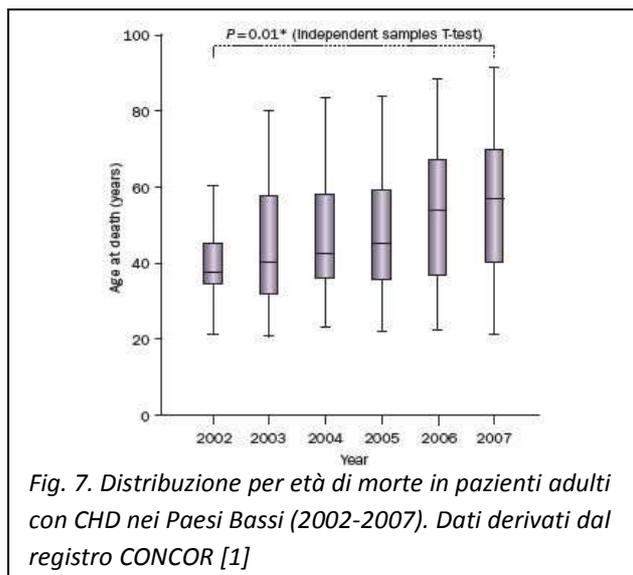


Fig. 7. Distribuzione per età di morte in pazienti adulti con CHD nei Paesi Bassi (2002-2007). Dati derivati dal registro CONCOR [1]

miocardio [65] e da altre cause non cardiovascolari [67-69]. Questo andamento suggerisce che la popolazione affetta da CHD vive abbastanza per essere soggetta alle tipiche patologie età-relate, come le malattie delle arterie coronariche e il cancro.

4. Complicazioni

Il corso di una malattia cardiaca congenita è associato a molte sequele tardive. Le femmine tendono ad essere a maggior rischio di ipertensione polmonare, mentre i maschi sono a più alto rischio di endocarditi, complicazioni aortiche (come aneurisma o rotture) ed eventi per i quali è indicato il cardioverter-defibrillatore impiantabile [70, 71]. Altre complicazioni frequenti in entrambi i sessi sono l'insufficienza cardiaca, aritmie, un re-intervento, i ritardi nello sviluppo neurologico e le endocarditi. Tutte le complicazioni di una CHD hanno un impatto sulla epidemiologia della malattia.

4.1 Deficit neurologici

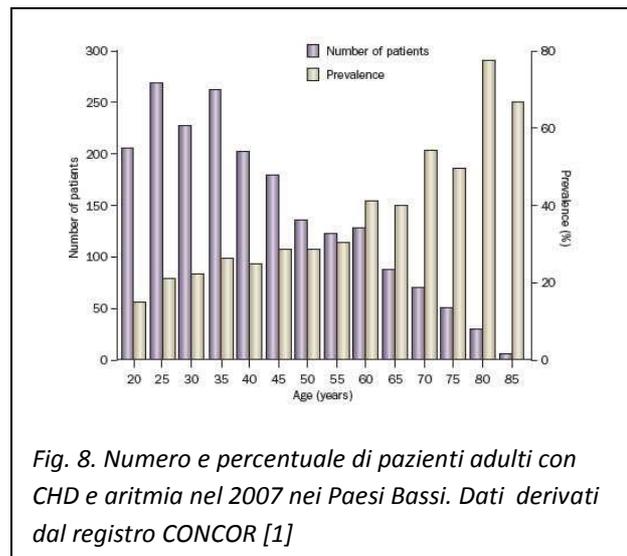
La più preoccupante delle patologie che complicano una CHD è quella del deficit neurologico, che si osserva dall'età di 1 anno. Gli outcome sfavorevoli nell'infanzia sono relativi a questioni alimentari e a ritardi motori. I bambini in età prescolare mostrano ritardi nel linguaggio, deficit motori importanti che si presentano come goffaggine, e deficit motori più fini che interessano il disegno e la scrittura. I problemi in pazienti in età scolare sono riferiti a deficit di attenzione, disturbi di iperattività, problemi di integrazione visivo-motoria, e deficit di progettazione esecutiva che determinano difficoltà nell'esecuzione di istruzioni con più passaggi. Uno studio ha evidenziato che i deficit neurologici sono legati a diversi eventi quali le lesioni cerebrali preoperatorie, il bypass cardiopolmonare eseguito per facilitare le procedure chirurgiche, la scarsa interazione con l'ambiente per bambini con CHD cianotica e l'ambiente inadatto durante l'ospedalizzazione prolungata. Lo studio ha anche riferito che i deficit sono spesso visti in bambini con complesse alterazioni cardiache [72]. I fattori associati allo sviluppo di esiti neurologici sono l'età gestazionale, la genetica, il tipo di difetto cardiaco, la comparsa di eventi convulsivi entro 48 ore dall'intervento chirurgico, il grado di acidosi, l'età in cui avviene l'intervento di riparazione, il livello socio-economico, ipossiemia, ipoglicemia, scarso efflusso cardiaco, arresto cardiaco, la durata dell'ospedalizzazione, giorni di ventilazione, grado di CHD, e la necessità e il tipo di supporto circolatorio durante l'intervento [73]. A lungo si è pensato che i deficit neurologici fossero legati al tempo impiegato per il bypass cardiopolmonare continuo (CPB) o ad una profonda ipotermia con arresto circolatorio durante l'intervento chirurgico correttivo, ma alcuni studi recenti hanno verificato che molti neonati a termine con difetti cardiaci congeniti hanno un cervello con anomalie nella materia bianca e grigia prima dell'intervento chirurgico [74]. Le alterazioni del tessuto cerebrale possono essere dovute alle variazioni del flusso sanguigno cerebrale durante la vita fetale di un bambino con CHD, o come risultato del difetto stesso [75]. Inoltre, il bypass cardiopolmonare continuo espone il cervello a sostanze estranee e dà origine ad una risposta infiammatoria.

Nonostante il miglioramento dei metodi chirurgici, le lesioni del sistema nervoso centrale rimangono una complicazione che si verifica nell'1-5% dei neonati sottoposti a chirurgia per un difetto cardiaco [76].

4.2 Aritmie

Le aritmie sono le più frequenti complicazioni a lungo termine nella popolazione con CHD e sono le principali cause di morbidità e di mortalità nell'età adulta [77-79]. Le aritmie si possono manifestare subito dopo l'intervento o nel follow-up a lungo termine. Il rischio di aritmia è correlato alla severità della lesione. L'incidenza di questa condizione generalmente aumenta con l'aumentare dell'età del paziente e quindi la prevalenza delle aritmie è maggiore tra gli adulti affetti da CHD (Fig. 8) [1].

I fattori che predispongono all'insorgenza di aritmie sono le conduzioni malformate o dislocate congenitamente, le anomalie emodinamiche, lo stress ipossico o meccanico, e le sequele residue o post-chirurgiche [80, 81]. Le aritmie si verificano meno frequentemente nei bambini rispetto agli adulti con CHD. Solo il 5% dei ricoveri ospedalieri con accesso da pronto soccorso nella



popolazione pediatrica con CHD è dovuta ad aritmia sintomatica [82]. Molte aritmie sono manifeste subito dopo l'intervento correttivo e la prevalenza varia dal 15% al 48% [83-85]. Le aritmie più comuni dopo l'intervento chirurgico sono: tachicardia ectopica giunzionale, aritmia sopraventricolare e disturbi della conduzione atrioventricolare [83, 84]. A lungo termine le aritmie post-operatorie precoci sono associate a complicazioni tardive, come la disfunzione ventricolare e le aritmie tardive [77, 86].

L'incidenza delle aritmie è più alta nei pazienti con lesioni moderate o severe; circa un terzo dei pazienti affetti da Tetralogia di Fallot già sottoposta a riparazione sviluppa aritmie sintomatiche e circa metà dei pazienti che ha subito la procedura di Fontan sviluppa tachicardia atriale entro 15 anni dall'intervento [87, 88]. Nei 20 anni dopo gli interventi di riparazione di Senning e Mustard per la trasposizione dei grandi vasi, la perdita del ritmo del seno si verifica nel 60% dei pazienti [89]. L'alta prevalenza di aritmie tra gli adulti con CHD ha stimolato la valutazione critica di tecniche chirurgiche e il miglioramento delle strategie

chirurgiche ha determinato la riduzione dell'incidenza di aritmie, come evidente dai dati di studi di follow-up a lungo termine [90, 91].

4.3 Re-intervento

Il numero di pazienti che si sottopone ad intervento chirurgico per CHD è ancora oggi in aumento. Poiché solo la correzione di piccoli e semplici difetti è effettivamente curativa, un numero sempre maggiore di pazienti con CHD ha necessità di re-interventi. Le motivazioni di re-intervento più frequenti sono: le complicazioni tardive o difetti residui, le correzioni che seguono strategie palliative in età pediatrica, le procedure palliative aggiuntive, o anche il trapianto cardiaco nel caso di insufficienza cardiaca irreversibile [92-97]. Ad oggi, almeno la metà di tutte le procedure chirurgiche per CHD in età adulta è rappresentata da re-interventi. È importante sottolineare che i pazienti che richiedono un re-intervento tendono ad avere difetti più severi e quindi necessitano di procedure chirurgiche più complesse [95]. I pazienti che si sottopongono a re-intervento sono più giovani che in passato e probabilmente questa tendenza continuerà anche nel futuro. Inoltre, si può prevedere che al raggiungimento dell'età adulta, i pazienti con CHD possano aver bisogno di interventi cardiocirurgici per malattie coronariche o valvolari acquisite. Per queste ragioni il numero complessivo di re-interventi nella popolazione con CHD è probabile che aumenti. I re-interventi negli adulti con CHD non sono privi di rischi. La cardiocirurgia nell'adulto è associata ad una sostanziale morbidità e mortalità. Circa il 20-50% di questi pazienti va incontro a complicazioni post-chirurgiche, come le aritmie (tipo le aritmie sopraventricolari e il blocco atrioventricolare), emorragia, sindrome da scarso efflusso, versamento pericardico e pleurico, insufficienza renale e respiratoria e pneumotorace [92, 96]. La mortalità post-operatoria è tra il 3,6% e il 6,7% e il tasso di sopravvivenza a 5 anni è di circa il 91% [92, 93, 96, 98, 99]. La mortalità in seguito a re-intervento è diminuita nel tempo [92, 93, 95].

4.4 Insufficienza cardiaca

Una proporzione significativa di bambini e adulti con CHD sviluppa insufficienza cardiaca. I pazienti con ventricolo destro unico ne sono particolarmente a rischio [100, 101]. Nei bambini l'insufficienza cardiaca è abitualmente legata al sovraccarico di volume causato dagli

shunts e dalle lesioni ostruttive del cuore. La maggior parte dei casi di insufficienza cardiaca si verifica prima del compimento del primo anno di vita; nei bambini più grandi l'insufficienza cardiaca è meno frequente e si sviluppa tipicamente dopo la chirurgia palliativa. La prevalenza di insufficienza cardiaca stimata in seguito ad una procedura di Fontan o dopo uno switch atriale è del 10-20% [102]. Negli adulti con CHD la disfunzione ventricolare e l'insufficienza cardiaca sono piuttosto comuni. Si stima che oltre il 40% dei pazienti adulti che si sottopone a procedura di Fontan e oltre il 20% di quelli che subiscono la procedura di Mustard sviluppano insufficienza cardiaca moderata o severa [100, 103]. Questi dati suggeriscono che l'insufficienza cardiaca nei pazienti con CHD non è ben compresa, perché molti studi si focalizzano sui casi di insufficienza cardiaca acquisita. Ciononostante, va precisato che nelle ultime decadi è aumentato l'interesse per trial clinici sull'insufficienza cardiaca in cui sono inclusi i pazienti con CHD [104, 105].

4.5 Ipertensione polmonare

L'ipertensione polmonare è una rara, ma molto severa complicazione sia nella popolazione pediatrica che nei pazienti adulti affetti da CHD. L'ipertensione dell'arteria polmonare (PAH) è causata da derivazioni intracardiache da sinistra a destra e da un sovraccarico di volume sanguigno polmonare. L'aumento della pressione causa disfunzioni endoteliali irreversibili ed un aumento della resistenza dei vasi polmonari con conseguente inversione dello shunt sinistra-destra e cianosi centrale (sindrome di Eisenmenger).

I Paesi Bassi hanno un database chiamato CONCOR con le informazioni e la banca di DNA dei pazienti con CHD e risulta che la prevalenza di PAH e della sindrome di Eisenmenger sono approssimativamente e rispettivamente del 4,2% e del 1%. Altri studi, però, hanno riportato che oltre il 10% dei pazienti con CHD sviluppa PAH. La presenza di difetti del setto ventricolare è la più frequente causa di PAH e della sindrome di Eisenmenger. Il numero di pazienti con CHD che ha PAH è destinato a diminuire nel tempo in quanto molte derivazioni vengono attualmente chiuse con strategie chirurgiche o altri strumenti di intervento prima che la malattia dei vasi polmonari possa svilupparsi. Dall'altro lato, però, il numero di pazienti con CHD complesse che sviluppano PAH nell'età pediatrica, come quelli che necessitano della procedura di Fontan, potrebbe aumentare.

4.6 Endocarditi

L'incidenza dell'endocardite infettiva (IE) è aumentata con l'estendersi della popolazione affetta da CHD. Nei bambini affetti da CHD le strutture endoteliali delle valvole o del setto sono anatomicamente alterati e generano anomale turbolenze del flusso ematico che traumatizzano le strutture valvolari e le superfici endocardiche contigue. L'endotelio danneggiato espone al sangue circolante le fibre collagene e lo stroma connettivale diviene sede di deposito, adesione e aggregazione di piastrine. Il deposito di fibrina favorisce il consolidarsi di tali aggregati e la formazione di vegetazioni trombotiche sterili, realizzando una condizione di endocardite trombotica non batterica. In caso di batteriemia i microrganismi sono in grado di impiantarsi nei depositi di piastrine e fibrina e di moltiplicarsi. Si formano vegetazioni di dimensioni variabili, masse amorfe di piastrine, fibrina, microrganismi e cellule infiammatorie. Inoltre, le strategie chirurgiche palliative e correttive hanno determinato un prolungamento della sopravvivenza, ma allo stesso tempo hanno aggiunto un fattore di rischio per le infezioni legate alla presenza di device come gli shunts, i condotti e le protesi. Infatti, le caratteristiche fisiche e chimiche dei materiali di cui sono costituiti, la virulenza dei microrganismi patogeni e la risposta del sistema immunitario dell'ospite sono tutti fattori che contribuiscono alla patogenesi dell'endocardite batterica.

Attualmente l'incidenza di IE in pazienti affetti da CHD varia dal 1,4 a 11,5 casi ogni 1000 pazienti/anno [106-109], che è di gran lunga superiore all'incidenza di IE nella popolazione generale (5-7 casi ogni 100000 persone/anno [110]). I pazienti con complesse CHD cianogene sono maggiormente a rischio di IE in quanto richiedono spesso shunts o innesti o interventi chirurgici [106].

Le più comuni complicazioni delle IE sono l'aumento del reflusso valvolare (30%), l'insufficienza cardiaca (23%) e gli emboli sistemici (20%) [111]. Queste complicazioni sono importanti predittori di mortalità [111]. Il tasso di complicazioni e la mortalità precoce associata a IE in pazienti con CHD sembra essere diminuita nelle ultime due decadi, forse come conseguenza di procedure chirurgiche più precoci e più efficienti e di terapie antibiotiche migliorate [111-113]. Ad oggi la mortalità ospedaliera da IE è diminuita fino a 6-7% circa [112].

I principali batteri che causano IE sono gram-positivi. Uno studio retrospettivo condotto In

Canada nel 1996 ha definito che il 43% dei batteri coinvolti nella IE sono quelli del genere *Streptococcus*, il 30% sono del genere *Staphylococcus* e il 5% sono Enterococchi [114].

La maggior parte dei microrganismi responsabili di IE sono streptococchi viridanti, soprattutto *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitior* e *Streptococcus mutans* [115].

Le attuali evidenze ottenute su modelli animali dimostrano che la batteriemia causa dell'endocardite infettiva possa essere indotta da situazioni routinarie, come l'igiene orale e la masticazione [116, 117]. Infatti lo sviluppo di IE presuppone la presenza di batteri o funghi nel sangue che possano aderire alla superficie intracardiaca. I difetti strutturali o congeniti del cuore, la presenza di valvole cardiache protesiche, l'uso intravenoso di droghe ed un evento recente di procedura invasiva, come la cura di ulcere, emodialisi, ecc. sono tutti fattori di rischio per lo sviluppo di IE. Questo rinforza l'importanza di attuare delle misure di prevenzione e di fornire informazioni periodiche ai pazienti e ai genitori riguardo il rischio di IE e di mantenere un buono stato di salute orale.

5. Stato di salute orale nei bambini con CHD

I problemi di salute orale sono notoriamente comuni nei bambini con CHD severo, soprattutto negli stadi precoci della malattia, e un numero sempre crescente di pazienti si sottopone a cure dentali [118-120], anche se le cure dentali regolari sono meno frequenti tra bambini affetti da CHD rispetto a bambini non affetti da questa patologia [121]. Le motivazioni che supportano queste evidenze non sono del tutto chiare. E' ipotizzabile una scarsa considerazione della salute orale da parte di coloro che si prendono cura dei bambini cardiopatici perché spesso la sua importanza non viene recepita dai genitori o forse perché non è efficacemente proposta dagli operatori sanitari.

In Italia le cardiopatie congenite cianogene figurano tra le patologie individuate come condizioni di vulnerabilità sanitaria, ovvero condizioni che presentano specifici problemi di natura odontoiatrica e che possono complicare la patologia di base e/o i relativi trattamenti (d.lgs. 2628/04). Tali condizioni danno diritto ai livelli essenziali di assistenza (LEA) il cui obiettivo primario è quello di preservare la salute orale fin dai primi anni di vita del piccolo paziente, attraverso la realizzazione di programmi di monitoraggio dell'incidenza della patologia cariosa e delle malocclusioni, cercando di formulare una diagnosi più precoce

possibile delle patologie. Individuata la patologia è necessario inserire il bambino in un percorso di prevenzione odontoiatrica: motivazione, informazione e istruzione all'igiene orale e all'alimentazione corretta, fluoroprofilassi e coinvolgimento dei genitori sono tutti tasselli fondamentali per il percorso di riqualificazione assistenziale. Nei soggetti affetti da cardiopatie congenite, infatti, le patologie infettive a livello del cavo orale quali gengiviti, ascessi di origine parodontale o endodontica, ed interventi odontoiatrici sono potenzialmente responsabili dell'insorgenza di endocardite batterica. Da ciò nasce la necessità di prevenzione primaria e secondaria della patologia cariosa e di profilassi antibiotica per tutte le procedure odontoiatriche alle quali si associa sanguinamento.

In particolare per questi pazienti la visita odontoiatrica rientra nel piano di controlli preventivi e sono garantiti cicli di terapie odontoiatriche, ortodontiche e igiene orale almeno fino alla risoluzione chirurgica della patologia di base.

Quando un bambino con CHD si sottopone a cure dentali, bisogna tenere in considerazione tre aspetti principali [122]:

- il rischio di IE;
- il rischio di sanguinamento in pazienti che assumono anticoagulanti;
- il rischio di esacerbare ogni insufficienza cardiaca coesistente.

La carie dentaria è una malattia da infezione dei denti che determina la distruzione dei tessuti duri del dente. Il ruolo più importante nello sviluppo della carie spetta agli agenti batterici. Confrontando lo stato di salute orale di bambini affetti da CHD con quello di bambini sani, Hallett e collaboratori hanno trovato che l'incidenza di lesioni cariose è significativamente più alta nel primo gruppo [119]. Franco e collaboratori hanno trovato un aumento significativo nel numero di denti permanenti con carie non trattata in bambini affetti da CHD [118]. Altri studi non hanno rilevato differenze tra le condizioni di salute orale di bambini rispettivamente affetti da CHD e considerati ad alto rischio di IE rispetto a soggetti sani [123, 124].

I bambini con CHD hanno livelli di carie dentaria, ipoplasia dello smalto e malattia parodontale più alti rispetto a soggetti sani [118]. Anche le lesioni cariose aperte, gli estesi depositi di placca e le diffuse aree di infiammazione gengivale rappresentano una enorme riserva di streptococchi viridanti all'interno della bocca. Questo aspetto è molto importante

nel successivo sviluppo di malattie dentali e delle condizioni di potenziale insorgenza di endocarditi batteriche dal gruppo *Viridans streptococci* [120].

I difetti di sviluppo dello smalto che spesso si osservano nei pazienti con CHD, rappresentano un fattore di rischio per l'insorgenza della carie. Inoltre, la somministrazione cronica di farmaci contenenti saccarosio può aumentare l'incidenza di carie e gengiviti nei bambini [119, 120].

5.1 Ruolo di *Streptococcus mutans*

Nonostante siano 200-300 le specie batteriche associate con la placca dentale, solo *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* sono correlati in modo consistente alla formazione della carie dentale nell'uomo [125-127]. Inoltre, queste specie sono occasionalmente associate ad infezioni non orali, come IE [128, 129].

Il potenziale cariogeno di *S. mutans* è in stretta relazione con la sua capacità di aderire alla superficie dentaria in presenza di saccarosio e di formare acidi fermentando gli zuccheri introdotti con gli alimenti. La capacità di aderire e di invadere la superficie dentaria distingue *S. mutans* dagli altri streptococchi commensali non patogeni come *S. sanguis* e *S. mitior*. Ciò suggerisce che, innanzitutto, la virulenza di *S. mutans* consiste in questa interazione tra determinanti di virulenza della sua superficie e la pellicola acquisita che ricopre i denti. L'aderenza di questo microrganismo alla superficie dentaria comprende due momenti successivi ben distinti. Un primo momento di aderenza al dente, reversibile, nel quale un importante ruolo potrebbe essere svolto da fibrille superficiali (fimbrie), da antigeni proteici ad alto peso molecolare, da sostanze lectino-simili, da acido lipoteicoico, nonché dall'alto grado di idrofobicità della superficie di *S. mutans*. Il grado di idrofobicità è infatti stato visto essere inversamente proporzionale alla capacità di aderenza. Il secondo momento, invece, di aderenza irreversibile, è legato alla produzione di glucano insolubile dal saccarosio alimentare ad opera del sistema enzimatico glicosil-transferasi posseduto dal batterio. Tale glucano è il mediatore dell'aderenza per la sua capacità di aderire alle superfici dure, compresa quella dentaria. L'importanza del saccarosio deriva anche dall'essere il solo substrato sul quale sia attivo il sistema enzimatico glicosil-transferasi. La produzione di acidi, in particolare acido lattico, è un fattore di virulenza molto importante di *S. mutans*. Lo

stabilirsi di questo batterio sulla superficie dentaria porta alla moltiplicazione dei batteri e ad un'elevata concentrazione di acidi nel sito di aderenza. Il saccarosio, infatti, viene degradato a glucosio e fruttosio ad opera di enzimi batterici e, a loro volta, questi vengono fermentati dai batteri della placca dentaria producendo così un ambiente particolarmente acido. Gli acidi prodotti diffondono molto lentamente all'esterno della placca e, man mano che questo avviene, il pH della placca ritorna lentamente alla normalità. La tipica risposta che si osserva nella placca dentaria in seguito alla presenza di zucchero è mostrata in Fig. 9. L'abbassamento del pH determinato dai germi della placca batterica è sufficiente a portare in soluzione il fosfato di calcio cioè a decalcificare lo smalto e/o la dentina realizzando così il primo passo verso lo sviluppo del processo carioso. Inoltre, l'eccessivo e continuato apporto di zucchero con la dieta consente tanto a *S. mutans* quanto ad altri batteri orali di sintetizzare intracellularmente polisaccaridi glicogeno-simili che vengono utilizzati dai batteri medesimi per produrre acidi quando l'apporto zuccherino esterno è limitato.

Alcuni studi su popolazioni infantili hanno stabilito che bambini con carie attive ospitano maggiori quantità di *S. mutans* rispetto ai gruppi di controllo senza carie e che i denti destinati a cariarsi presentano un aumento statisticamente significativo del microrganismo entro i due anni precedenti la successiva diagnosi clinica di carie. Ciò significa che lo sviluppo del processo carioso a carico di un determinato dente deve essere preceduto da un'infezione dello stesso dente con *S. mutans*. Anche i lattobacilli sono significativamente aumentati nelle lesioni cariose, ma essi vanno considerati come "invasori secondari" giacché si è visto che, di per sé, non sono capaci di produrre carie. I lattobacilli trovano condizioni favorevoli al loro sviluppo nell'ambiente a basso pH creato da *S. mutans* e, sviluppandosi, contribuiscono alla progressione del processo carioso.

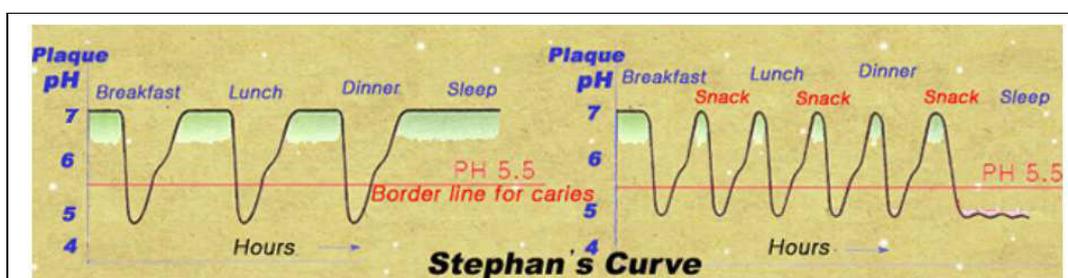


Fig. 9. Modificazione del pH della placca batterica in seguito alla presenza di saccarosio, fermentabile dai batteri presenti nella placca stessa

Alcuni studi in letteratura hanno applicato diverse metodiche per l'identificazione di *S. mutans* [130-132]: alcuni di questi sono sistemi di rilevazione in biologia molecolare che forniscono informazioni sulla presenza di regioni specifiche del genoma di *S. mutans* [133, 134]. Le più recenti metodiche forniscono informazioni quantitative al fine di monitorare la proporzione di batteri cariogeni nel campione orale, come la saliva o la placca [135]. Le più avanzate tecnologie in biologia molecolare hanno sviluppato delle strategie di analisi che consentano anche di determinare la presenza e quantità di DNA relativo solo ai batteri vitali [136]. Ciononostante i dati di letteratura sulla presenza e carica di *S. mutans* nei campioni salivari di soggetti affetti da CHD sono prevalentemente ottenuti mediante tecniche colturali. I terreni di coltura disponibili per la coltura ottimale di *S. mutans* sono diversi e ancora oggi non c'è un consenso su quale di questi sia il migliore per la coltura e conta di questo microorganismo. Il primo ad essere stato sviluppato è il terreno Mitis-salivarius-agar, il quale permette la crescita degli streptococchi in generale. Su questo terreno l'aspetto morfologico delle colonie di *S. mutans* è peculiare e ne permette l'identificazione [137-140]. E' tuttavia necessario procedere a numerose diluizioni seriali per ridurre il numero di altri streptococchi ed enterococchi che interferiscono con la crescita di *S. mutans* [137, 139, 141-144]. Nonostante la disponibilità di altri terreni maggiormente selettivi per *S. mutans*, il terreno Mitis-salivarius-agar è considerato come il terreno di riferimento per valutare la performance di altri terreni [145]

5.2 Indici e metodi di valutazione dello stato di salute orale

Gli indici e i metodi di valutazione utilizzati nell'attività clinica servono a determinare e registrare lo stato di salute dell'individuo.

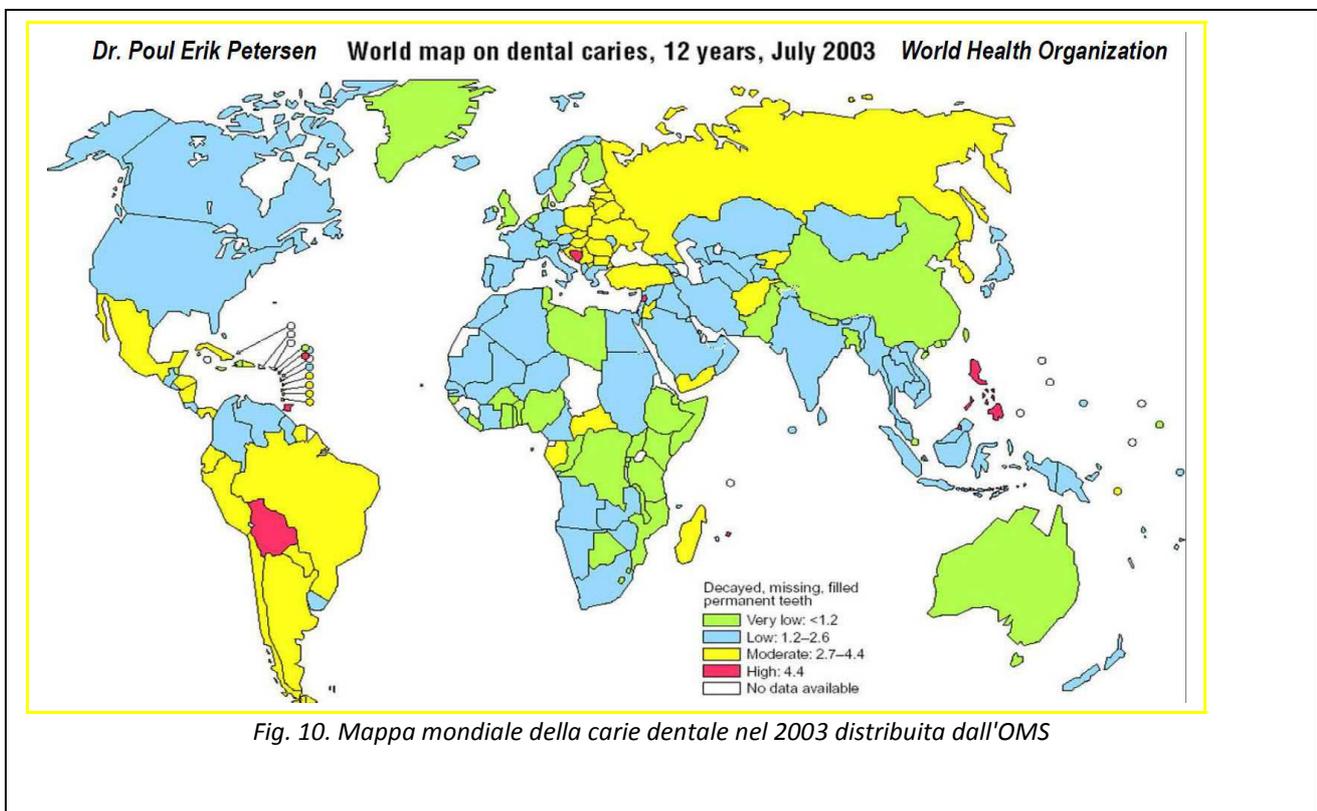
Per quantificare la diffusione della carie a livello internazionale l'indicatore epidemiologico raccomandato e più utilizzato è il cosiddetto DMFT (Decayed, Missing, Filled Teeth). Esso viene determinato conteggiando il numero di elementi permanenti cariati, ricostruiti (con otturazioni o protesicamente) o estratti in un paziente: esprime pertanto la storia di carie di un individuo. Se riferito alla dentizione decidua viene identificato da lettere minuscole (dmft);

nella dentatura permanente è generalmente valutato escludendo i terzi molari, cioè su 28 elementi.

L'OMS ha suggerito di eseguire gli studi epidemiologici utilizzando il DMFT in soggetti di determinate fasce di età, allo scopo di facilitare il confronto dei dati:

- 5/6 anni: per evidenziare lo stato di salute della dentizione decidua
- 12 anni: generalmente coincide con il termine della scuola dell'obbligo, ultima età utile per ottenere campioni rappresentativi attraverso il sistema scolastico. In questa fase è probabile che tutti gli elementi permanenti siano erotti (escluso i terzi molari)
- 15 anni: gli elementi permanenti sono rimasti esposti all'ambiente orale per tre - quattro anni, perciò la valutazione della diffusione della carie risulta più significativa. E' inoltre possibile monitorare la salute parodontale nell'adolescenza
- 35 - 44 anni: per valutare la condizione parodontale
- >65 anni

I dati degli studi epidemiologici sulla carie dentale raccomandati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità ad oggi disponibili forniscono una rappresentazione globale del problema, rappresentato nella Fig. 10.



Nell'anno 2010 l'OMS ha definito i seguenti obiettivi mondiali per la prevenzione della salute orale (Tab. 4):

Tab.4. Obiettivi della prevenzione della salute orale definiti da OMS nel 2010

Soggetti	Obiettivi
Età 5-6 anni	90% esenti da carie
Età 12 anni	DMFT < 1
Età 18 anni	Nessuna perdita di denti dovuta a carie o malattia parodontale

6. Materiali e metodi

6.1 Soggetti: pazienti e controlli

Questo studio osservazionale caso-controllo è stato condotto su una popolazione di 39 pazienti affetti da cardiopatia congenita e di età compresa tra i 6 ed i 18 anni in cura presso il servizio di Assistenza Odontoiatrica per Disabili del dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie – DIBINEM – dell'Università di Bologna o presso il Reparto di Cardiologia Pediatrica e dell'età Evolutiva – del Dipartimento Cardio-Toraco-Vascolare dell'Azienda Ospedaliera-Universitaria Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna. Nel gruppo di controllo sono stati arruolati 39 soggetti sani, con anamnesi medica negativa per CHD, omogenei per età e sesso. I genitori dei pazienti e dei soggetti del gruppo di controllo sono stati informati in modo dettagliato sulle indagini da effettuare e hanno sottoscritto un consenso informato nel rispetto della privacy secondo il D.lgs 196/03 e sue successive modifiche.

Ai genitori è stato somministrato un questionario (Fig. 11-12) per raccogliere i dati demografici, anamnestici, relativi alle abitudini di igiene orale domiciliare e alimentare dei pazienti. Inoltre, nel questionario sono state inserite alcune domande per rilevare l'impatto emotivo che la patologia dei figli ha sui genitori anche in relazione alle condizioni socio-economiche del nucleo familiare.

Fig. 11. Questionario sottoposto ai soggetti/genitori del gruppo di studio

ID paziente	Età: _____ Sesso: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
Tipologia località di residenza	<input type="checkbox"/> area urbana <input type="checkbox"/> area periferica <input type="checkbox"/> area rurale
Numero componenti famiglia	<input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> >4
Professione madre	
Titolo di studio della madre	<input type="checkbox"/> licenza elementare <input type="checkbox"/> licenza media <input type="checkbox"/> diploma di scuola superiore <input type="checkbox"/> laurea
Professione padre	
Titolo di studio del padre	<input type="checkbox"/> licenza elementare <input type="checkbox"/> licenza media <input type="checkbox"/> diploma di scuola superiore <input type="checkbox"/> laurea
Anamnesi medica generale	
Interventi chirurgici associati alla patologia di base	
Assume farmaci?	<input type="checkbox"/> SI, quali? _____ <input type="checkbox"/> NO
Necessita di profilassi antibiotica?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Ha ricevuto istruzioni di igiene orale domiciliare da personale sanitario (pediatra, infermieri, odontoiatra, igienista dentale)?	<input type="checkbox"/> SI, da chi? _____ <input type="checkbox"/> NO
Quante volte si reca dal dentista in un anno?	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2-3 <input type="checkbox"/> >4
Quante volte si spazzola i denti in un giorno?	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
Quanto tempo dedica alla pulizia dei denti?	<input type="checkbox"/> meno di un minuto <input type="checkbox"/> 1-2 minuti <input type="checkbox"/> >2 minuti
A che età ha iniziato a spazzolare i denti?	
Per l'igiene orale utilizza	<input type="checkbox"/> spazzolino elettrico <input type="checkbox"/> spazzolino manuale <input type="checkbox"/> entrambi <input type="checkbox"/> dentifricio <input type="checkbox"/> filo interdentale <input type="checkbox"/> collutorio <input type="checkbox"/> garzina di cotone <input type="checkbox"/> scovolino
Quando si lava i denti lo fa	<input type="checkbox"/> autonomamente

	<input type="checkbox"/> autonomamente, ma con vigilanza di un genitore <input type="checkbox"/> con l'aiuto di un genitore
Le sue gengive sanguinano?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> qualche volta
Spazzola la lingua?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> qualche volta
Esegue sedute di fluoroprofilassi topica (gel/vernici)?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Ha eseguito sedute di fluoroprofilassi sistemica (gocce/pastiglie)?	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI, con quale dosaggio? _____ Da quanto tempo? _____
Quanti pasti fa in un giorno (escluse le merende)?	<input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> >5
Fa spuntini fuori pasto?	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI, dolci? <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Quante volte assume cibi zuccherati nell'arco di una giornata?	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> >3
Quale, tra questi alimenti zuccherini, consuma più frequentemente?	<input type="checkbox"/> succo di frutta <input type="checkbox"/> merendine <input type="checkbox"/> altro _____
Ha mai fatto terapia ortodontica?	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI, mobile? <input type="checkbox"/> fissa? <input type="checkbox"/>
Aveva l'abitudine di addormentarsi con il biberon contenente sostanze zuccherate (camomilla, tisane..)?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Per i genitori:	
E' a conoscenza del fatto che il mantenimento di un'ottima igiene orale riduce l'incidenza di batteriemie associate ad attività quotidiane (come spazzolamento etc..) e di batteriemie associate a procedure odontoiatriche invasive, riducendo pertanto il rischio di endocardite batterica?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Lo stato di salute di suo figlio è per lei motivo di ansia?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Secondo lei la salute orale può influenzare lo stato di salute generale?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Accompagnare suo figlio dal dentista è per lei motivo di ansia?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO

Fig. 12. Questionario somministrato al gruppo di controllo

ID paziente	Età: _____ Sesso: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F
Tipologia località di residenza	<input type="checkbox"/> area urbana <input type="checkbox"/> area periferica <input type="checkbox"/> area rurale
Numero componenti famiglia	<input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> >4
Professione madre	
Titolo di studio della madre	<input type="checkbox"/> licenza elementare <input type="checkbox"/> licenza media <input type="checkbox"/> diploma di scuola superiore <input type="checkbox"/> laurea
Professione padre	
Titolo di studio del padre	<input type="checkbox"/> licenza elementare <input type="checkbox"/> licenza media <input type="checkbox"/> diploma di scuola superiore <input type="checkbox"/> laurea
Anamnesi medica generale	
Assume farmaci?	<input type="checkbox"/> SI, quali? _____ <input type="checkbox"/> NO
Ha ricevuto istruzioni di igiene orale domiciliare da personale sanitario (pediatra, infermieri, odontoiatra, igienista dentale)?	<input type="checkbox"/> SI, da chi? _____ <input type="checkbox"/> NO
Quante volte si reca dal dentista in un anno?	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2-3 <input type="checkbox"/> >4
Quante volte si spazzola i denti in un giorno?	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4
Quanto tempo dedica alla pulizia dei denti?	<input type="checkbox"/> meno di un minuto <input type="checkbox"/> 1-2 minuti <input type="checkbox"/> >2 minuti
A che età ha iniziato a spazzolare i denti?	
Per l'igiene orale utilizza	<input type="checkbox"/> spazzolino elettrico <input type="checkbox"/> spazzolino manuale <input type="checkbox"/> entrambi <input type="checkbox"/> dentifricio <input type="checkbox"/> filo interdentale <input type="checkbox"/> collutorio <input type="checkbox"/> garzina di cotone <input type="checkbox"/> scovolino
Quando si lava i denti lo fa	<input type="checkbox"/> autonomamente <input type="checkbox"/> autonomamente, ma con vigilanza di un genitore

	<input type="checkbox"/> con l'aiuto di un genitore
Le sue gengive sanguinano?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> qualche volta
Spazzola la lingua?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> qualche volta
Esegue sedute di fluoroprofilassi topica (gel/vernici)?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Ha eseguito sedute di fluoroprofilassi sistemica (gocce/pastiglie)?	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI, con quale dosaggio? _____ Da quanto tempo? _____
Quanti pasti fa in un giorno (escluse le merende)?	<input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/> >5
Fa spuntini fuori pasto?	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI, dolci? <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Quante volte assume cibi zuccherati nell'arco di una giornata?	<input type="checkbox"/> 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> >3
Quale, tra questi alimenti zuccherini, consuma più frequentemente?	<input type="checkbox"/> succo di frutta <input type="checkbox"/> merendine <input type="checkbox"/> altro _____
Ha mai fatto terapia ortodontica?	<input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> SI, mobile? <input type="checkbox"/> fissa? <input type="checkbox"/>
Aveva l'abitudine di addormentarsi con il biberon contenente sostanze zuccherate (camomilla, tisane..)?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Per i genitori:	
Lo stato di salute di suo figlio è per lei motivo di ansia?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Secondo lei la salute orale può influenzare lo stato di salute generale?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Accompagnare suo figlio dal dentista è per lei motivo di ansia?	<input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO

6.2 Esame clinico

Tutti i pazienti e i soggetti del gruppo controllo sono stati valutati clinicamente mediante l'impiego di uno specchietto, una sonda parodontale, luce artificiale adeguata ed una siringa

ad aria compressa. In ogni paziente sono stati rilevati i parametri designati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità.

- *Indice di placca di Silness e Loe* del 1967 (PLI) [146]: è utilizzato per valutare la quantità di depositi molli, infatti valuta lo spessore dello strato dei detriti presente al margine gengivale e in genere viene usato insieme all'indice gengivale. Vengono esaminate visivamente le quattro aree (distale, mesiale, linguale, vestibolare) di ogni dente utilizzando uno specchietto, lo specillo e asciugando con aria. A ciascuna area viene assegnato un punteggio compreso tra 0 e 3 secondo i criteri riassunti nella Tab. 5.

Tab. 5. Criteri per definire i punteggi dell'indice di placca

0	Nessuna placca nell'area gengivale
1	Pellicola di placca aderente al margine gengivale e all'area adiacente; placca osservabile solo facendo scorrere la sonda lungo la superficie dentale
2	Moderato accumulo di depositi molli all'interno del margine gengivale e/o sulle superfici adiacenti visibile a occhio nudo
3	Abbondanza di materiale soffice all'interno delle tasche gengivali e sulle superfici dei denti

Per ogni paziente è il PLI è stato calcolato sommando tutti i valori di PLI ottenuti per ciascun dente e dividendo per il numero di denti. Questo indice è stato confrontato con i seguenti parametri di riferimento per ottenere la valutazione dello stato di salute orale (Tab.6).

Tab.6 Corrispondenza tra punteggio di riferimento e Valutazione dello stato di salute orale

Punteggio di riferimento	Valutazione
0	Eccellente
0.1-0.9	Buono
1.0-1.9	Sufficiente
2.0-3.0	Insufficiente

- *Indice gengivale* di Löe (GI): trova applicazione nella valutazione del grado di infiammazione gengivale e della sua localizzazione. Per valutare il potenziale sanguinamento si utilizza una sonda parodontale. Un valore da 0 a 3 è assegnato per i quattro siti: superficie mesiale, distale, vestibolare e linguale/palatino di ciascun dente. Sommando tutti i valori riferiti ad ogni dente si ottiene il valore GI per area; dividendo per 4 tale somma si determina il valore per dente. Sommando tutti i valori

e dividendo per il numero dei denti esaminati si ottiene l'indice GI per individuo. Il criterio di valutazione prevede che si assegnino i seguenti punteggi a ciascun sito (Tab. 7):

Tab. 7. Criteri per definire i punteggi dell'indice gengivale

0	Gengiva normale
1	Infiammazione leggera: lieve modifica di colore, leggero edema, nessun sanguinamento al sondaggio
2	Infiammazione moderata: rossore, edema, sanguinamento al sondaggio
3	Colore rosso acceso, marcato edema, ulcerazione, tendenza al sanguinamento spontaneo applicando pressione esternamente sul tessuto gengivale con la sonda

Interpretazione del risultato ottenuto per ciascun paziente (Tab. 8):

Tab. 8. Corrispondenza tra punteggio di riferimento e Valutazione dello stato di salute gengivale

Punteggio di riferimento	Descrizione	Stato di salute gengivale
0	Nessuna gengivite	Eccellente
0.1-1.0	Gengivite lieve	Buono
1.1-2.0	Gengivite moderata	Sufficiente
2.1-3.0	Gengivite grave	Insufficiente

- *Indici di patologia cariosa DMFT/dmft*: per quantificare la diffusione della carica a livello internazionale l'indicatore epidemiologico raccomandato e più utilizzato è il cosiddetto DMFT (Decayed, Missing, Filled Teeth). Esso viene determinato conteggiando il numero di elementi permanenti cariati, ricostruiti (con otturazioni o protesicamente) o estratti in un paziente: esprime pertanto la storia di carie di un individuo. E' generalmente valutato escludendo i terzi molari, cioè su 28 elementi. Se riferito alla dentizione decidua, viene indicato da lettere minuscole (dmft) e si basa su un massimo di 12 denti poiché considera solo i molari ed i canini decidui. Ogni dente è stato esaminato e registrato una sola volta utilizzando una scala dicotomica (presente o assente) secondo le seguenti indicazioni (Tab. 9a, Tab. 9b):

Tab. 9a. Criteri per definire l'indice DMFT nella dentatura permanente

VALUTAZIONE DMF	DESCRIZIONE
Cariati (D)	Presenza di carie dentale visibile
Mancanti (M)	Dente estratto per carie dentale
Otturati (F)	Presenza di qualsiasi ricostruzione permanente o temporanea

Tab. 9b. Criteri per definire l'indice dmft nella dentatura decidua

VALUTAZIONE dmf	DESCRIZIONE
Cariati (d)	Molari decidui e canini cariati
Mancanti (m)	Molari decidui e canini mancanti
Otturati (f)	Molari e canini decidui con ricostruzioni ma senza carie

- *Sigillature dei solchi*: per ciascun paziente è stato registrato il numero di sigillature preventive di solchi e fossette dei denti molari e premolari permanenti e di fori ciechi dei denti permanenti.

6.3 Esame microbiologico

Da 34 pazienti e 33 soggetti di controllo è stato raccolto un campione di almeno 150 µl di saliva per l'esame microbiologico. La colonizzazione batterica è stata valutata mediante metodica colturale di diluizioni seriali della saliva per valutare la carica microbica aerobia totale e l'eventuale presenza e carica di *Streptococcus mutans*. Appena raccolti in una provetta sterile, i campioni sono stati consegnati al laboratorio di Microbiologia dell'azienda ospedaliera-Universitaria Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna per l'esame colturale. I campioni sono stati diluiti in soluzione fisiologica per ottenere diluizioni scalari 40-, 800- e 8000 volte la concentrazione di partenza. Aliquote di 50 µl di ciascuna diluizione e del campione originale sono state seminate su 2 diversi terreni di coltura: terreno a base di agar sangue di cavallo (AS, Vacutest Kima, Padova, Italia) per la valutazione della carica microbica vitale e sul terreno selettivo Mitis Salivarius Agar (MSB, Becton Dickinson, USA) per la coltura di *Streptococcus mutans*. Tutte le piastre sono state incubate in atmosfera aerobia con 5% di CO₂ a 37°C per 48 h per valutare visivamente la presenza di unità formanti colonia (CFU) [147].

6.4 Analisi statistica dei dati

Il test t (di Student) per campioni indipendenti è stato usato per confrontare le medie dei denti cariati, mancanti e otturati sia per la dentatura decidua che per quella permanente dei due gruppi esaminati. Lo stesso test è stato usato per confrontare la media degli indici di placca e gengivale nei due gruppi così come la carica batterica vitale media dei soggetti affetti da CHD e quelli di controllo. Il test χ^2 è stato usato per comparare le percentuali degli

indici di cura e la proporzione di soggetti con carie non trattata tra i due gruppi studiati. Il livello di significatività è stato posto al 5%.

7. RISULTATI

Le caratteristiche cliniche e demografiche dei 39 pazienti cardiopatici del gruppo di studio e dei 39 pazienti del gruppo controllo sono riportate in Tab. 10.

Tab. 10. Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti affetti da CHD e del gruppo di controllo

Caratteristiche	Gruppo CHD (N=39)	Gruppo controllo (N=39)
N. femmine	23	21
Età (media \pm SD)	12 \pm 4	11 \pm 3.95
Numero controlli odontoiatrici/anno		
N=0	3	1
N=1	10	11
N=2-3	12	13
N= \geq 4	14	14
N. soggetti che hanno ricevuto istruzioni di igiene orale da operatori sanitari	26	30
Età media d'inizio spazzolamento (range)	3.3 (2-7)	2.9 (0.5-9)
Frequenza giornaliera di spazzolamento		
N=1	7	2
N=2	22	27
N=3	10	10
Autonomia nello spazzolamento dei denti	27	26
N. soggetti con sanguinamento gengivale	20	19
N. soggetti che hanno assunto fluoro sistemico	7	8
N. soggetti in terapia ortodontica	16	16
Stato di salute gengivale (IG)		
Eccellente	6	17
Buono	19	16
Sufficiente	7	6
Insufficiente	7	0
Controllo della placca batterica (IP)		
Eccellente	6	12
Buono	11	10
Sufficiente	13	14
Insufficiente	9	3

CHD: cardiopatia congenita; SD: deviazione standard; IG: indice gengivale; IP: indice di placca

Il range di età dei soggetti arruolati nello studio è 6-18 anni e l'età media del gruppo dei

pazienti affetti da CHD e dei soggetti del gruppo di controllo è 12 ± 4 e 11 ± 3.95 rispettivamente. I due gruppi di studio sono omogenei per età e sesso.

In 33 soggetti del gruppo di studio i dati raccolti dal questionario hanno permesso di valutare la tipologia di patologia cardiaca congenita e di distinguere affezioni cianogene e non cianogene (Tab. 11). I 16 soggetti con CHD cianogena sono stati tutti sottoposti ad almeno un intervento cardio-chirurgico e 13 di questi sono ad alto rischio di IE per cui necessitano di profilassi antibiotica. Dei 17 pazienti con CHD non cianogena, 11 hanno subito almeno un intervento cardio-chirurgico e 13 si sono sottoposti a profilassi antimicrobica per IE. Per 6 pazienti cardiopatici non è stato possibile definire il tipo di cardiopatia, ma i genitori che hanno compilato il questionario hanno documentato che nessuno di questi ha mai subito un intervento cardio-chirurgico e che tutti hanno fatto una profilassi antibiotica per il rischio di IE.

Tab. 11. Caratteristiche cliniche dei pazienti affetti da CHD

Tipologia CHD	N. soggetti affetti	N. soggetti sottoposti a profilassi antibiotica per IE	N. soggetti sottoposti a interventi cardio-chirurgici
CHD cianogena	16	13	16
CHD acianogena	17	13	11
CHD non specificata	6	6	0

CHD: cardiopatia congenita; IE: endocardite infettiva

Per confrontare la formazione della carie dentale nei soggetti sani e nei pazienti affetti da CHD, i due gruppi sono stati divisi in due sottogruppi con range di età 6-11 e 12-18 rispettivamente e su entrambi i sono stati valutati i denti cariati, mancanti e otturati. In Tab. 12 sono mostrati i risultati di questa valutazione sulla dentatura decidua nei soggetti di età compresa nel range 6-11 anni. I bambini affetti da CHD hanno mediamente più denti decidui cariati (2.64 ± 3.17) rispetto al gruppo di controllo (0.42 ± 1.43) ($p < 0.05$). Si può osservare, inoltre, che i bambini affetti da CHD hanno una media di denti decidui mancanti più alta rispetto al gruppo controllo, ma questa differenza non è statisticamente significativa. La significativa differenza tra i due gruppi in merito alla media dei denti cariati si osserva anche nell'indice globale dmft, la cui media risulta statisticamente più alta nei soggetti con CHD rispetto ai soggetti sani (3.71 ± 2.78 vs 1.09 ± 2.12 rispettivamente).

Tab. 12 Valori di età, salute orale e dmft (dentatura decidua) per bambini affetti da CHD e bambini sani

	Gruppo CHD (N=14)	Gruppo controllo (N=21)	p-value
Range di età	6-11	6-11	
Età media ± SD	7.92 ± 1.54	7.90 ± 1.73	ns
dt medio ± SD	2.64 ± 3.17	0.42 ± 1.43	0.0083*
mt medio ± SD	0.50 ± 1.09	0.05 ± 0.22	ns
ft medio ± SD	0.57 ± 1.02	0.62 ± 1.46	ns
dmft medio ± SD	3.71 ± 2.78	1.09 ± 2.12	0.0034*

* statisticamente significativo; ns: non significativo statisticamente

CHD: cardiopatia congenita; SD: deviazione standard; dt: numero di denti decidui cariati; mt: numero di denti decidui mancanti; ft: numero di denti decidui otturati.

I risultati ottenuti sulla dentatura permanente dei soggetti cardiopatici e sani dai 12 ai 18 anni sono riportati in Tab. 13. La media dei denti cariati (0.67 ± 1.39) ed estratti per carie (0.29 ± 0.90) è maggiore nel gruppo dei bambini cardiopatici, mentre i bambini nel gruppo di controllo mostrano una media di denti permanenti otturati maggiore al gruppo dei soggetti affetti da CHD (1.33 ± 1.71 vs 0.75 ± 1.33 rispettivamente); entrambe queste differenze non sono statisticamente significative. Le condizioni della dentatura permanente nei due gruppi in relazione alla carie non mostrano differenze significative.

Tab. 13. Valori di età, salute orale e DMFT (dentatura permanente) per soggetti affetti da CHD e soggetti sani

	Gruppo CHD (N=21)	Gruppo controllo (N=18)	p-value
Range di età	12-18	12-18	
Età media ± SD	14.67 ± 2.10	14.94 ± 2.01	ns
DT medio ± SD	0.67 ± 1.39	0.28 ± 0.57	ns
MT medio ± SD	0.29 ± 0.90	0 ± 0	ns
FT medio ± SD	0.75 ± 1.33	1.33 ± 1.71	ns
DMFT medio ± SD	1.67 ± 2.03	1.61 ± 1.79	ns

ns: non significativo statisticamente

CHD: cardiopatia congenita; SD: deviazione standard; DT: numero di denti permanenti cariati; MT: numero di denti permanenti mancanti; FT: numero di denti permanenti otturati.

La proporzione (ft medio/dmft medio) e (FT medio/DMFT medio), espressa come percentuale, rappresenta l'indice di cura per la dentatura decidua e permanente rispettivamente. L'indice di cura per la dentatura decidua è risultato essere del 15% nel gruppo dei bambini cardiopatici e del 56% nel gruppo di controllo ($p < 0,05$). Per la dentatura permanente si osservano percentuali di cura più alte: 45% nel gruppo cardiopatici e 83% nel gruppo controllo ($p < 0,05$). Le carie non trattate nella dentatura decidua ($dt > 0$) sono state osservate nel 44% dei bambini cardiopatici e nel 7,7% dei bambini di controllo ($P < 0,05$). Lo

stesso livello di carie non trattate nella dentatura definitiva (DT>0) sono state osservate nel gruppo di studio e quello di controllo (21% e 23% rispettivamente).

In entrambi i gruppi studiati si osserva che il 46% dei soggetti ha almeno un dente sigillato.

Tutti i pazienti cardiopatici arruolati in questo studio spazzola i denti almeno una volta al giorno, il 56% e il 26% di questi spazzola i denti due e tre volte al giorno rispettivamente. I soggetti del gruppo controllo spazzolano i denti almeno una volta al giorno, ma il 69% e il 26% di questi ripetono l'operazione una seconda e una terza volta rispettivamente. La supervisione o l'aiuto da parte dei genitori durante l'igiene orale domestica è stata osservata nel 31% dei soggetti cardiopatici e nel 33% dei soggetti del gruppo di controllo. Ai genitori dei soggetti cardiopatici è stato chiesto di riferire se conoscessero la correlazione tra condizioni di igiene orale e il rischio di endocardite infettiva e il 70% di questi ha affermato di esserne consapevole.

Per 34 soggetti del gruppo CHD (87%) e 33 soggetti del gruppo di controllo (85%) è stato possibile raccogliere un campione salivare per la valutazione della carica microbica aerobica. In Tab. 14 sono riportati i valori medi dei principali indici misurati: IG, IP, dmft e DMFT e la carica microbica media dei due gruppi di studio. Considerando IG e IP per i 34 soggetti con CHD e i 33 soggetti del gruppo controllo si osserva che i primi hanno degli indici mediamente più alti rispetto al gruppo di controllo. Queste differenze sono statisticamente significative. La carica microbica media nei due gruppi non è significativamente diversa.

Dividendo i due gruppi per fasce di età, si osserva che IG e IP nel gruppo CHD sono significativamente più alti rispetto al gruppo controllo solo nella fascia di età 6-11 anni. Inoltre, in questa fascia di età la valutazione dell'indice dmft non mostra differenze significative tra i due gruppi. La carica microbica nella fascia d'età 6-11 anni non è diversa tra i due gruppi.

Nella fascia d'età 12-18 anni non si osservano differenze statisticamente significative tra i due gruppi in merito agli indici IG, IP, DMFT e alla carica microbica media.

La presenza di *S.mutans* è stata accertata solo in due pazienti cardiopatici e un soggetto sano.

Tab. 14. Valori medi di IG, IP, dmft, DMFT e carica microbica totale nel gruppo dei soggetti affetti da CHD e nei soggetti sani per i quali è stato possibile raccogliere un campione salivare.

	6-18 anni			6-11 anni			12-18 anni		
	CHD (N=34)	Contr. (N=33)	p- value	CHD (N=16)	Contr. (N=17)	p- value	CHD (N=18)	Contr. (N=16)	p- value
IG (media ± SD)	1.19 ± 1.01	0.61 ± 0.65	0.008*	1.39 ± 0.87	0.62 ± 0.68	0.008*	0.87 ± 1.04	0.56 ± 0.61	ns
IP (media ± SD)	1.18 ± 1.81	0.73 ± 0.72	0.019*	1.30 ± 0.76	0.64 ± 0.86	0.028*	1.05 ± 0.80	0.78 ± 0.50	ns
dmft (media ± SD)	-	-	-	3.00 ± 2.26 ^a	1.23 ± 2.30	ns	-	-	-
DMFT (media ± SD)	-	-	-	-	-	-	1.50 ± 2.90	1.81 ± 1.80	ns
Carica microbica (media ± SD) (*10 ⁵ cfu/ml)	609 ± 723	642 ± 812	ns	785 ± 892	727 ± 977	ns	474 ± 470	525 ± 492	ns

* statisticamente significativo; ns: non significativo statisticamente; ^a N=12

CHD: cardiopatia congenita; IG: indice gengivale; IP: indice di placca; dmft: numero dei denti decidui cariati, mancanti e otturati; DMFT: numero dei denti permanenti cariati, mancanti e otturati; SD: deviazione standard; cfu/ml: unità formanti colonia/ml.

8. DISCUSSIONE

Il presente studio è stato condotto su un gruppo di pazienti cardiopatici di età compresa tra i 6-18 anni per valutare lo stato di salute orale in confronto ad un gruppo omogeneo di soggetti non affetti da cardiopatia congenita. La valutazione è stata condotta sulla base di valutazioni cliniche e microbiologiche e sulla base di informazioni emerse da un questionario sottoposto ai genitori dei soggetti reclutati.

L'indice che meglio descrive lo stato di salute orale in relazione alla patologia cariosa è l'indice dmft per la dentatura decidua, DMFT per la dentatura permanente. Questo indice definisce il numero di denti coinvolti nella patologia cariosa ed in particolare indica il numero di denti decidui o permanenti cariati, estratti per carie e otturati. L'indice dmft/DMFT è ampiamente utilizzato e numerosi studi in letteratura, sulla base delle raccomandazioni OMS, lo applicano per descrivere lo stato di salute orale. Alcuni di questi non riconoscono alcuna differenza negli indici dmft/DMFT tra bambini cardiopatici e bambini sani [118, 148].

Nel presente studio l'indice dmft è stato valutato nel gruppo di soggetti di studio e di controllo di età inferiore ai 12 anni, mentre l'indice DMFT è stato valutato per i soggetti di età superiore ai 12 anni. Nei bambini di età compresa tra i 6-11 anni l'indice dmft ha mostrato delle differenze statisticamente significative tra i pazienti con CHD e i soggetti di controllo. In particolare il numero medio di denti decidui cariati risulta più alto nei bambini cardiopatici.

La differenza osservata per la dentatura decidua non si evidenzia per la dentatura permanente. Questo dato è supportato anche da altri studi eseguiti sui pazienti con cardiopatia congenita [119, 120, 149]. Probabilmente i bambini con CHD potrebbero avere maggiori problemi di carie nella dentatura decidua a causa delle difficoltà che affrontano nel primo anno di vita a causa della loro malattia e del prolungato trattamento con digossina. Inoltre, alcuni autori ipotizzano la presenza di numerosi fattori predisponenti, come l'aumentata suscettibilità alla carie dei denti affetti da difetti dello smalto, la somministrazione giornaliera di farmaci dolcificati, e la più frequente esposizione di questi bambini a cibi dolci [118, 119, 150]. Urquhart e collaboratori suggeriscono che le differenze osservate possano essere legate alle condizioni sociali dei bambini e alla frequenza e durata dell'ospedalizzazione [149].

L'indice di cura è risultato molto diverso sia per la dentatura decidua che per quella permanente in entrambi i gruppi di studio. I soggetti cardiopatici mostrano un valore medio di denti otturati sulla media dei denti coinvolti nella patologia cariosa inferiore al gruppo di controllo. Questi bassi livelli di cura, così come il numero medio di denti mancanti tendenzialmente più alto e la più alta prevalenza di carie non trattata nei denti decidui del gruppo dei bambini cardiopatici, riflettono probabilmente la tendenza dei dentisti di preferire l'estrazione e non la cura dei denti cariati nei soggetti cardiopatici [148, 151]. Questo dato suggerisce inoltre che questi denti potrebbero essere trattati tardivamente, esponendo bambini cardiopatici al rischio di batteriemia da batteri del cavo orale. È da segnalare che la frequente estrazione dei denti cariati espone i soggetti cardiopatici anche a problemi di tipo ortodontico [148].

In entrambi i gruppi studiati si osserva che il 46% dei soggetti ha almeno un dente sigillato. Questo dato è in contrasto con quello di altri due studi, dove la percentuale di sigillature dei solchi è più bassa tra i soggetti cardiopatici [124, 148]. Nel gruppo dei cardiopatici le sigillature sono più frequenti nella fascia d'età 12-18 anni, quindi la prevenzione della malattia cariosa è maggiormente attuata sulla dentatura permanente.

La totalità dei pazienti cardiopatici arruolati in questo studio spazzola i denti almeno una volta al giorno, ma si deve notare che il 56% e il 26% di questi spazzola i denti due e tre volte al giorno rispettivamente. La frequenza giornaliera di un adeguato spazzolamento e la salute

dei denti e delle gengive che ne deriva contribuiscono alla salute generale del soggetto cardiopatico [152]. Alcuni studi documentano che solo una minoranza dei soggetti con CHD inclusi nella loro casistica spazzola giornalmente i denti [153, 154]. La supervisione o l'aiuto da parte dei genitori durante l'igiene orale domestica è stata osservata nel 31% dei soggetti cardiopatici e nel 33% dei soggetti del gruppo di controllo. La constatazione del fatto che i soggetti con CHD siano vigilati allo stesso modo durante l'igiene orale rispetto ai soggetti del gruppo controllo lascia intendere che i genitori siano principalmente preoccupati di sorvegliare altri aspetti della salute piuttosto che lo spazzolamento dei denti. La supervisione dei genitori nella cura dell'igiene orale è un aspetto molto importante, come sono importanti la regolarità nelle visite odontoiatriche e l'igiene professionale dei soggetti cardiopatici. Infatti la condizione di scarsa igiene orale aumenta il rischio di batteriemia di origine orale che porta ad endocardite [120]. L'accurata informazione e formazione dei genitori in merito all'importanza della salute orale e al rischio di endocardite infettiva per i loro figli cardiopatici è un aspetto molto importante. Alcuni studi dimostrano che i genitori sono consapevoli dell'importanza della buona salute orale nei bambini cardiopatici, ma non tutti hanno conoscenze sui rischi di endocardite infettiva [115, 124, 153]. Nel presente studio il 70% dei genitori dei soggetti affetti da CHD ha affermato di essere a conoscenza del rischio di IE legata allo stato di salute orale.

La valutazione microbiologia eseguita in questo studio ha avuto l'obiettivo di esaminare la carica microbica orale aerobia dei soggetti arruolati nello studio. Non è stato possibile raccogliere un campione salivare per ciascun soggetto, ma complessivamente sono stati valutati 34 pazienti con CHD e 33 soggetti di controllo. Contrariamente a quanto osservato da Rosén et al., la carica microbica totale aerobia in entrambi i gruppi studiati non mostra differenze significative [155] pur riconoscendo che lo stato di salute gengivale e il controllo della placca nei soggetti affetti da CHD è significativamente scarso. Esaminando questi dati per fasce d'età, si osserva che lo stato di salute gengivale e il controllo della placca sono entrambi significativamente scadenti tra i bambini 6-11 anni con CHD, rispetto al gruppo controllo, ma queste differenze scompaiono nella fascia d'età 12-18 anni. Considerando la carica microbica totale aerobia, il dmft e il DMFT nelle due fasce d'età non si osserva alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di studio. E' importante sottolineare

che, considerando la totalità dei pazienti arruolati, nella fascia d'età 6-11 anni i valori di dmft dei cardiopatici sono statisticamente diversi dal gruppo controllo, ma questo indice perde di significatività statistica se si considerano solo i soggetti di cui è stata raccolta la saliva per l'esame microbiologico. Si può quindi speculare che i bambini cardiopatici dai quali non si è raccolta la saliva hanno avuto un ruolo fondamentale nel determinare valori di dmft statisticamente diversi dal gruppo controllo.

In questo studio la presenza di *S. mutans* è stata rilevata solo per 3 soggetti, di cui 2 cardiopatici e 1 di controllo. Questo dato è sorprendente e in conflitto con quanto riportato da altri autori, i quali, pur non rilevando cariche statisticamente diverse tra soggetti affetti da CHD e di controllo, ne documentano la presenza in cariche alte [118, 155-158]. Uno studio italiano del 1999 ha valutato la prevalenza di *S. mutans* nella saliva di soggetti in età scolare e ha definito il tasso di prevalenza pari al 52%. Inoltre, i livelli di *S. mutans* correlano significativamente con la carie [159]. Le possibili spiegazioni per le quali *S. mutans* non sia stato rilevato nel presente studio sono diverse e tutte suggerite da pubblicazioni internazionali. Gli studi disponibili che hanno valutato la correlazione tra carie dentale e contributo infettivo di *S. mutans* sulla base della metodica colturale, hanno evidenziato delle importanti limitazioni. Innanzitutto bisogna considerare la natura selettiva del terreno di coltura, che può non favorire la crescita di alcuni microrganismi in un campione molto complesso come quello salivare [160]. Il terreno di coltura scelto in questo studio, simile a quello usato da altri [155-157], è stato sviluppato nell'interesse della ricerca sulla carie dentale ed è stato il terreno di riferimento nella coltura di *S. mutans*. Ma questo microrganismo spesso costituisce meno dell'1% del microbiota orale e potrebbe non essere rilevato su tale terreno se nel campione la carica di enterococchi e di altri streptococchi è molto alta [137, 142, 145, 161]. E' necessario eseguire numerose diluizioni seriali con la possibilità di generare risultati falsamente negativi o di sottostimarne la presenza.

Oltre alla possibile limitazione metodologica, bisogna considerare che nella cavità orale altri batteri possono esercitare un'azione inibitoria verso *S. mutans*. Questa azione è stata recentemente dimostrata in vitro: *S. salivarius* produce in abbondante quantità una sostanza chiamata FruA, capace di inibire la formazione di biofilm da *S. mutans* sulle superfici ricoperte di saliva [162]. Nel presente studio la presenza in alta carica di *S. salivarius* è stata osservata

nel 75% dei soggetti arruolati.

Va inoltre considerato che il volume e la composizione della saliva giocano un ruolo importante nell'ecosistema orale [163]. La velocità di flusso salivare è il parametro clinico più importante che condiziona la suscettibilità alla carie dentale e in pazienti con un flusso di secrezione ridotto anche la capacità tampone della saliva si riduce [155]. La funzione più importante della saliva nella difesa contro la carie è quella di neutralizzare gli acidi nella placca, diluire e/o allontanare gli acidi dalla cavità orale. Inoltre la saliva contribuisce al processo di remineralizzazione e contiene sostanze ad attività antimicrobica, come gli enzimi e gli anticorpi prevalentemente di classe IgA [164, 165]. Nel presente studio la velocità di flusso salivare e il titolo anticorpale salivare non sono stati presi in considerazione.

9. CONCLUSIONI

I dati mostrati, in accordo con quelli della letteratura, indicano che la scarsa igiene orale dei bambini con CHD può essere legata a cure domestiche e professionali non adeguate. In merito alla dentatura decidua, i soggetti cardiopatici mostrano livelli di salute gengivale e di controllo della placca scadenti e livelli di carie non trattate più alti rispetto a soggetti di controllo. Sono, dunque più facilmente esposti ad infezioni. I genitori dei soggetti cardiopatici dovrebbero avere maggiore consapevolezza dell'importanza degli interventi di prevenzione nella riduzione dell'incidenza di batteriemia legata a procedure dentali professionali, ma anche ad attività quotidiane come lo spazzolamento dei denti.

L'aumento complessivo della vulnerabilità dei bambini cardiopatici allo stress dei trattamenti è una delle principali ragioni per investire sulla prevenzione della carie [120]. Va infatti sottolineato che le carie non trattate costituiscono una controindicazione all'intervento cardiocirurgico [154].

10. Bibliografia

1. van der Velde, E.T., et al., *CONCOR, an initiative towards a national registry and DNA-bank of patients with congenital heart disease in the Netherlands: rationale, design, and first results*. Eur J Epidemiol, 2005. **20**(6): p. 549-57.
2. Hoffman, J.I. and S. Kaplan, *The incidence of congenital heart disease*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(12): p. 1890-900.
3. Hoffman, J.I., S. Kaplan, and R.R. Liberthson, *Prevalence of congenital heart disease*. Am Heart J, 2004. **147**(3): p. 425-39.
4. Knowles, R., et al., *Newborn screening for congenital heart defects: a systematic review and cost-effectiveness analysis*. Health Technol Assess, 2005. **9**(44): p. 1-152, iii-iv.
5. Wernovsky, G., A.J. Shillingford, and J.W. Gaynor, *Central nervous system outcomes in children with complex congenital heart disease*. Curr Opin Cardiol, 2005. **20**(2): p. 94-9.
6. Sadowski, S.L., *Congenital cardiac disease in the newborn infant: past, present, and future*. Crit Care Nurs Clin North Am, 2009. **21**(1): p. 37-48, vi.
7. Ferrieri, P., et al., *Unique features of infective endocarditis in childhood*. Pediatrics, 2002. **109**(5): p. 931-43.
8. Mitchell, S.C., S.B. Korones, and H.W. Berendes, *Congenital heart disease in 56,109 births. Incidence and natural history*. Circulation, 1971. **43**(3): p. 323-32.
9. Collins-Nakai, R. and P. McLaughlin, *How congenital heart disease originates in fetal life*. Cardiol Clin, 2002. **20**(3): p. 367-83, v-vi.
10. Warnes, C.A., et al., *Task force 1: the changing profile of congenital heart disease in adult life*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(5): p. 1170-5.
11. Head, C.E., et al., *Timing of presentation and postnatal outcome of infants suspected of having coarctation of the aorta during fetal life*. Heart, 2005. **91**(8): p. 1070-4.
12. Lu, C.W., et al., *Noninvasive diagnosis of aortic coarctation in neonates with patent ductus arteriosus*. J Pediatr, 2006. **148**(2): p. 217-21.
13. Rosenthal, E., *Coarctation of the aorta from fetus to adult: curable condition or life long disease process?* Heart, 2005. **91**(11): p. 1495-502.
14. Stein, P., *Total anomalous pulmonary venous connection*. Aorn J, 2007. **85**(3): p. 509-20; quiz 521-4.
15. Karamlou, T., et al., *Outcomes and associated risk factors for aortic valve replacement in 160 children: a competing-risks analysis*. Circulation, 2005. **112**(22): p. 3462-9.
16. Ahmad, U., et al., *Modified Blalock-Taussig shunt: immediate and short-term follow-up results in neonates*. Heart Lung Circ, 2008. **17**(1): p. 54-8.
17. Zannini, L. and I. Borini, *State of the art of cardiac surgery in patients with congenital heart disease*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2007. **8**(1): p. 3-6.
18. Rasiyah, S.V., et al., *Antenatal perspective of hypoplastic left heart syndrome: 5 years on*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008. **93**(3): p. F192-7.
19. Makikallio, K., et al., *Fetal aortic valve stenosis and the evolution of hypoplastic left heart syndrome: patient selection for fetal intervention*. Circulation, 2006. **113**(11): p. 1401-5.
20. Tettelin, H., et al., *Genome analysis of multiple pathogenic isolates of Streptococcus agalactiae: implications for the microbial "pan-genome"*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13950-5.
21. Green, A., S. Pye, and A.T. Yetman, *The physiologic basis for and nursing considerations in the use of subatmospheric concentrations of oxygen in HLHS*. Adv Neonatal Care, 2002. **2**(4): p. 177-86.
22. Theilen, U. and L. Shekerdemian, *The intensive care of infants with hypoplastic left heart syndrome*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2005. **90**(2): p. F97-F102.
23. Turck, C.J., et al., *Pharmacoeconomics of Surgical Interventions vs. Cyclooxygenase Inhibitors for the Treatment of Patent Ductus Arteriosus*. J Pediatr Pharmacol Ther, 2007. **12**(3): p. 183-93.
24. Moake, L. and C. Ramaciotti, *Atrial septal defect treatment options*. AACN Clin Issues, 2005. **16**(2): p. 252-66.
25. Vis, J.C., et al., *Down syndrome: a cardiovascular perspective*. J Intellect Disabil Res, 2009. **53**(5): p. 419-25.
26. Joziassse, I.C., et al., *Genes in congenital heart disease: atrioventricular valve formation*. Basic Res Cardiol, 2008. **103**(3): p. 216-27.
27. van Engelen, K., et al., *22q11.2 Deletion Syndrome is under-recognised in adult patients with tetralogy of Fallot and pulmonary atresia*. Heart, 2010. **96**(8): p. 621-4.
28. Kuciene, R. and V. Dulskiene, *Selected environmental risk factors and congenital heart defects*. Medicina (Kaunas), 2008. **44**(11): p. 827-32.
29. Jenkins, K.J., et al., *Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics*. Circulation, 2007. **115**(23): p. 2995-3014.
30. Czeizel, A.E., *Periconceptional folic acid containing multivitamin supplementation*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1998. **78**(2): p. 151-61.
31. Joziassse, I.C., et al., *A duplication including GATA4 does not co-segregate with congenital heart defects*. Am J Med

- Genet A, 2009. **149A**(5): p. 1062-6.
32. Nora, J.J., *Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart diseases. The genetic-environmental interaction.* Circulation, 1968. **38**(3): p. 604-17.
 33. Smith, K.A., et al., *Dominant-negative ALK2 allele associates with congenital heart defects.* Circulation, 2009. **119**(24): p. 3062-9.
 34. Burn, J., et al., *Recurrence risks in offspring of adults with major heart defects: results from first cohort of British collaborative study.* Lancet, 1998. **351**(9099): p. 311-6.
 35. van Beynum, I.M., et al., *Common 894G>T single nucleotide polymorphism in the gene coding for endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and risk of congenital heart defects.* Clin Chem Lab Med, 2008. **46**(10): p. 1369-75.
 36. van Driel, L.M., et al., *Eight-fold increased risk for congenital heart defects in children carrying the nicotinamide N-methyltransferase polymorphism and exposed to medicines and low nicotinamide.* Eur Heart J, 2008. **29**(11): p. 1424-31.
 37. Verkleij-Hagoort, A.C., et al., *Genetic and lifestyle factors related to the periconception vitamin B12 status and congenital heart defects: a Dutch case-control study.* Mol Genet Metab, 2008. **94**(1): p. 112-9.
 38. Calcagni, G., et al., *Familial recurrence of congenital heart disease: an overview and review of the literature.* Eur J Pediatr, 2007. **166**(2): p. 111-6.
 39. Gill, H.K., et al., *Patterns of recurrence of congenital heart disease: an analysis of 6,640 consecutive pregnancies evaluated by detailed fetal echocardiography.* J Am Coll Cardiol, 2003. **42**(5): p. 923-9.
 40. Loffredo, C.A., et al., *Prevalence of congenital cardiovascular malformations among relatives of infants with hypoplastic left heart, coarctation of the aorta, and d-transposition of the great arteries.* Am J Med Genet A, 2004. **124A**(3): p. 225-30.
 41. Oyen, N., et al., *Recurrence of congenital heart defects in families.* Circulation, 2009. **120**(4): p. 295-301.
 42. Nora, J., K. Berg, and A. Nora, *Cardiovascular disease. Genetics, epidemiology and prevention.*, ed. O.U. Press. 1991, New York.
 43. Driscoll, D.J., et al., *Occurrence risk for congenital heart defects in relatives of patients with aortic stenosis, pulmonary stenosis, or ventricular septal defect.* Circulation, 1993. **87**(2 Suppl): p. I114-20.
 44. Wessels, M.W. and P.J. Willems, *Genetic factors in non-syndromic congenital heart malformations.* Clin Genet, 2010. **78**(2): p. 103-23.
 45. Garg, V., et al., *GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5.* Nature, 2003. **424**(6947): p. 443-7.
 46. Schott, J.J., et al., *Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5.* Science, 1998. **281**(5373): p. 108-11.
 47. Bernier, P.L., et al., *The challenge of congenital heart disease worldwide: epidemiologic and demographic facts.* Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu, 2010. **13**(1): p. 26-34.
 48. Wren, C. and J.J. O'Sullivan, *Survival with congenital heart disease and need for follow up in adult life.* Heart, 2001. **85**(4): p. 438-43.
 49. Botto, L.D., A. Correa, and J.D. Erickson, *Racial and temporal variations in the prevalence of heart defects.* Pediatrics, 2001. **107**(3): p. E32.
 50. Calzolari, E., et al., *Congenital heart defects: 15 years of experience of the Emilia-Romagna Registry (Italy).* Eur J Epidemiol, 2003. **18**(8): p. 773-80.
 51. Pradat, P., et al., *The epidemiology of cardiovascular defects, part I: a study based on data from three large registries of congenital malformations.* Pediatr Cardiol, 2003. **24**(3): p. 195-221.
 52. Wren, C., Z. Reinhardt, and K. Khawaja, *Twenty-year trends in diagnosis of life-threatening neonatal cardiovascular malformations.* Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2008. **93**(1): p. F33-5.
 53. Mason, C.A., et al., *Prevalence is the preferred measure of frequency of birth defects.* Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2005. **73**(10): p. 690-2.
 54. Nembhard, W.N., et al., *Variation in the prevalence of congenital heart defects by maternal race/ethnicity and infant sex.* J Pediatr, 2010. **156**(2): p. 259-64.
 55. Engelfriet, P. and B.J. Mulder, *Gender differences in adult congenital heart disease.* Neth Heart J, 2009. **17**(11): p. 414-7.
 56. Somerville, J., *The Denolin Lecture: The woman with congenital heart disease.* Eur Heart J, 1998. **19**(12): p. 1766-75.
 57. Samanek, M., *Children with congenital heart disease: probability of natural survival.* Pediatr Cardiol, 1992. **13**(3): p. 152-8.
 58. Tegnander, E., et al., *Prenatal detection of heart defects in a non-selected population of 30,149 fetuses--detection rates and outcome.* Ultrasound Obstet Gynecol, 2006. **27**(3): p. 252-65.
 59. Tomek, V., et al., *Fetal cardiology in the Czech Republic: current management of prenatally diagnosed congenital heart diseases and arrhythmias.* Physiol Res, 2009. **58** Suppl 2: p. S159-66.
 60. Paladini, D., et al., *Prenatal diagnosis of congenital heart disease in the Naples area during the years 1994-1999 -- the experience of a joint fetal-pediatric cardiology unit.* Prenat Diagn, 2002. **22**(7): p. 545-52.
 61. Fesslova, V., S. Nava, and L. Villa, *Evolution and long term outcome in cases with fetal diagnosis of congenital heart*

- disease: Italian multicentre study. *Fetal Cardiology Study Group of the Italian Society of Pediatric Cardiology. Heart*, 1999. **82**(5): p. 594-9.
62. Ionescu-Iltu, R., et al., *Prevalence of severe congenital heart disease after folic acid fortification of grain products: time trend analysis in Quebec, Canada.* *Bmj*, 2009. **338**: p. b1673.
 63. Boneva, R.S., et al., *Mortality associated with congenital heart defects in the United States: trends and racial disparities, 1979-1997.* *Circulation*, 2001. **103**(19): p. 2376-81.
 64. Morris, C.D. and V.D. Menashe, *25-year mortality after surgical repair of congenital heart defect in childhood. A population-based cohort study.* *Jama*, 1991. **266**(24): p. 3447-52.
 65. Pillutla, P., K.D. Shetty, and E. Foster, *Mortality associated with adult congenital heart disease: Trends in the US population from 1979 to 2005.* *Am Heart J*, 2009. **158**(5): p. 874-9.
 66. Billett, J., et al., *Trends in hospital admissions, in-hospital case fatality and population mortality from congenital heart disease in England, 1994 to 2004.* *Heart*, 2008. **94**(3): p. 342-8.
 67. Oechslin, E.N., et al., *Mode of death in adults with congenital heart disease.* *Am J Cardiol*, 2000. **86**(10): p. 1111-6.
 68. Verheugt, C.L., et al., *Mortality in adult congenital heart disease.* *Eur Heart J*, 2010. **31**(10): p. 1220-9.
 69. Zomer, A.C., et al., *Mortality in adult congenital heart disease: are national registries reliable for cause of death?* *Int J Cardiol*, 2011. **152**(2): p. 212-7.
 70. Lok, S.I., et al., *Recurrence of cerebrovascular events in young adults with a secundum atrial septal defect.* *Int J Cardiol*, 2010. **142**(1): p. 44-9.
 71. Verheugt, C.L., et al., *Gender and outcome in adult congenital heart disease.* *Circulation*, 2008. **118**(1): p. 26-32.
 72. Dittrich, H., et al., *Neurodevelopment at 1 year of age in infants with congenital heart disease.* *Heart*, 2003. **89**(4): p. 436-41.
 73. Dorfman, A.T., et al., *Critical heart disease in the neonate: presentation and outcome at a tertiary care center.* *Pediatr Crit Care Med*, 2008. **9**(2): p. 193-202.
 74. Kotani, Y., et al., *Impact of miniaturization of cardiopulmonary bypass circuit on blood transfusion requirement in neonatal open-heart surgery.* *Asaio J*, 2007. **53**(6): p. 662-5.
 75. Miller, S.P., et al., *Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease.* *N Engl J Med*, 2007. **357**(19): p. 1928-38.
 76. McQuillen, P.S., et al., *Temporal and anatomic risk profile of brain injury with neonatal repair of congenital heart defects.* *Stroke*, 2007. **38**(2 Suppl): p. 736-41.
 77. Engelfriet, P., et al., *The spectrum of adult congenital heart disease in Europe: morbidity and mortality in a 5 year follow-up period. The Euro Heart Survey on adult congenital heart disease.* *Eur Heart J*, 2005. **26**(21): p. 2325-33.
 78. Verheugt, C.L., et al., *Long-term prognosis of congenital heart defects: a systematic review.* *Int J Cardiol*, 2008. **131**(1): p. 25-32.
 79. Walsh, E.P. and F. Cecchin, *Arrhythmias in adult patients with congenital heart disease.* *Circulation*, 2007. **115**(4): p. 534-45.
 80. Khairy, P., et al., *Arrhythmias in adult congenital heart disease.* *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2006. **4**(1): p. 83-95.
 81. Silka, M.J., et al., *A population-based prospective evaluation of risk of sudden cardiac death after operation for common congenital heart defects.* *J Am Coll Cardiol*, 1998. **32**(1): p. 245-51.
 82. Sekar, R.P., *Epidemiology of arrhythmias in children.* *Indian Pacing Electrophysiol J*, 2008. **8**(Suppl. 1): p. S8-S13.
 83. Rekawek, J., et al., *Risk factors for cardiac arrhythmias in children with congenital heart disease after surgical intervention in the early postoperative period.* *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007. **133**(4): p. 900-4.
 84. Delaney, J.W., et al., *Early postoperative arrhythmias after pediatric cardiac surgery.* *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006. **131**(6): p. 1296-300.
 85. Hoffman, T.M., et al., *The incidence of arrhythmias in a pediatric cardiac intensive care unit.* *Pediatr Cardiol*, 2002. **23**(6): p. 598-604.
 86. Gelatt, M., et al., *Risk factors for atrial tachyarrhythmias after the Fontan operation.* *J Am Coll Cardiol*, 1994. **24**(7): p. 1735-41.
 87. Khairy, P., et al., *Arrhythmia burden in adults with surgically repaired tetralogy of Fallot: a multi-institutional study.* *Circulation*, 2010. **122**(9): p. 868-75.
 88. van den Bosch, A.E., et al., *Long-term outcome and quality of life in adult patients after the Fontan operation.* *Am J Cardiol*, 2004. **93**(9): p. 1141-5.
 89. Gelatt, M., et al., *Arrhythmia and mortality after the Mustard procedure: a 30-year single-center experience.* *J Am Coll Cardiol*, 1997. **29**(1): p. 194-201.
 90. Cecchin, F., et al., *Effect of age and surgical technique on symptomatic arrhythmias after the Fontan procedure.* *Am J Cardiol*, 1995. **76**(5): p. 386-91.
 91. Rhodes, L.A., et al., *Arrhythmias and intracardiac conduction after the arterial switch operation.* *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1995. **109**(2): p. 303-10.
 92. Berdat, P.A., et al., *Reoperations in adults with congenital heart disease: analysis of early outcome.* *Int J Cardiol*, 2004. **93**(2-3): p. 239-45.
 93. Giamberti, A., et al., *Morbidity and mortality risk factors in adults with congenital heart disease undergoing cardiac reoperations.* *Ann Thorac Surg*, 2009. **88**(4): p. 1284-9.

94. Oosterhof, T., et al., *Preoperative thresholds for pulmonary valve replacement in patients with corrected tetralogy of Fallot using cardiovascular magnetic resonance*. *Circulation*, 2007. **116**(5): p. 545-51.
95. Srinathan, S.K., et al., *Changing practice of cardiac surgery in adult patients with congenital heart disease*. *Heart*, 2005. **91**(2): p. 207-12.
96. Vida, V.L., et al., *Risk of surgery for congenital heart disease in the adult: a multicentered European study*. *Ann Thorac Surg*, 2007. **83**(1): p. 161-8.
97. Voskuil, M., et al., *Postsurgical course of patients with congenitally corrected transposition of the great arteries*. *Am J Cardiol*, 1999. **83**(4): p. 558-62.
98. Padalino, M.A., et al., *Midterm results of surgical intervention for congenital heart disease in adults: an Italian multicenter study*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007. **134**(1): p. 106-13, 113 e1-9.
99. Stellin, G., et al., *Surgical outcome for congenital heart malformations in the adult age: a multicentric European study*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*, 2004. **7**: p. 95-101.
100. Norozi, K., et al., *Incidence and risk distribution of heart failure in adolescents and adults with congenital heart disease after cardiac surgery*. *Am J Cardiol*, 2006. **97**(8): p. 1238-43.
101. Winter, M.M., et al., *Latest insights in therapeutic options for systemic right ventricular failure: a comparison with left ventricular failure*. *Heart*, 2009. **95**(12): p. 960-3.
102. Chaturvedi, V. and A. Saxena, *Heart failure in children: clinical aspect and management*. *Indian J Pediatr*, 2009. **76**(2): p. 195-205.
103. Piran, S., et al., *Heart failure and ventricular dysfunction in patients with single or systemic right ventricles*. *Circulation*, 2002. **105**(10): p. 1189-94.
104. Oosterhof, T., et al., *Effects of volume and/or pressure overload secondary to congenital heart disease (tetralogy of fallot or pulmonary stenosis) on right ventricular function using cardiovascular magnetic resonance and B-type natriuretic peptide levels*. *Am J Cardiol*, 2006. **97**(7): p. 1051-5.
105. Tulevski, I.I., et al., *Increased brain and atrial natriuretic peptides in patients with chronic right ventricular pressure overload: correlation between plasma neurohormones and right ventricular dysfunction*. *Heart*, 2001. **86**(1): p. 27-30.
106. Fisher, M.C., *Changing Risk Factors for Pediatric Infective Endocarditis*. *Curr Infect Dis Rep*, 2001. **3**(4): p. 333-336.
107. Dodo, H. and J.S. Child, *Infective endocarditis in congenital heart disease*. *Cardiol Clin*, 1996. **14**(3): p. 383-92.
108. Gersony, W.M., et al., *Bacterial endocarditis in patients with aortic stenosis, pulmonary stenosis, or ventricular septal defect*. *Circulation*, 1993. **87**(2 Suppl): p. 1121-6.
109. Morris, C.D., M.D. Reller, and V.D. Menashe, *Thirty-year incidence of infective endocarditis after surgery for congenital heart defect*. *Jama*, 1998. **279**(8): p. 599-603.
110. Tleyjeh, I.M., et al., *Temporal trends in infective endocarditis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota*. *Jama*, 2005. **293**(24): p. 3022-8.
111. Niwa, K., et al., *Infective endocarditis in congenital heart disease: Japanese national collaboration study*. *Heart*, 2005. **91**(6): p. 795-800.
112. Di Filippo, S., et al., *Current patterns of infective endocarditis in congenital heart disease*. *Heart*, 2006. **92**(10): p. 1490-5.
113. Takeda, S., T. Nakanishi, and M. Nakazawa, *A 28-year trend of infective endocarditis associated with congenital heart diseases: a single institute experience*. *Pediatr Int*, 2005. **47**(4): p. 392-6.
114. Sandre, R.M. and S.D. Shafran, *Infective endocarditis: review of 135 cases over 9 years*. *Clin Infect Dis*, 1996. **22**(2): p. 276-86.
115. da Silva, D.B., I.P. Souza, and M.C. Cunha, *Knowledge, attitudes and status of oral health in children at risk for infective endocarditis*. *Int J Paediatr Dent*, 2002. **12**(2): p. 124-31.
116. Ready, D., et al., *Disease severity associated with presence in subgingival plaque of Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Tannerella forsythia, singly or in combination, as detected by nested multiplex PCR*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(10): p. 3380-3.
117. Tomas Carmona, I., P. Diz Dios, and C. Scully, *Efficacy of antibiotic prophylactic regimens for the prevention of bacterial endocarditis of oral origin*. *J Dent Res*, 2007. **86**(12): p. 1142-59.
118. Franco, E., et al., *Dental disease, caries related microflora and salivary IgA of children with severe congenital cardiac disease: an epidemiological and oral microbial survey*. *Pediatr Dent*, 1996. **18**(3): p. 228-35.
119. Hallett, K.B., D.J. Radford, and W.K. Seow, *Oral health of children with congenital cardiac diseases: a controlled study*. *Pediatr Dent*, 1992. **14**(4): p. 224-30.
120. Steckslen-Blicks, C., et al., *Dental caries experience in children with congenital heart disease: a case-control study*. *Int J Paediatr Dent*, 2004. **14**(2): p. 94-100.
121. Saunders, C.P. and G.J. Roberts, *Dental attitudes, knowledge, and health practices of parents of children with congenital heart disease*. *Arch Dis Child*, 1997. **76**(6): p. 539-40.
122. Warburton, G. and J.F. Caccamese, Jr., *Valvular heart disease and heart failure: dental management considerations*. *Dent Clin North Am*, 2006. **50**(4): p. 493-512, v.
123. da Fonseca, M.A., et al., *The impact of oral health on the quality of life of young patients with congenital cardiac disease*. *Cardiol Young*, 2009. **19**(3): p. 252-6.

124. Balmer, R. and F.A. Bu'Lock, *The experiences with oral health and dental prevention of children with congenital heart disease*. *Cardiol Young*, 2003. **13**(5): p. 439-43.
125. Koga, T., et al., *Immunization against dental caries*. *Vaccine*, 2002. **20**(16): p. 2027-44.
126. Han, Y.W., et al., *Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: Fusobacterium nucleatum adheres to and invades epithelial cells*. *Infect Immun*, 2000. **68**(6): p. 3140-6.
127. Loesche, W.J., *Role of Streptococcus mutans in human dental decay*. *Microbiol Rev*, 1986. **50**(4): p. 353-80.
128. Munro, C.L. and F.L. Macrina, *Sucrose-derived exopolysaccharides of Streptococcus mutans V403 contribute to infectivity in endocarditis*. *Mol Microbiol*, 1993. **8**(1): p. 133-42.
129. Tao, L. and M.C. Herzberg, *Identifying in vivo expressed streptococcal genes in endocarditis*. *Methods Enzymol*, 1999. **310**: p. 109-16.
130. Cangelosi, G.A., et al., *Oligonucleotide probes for mutans streptococci*. *Mol Cell Probes*, 1994. **8**(1): p. 73-80.
131. de Soet, J.J., et al., *Enumeration of mutans streptococci in clinical samples by using monoclonal antibodies*. *J Clin Microbiol*, 1990. **28**(11): p. 2467-72.
132. Jensen, B. and D. Bratthall, *A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva*. *J Dent Res*, 1989. **68**(3): p. 468-71.
133. Oho, T., et al., *Simple and rapid detection of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in human saliva by polymerase chain reaction*. *Oral Microbiol Immunol*, 2000. **15**(4): p. 258-62.
134. Yoneda, M., et al., *Stimulation of growth of Porphyromonas gingivalis by cell extracts from Tannerella forsythia*. *J Periodontal Res*, 2005. **40**(2): p. 105-9.
135. Yoshida, A., et al., *Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus*. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(9): p. 4438-41.
136. Yasunaga, A., et al., *Monitoring the prevalence of viable and dead cariogenic bacteria in oral specimens and in vitro biofilms by qPCR combined with propidium monoazide*. *BMC Microbiol*, 2013. **13**: p. 157.
137. Gold, O.G., H.V. Jordan, and J. Van Houte, *A selective medium for Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 1973. **18**(11): p. 1357-64.
138. Carlsson, J., *A medium for isolation of Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 1967. **12**(12): p. 1657-8.
139. Duchin, S. and J. van Houte, *Colonization of teeth in humans by Streptococcus mutans as related to its concentration in saliva and host age*. *Infect Immun*, 1978. **20**(1): p. 120-5.
140. Svanberg, M. and B. Krasse, *Comparative recovery of mutans streptococci on two selective media*. *Caries Res*, 1990. **24**(1): p. 36-8.
141. Schaeken, M.J., J.S. van der Hoeven, and H.C. Franken, *Comparative recovery of Streptococcus mutans on five isolation media, including a new simple selective medium*. *J Dent Res*, 1986. **65**(6): p. 906-8.
142. Tanzer, J.M., et al., *Glucose-sucrose-potassium tellurite-bacitracin agar, an alternative to mitis salivarius-bacitracin agar for enumeration of Streptococcus mutans*. *J Clin Microbiol*, 1984. **20**(4): p. 653-9.
143. Togelius, J., et al., *Streptococcus mutans in saliva: intraindividual variations and relation to the number of colonized sites*. *Acta Odontol Scand*, 1984. **42**(3): p. 157-63.
144. Twetman, S., et al., *Pre- and post-treatment levels of salivary mutans streptococci and lactobacilli in pre-school children*. *Int J Paediatr Dent*, 1999. **9**(2): p. 93-8.
145. Emilson, C.G. and D. Bratthall, *Growth of Streptococcus mutans on various selective media*. *J Clin Microbiol*, 1976. **4**(1): p. 95-8.
146. Loe, H., et al., *Experimental gingivitis in man. 3. Influence of antibiotics on gingival plaque development*. *J Periodontal Res*, 1967. **2**(4): p. 282-9.
147. Fine, D.H., et al., *Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary Streptococcus mutans levels*. *J Clin Periodontol*, 2000. **27**(3): p. 157-61.
148. Tasioula, V., R. Balmer, and J. Parsons, *Dental health and treatment in a group of children with congenital heart disease*. *Pediatr Dent*, 2008. **30**(4): p. 323-8.
149. Urquhart, A.P. and A.S. Blinkhorn, *The dental health of children with congenital cardiac disease*. *Scott Med J*, 1990. **35**(6): p. 166-8.
150. Berger, E.N., *Attitudes and preventive dental health behaviour in children with congenital cardiac disease*. *Aust Dent J*, 1978. **23**(1): p. 87-90.
151. Milsom, K.M., M. Tickle, and D. King, *Does the dental profession know how to care for the primary dentition?* *Br Dent J*, 2003. **195**(6): p. 301-3.
152. *For the dental patient... Antibiotics before dental treatment. Preventing bacterial endocarditis*. *J Am Dent Assoc*, 2002. **133**(1): p. 127.
153. Talebi, M., et al., *A study on oral health of children with cardiac diseases in mashhad, iran in 2004*. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 2007. **1**(3): p. 114-8.
154. Hayes, P.A. and J. Fasules, *Dental screening of pediatric cardiac surgical patients*. *ASDC J Dent Child*, 2001. **68**(4): p. 255-8, 228-9.
155. Rosen, L., et al., *Saliva profiles in children using heart failure medication: a pilot study*. *Eur Arch Paediatr Dent*, 2010. **11**(4): p. 187-91.
156. Hansson, L., A. Rydberg, and C. Stecksén-Blicks, *Oral microflora and dietary intake in infants with congenital heart*

- disease: a case control study. Eur Arch Paediatr Dent, 2012. **13**(5): p. 238-43.
157. Suvarna, R.M., K. Rai, and A.M. Hegde, *Oral health of children with congenital heart disease following preventive treatment*. J Clin Pediatr Dent, 2011. **36**(1): p. 93-8.
158. Torres, M.C., et al., *Salivary Streptococcus mutans and Lactobacillus sp levels in cardiac children*. J Clin Pediatr Dent, 2001. **26**(1): p. 103-9.
159. Brambilla, E., et al., *Salivary mutans streptococci and lactobacilli in 9- and 13-year-old Italian schoolchildren and the relation to oral health*. Clin Oral Investig, 1999. **3**(1): p. 7-10.
160. Wan, A.K., et al., *Comparison of five selective media for the growth and enumeration of Streptococcus mutans*. Aust Dent J, 2002. **47**(1): p. 21-6.
161. Scannapieco, F.A., R.B. Bush, and S. Paju, *Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review*. Ann Periodontol, 2003. **8**(1): p. 38-53.
162. Ogawa, A., et al., *Inhibition of Streptococcus mutans biofilm formation by Streptococcus salivarius FruA*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(5): p. 1572-80.
163. Selwitz, R.H., A.I. Ismail, and N.B. Pitts, *Dental caries*. Lancet, 2007. **369**(9555): p. 51-9.
164. Edgar, W.M., *Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting*. Br Dent J, 1990. **169**(3-4): p. 96-8.
165. Herrera, J.L., M.F. Lyons, 2nd, and L.F. Johnson, *Saliva: its role in health and disease*. J Clin Gastroenterol, 1988. **10**(5): p. 569-78.

**PREVALENZA DI SEI PATOGENI PARODONTALI IN
CAMPIONI SOTTOGENGIVALI DI PAZIENTI ADULTI
AFFETTI DA PARODONTITE CRONICA**

1. Introduzione alla malattia parodontale

La parodontite è una malattia infiammatoria a carico del parodonto, ovvero delle strutture di supporto del dente (Fig.1) ed è caratterizzato dall'accumulo di batteri sui margini gengivali con formazione di un infiltrato infiammatorio. Il risultato finale della malattia parodontale è la distruzione del tessuto connettivo attaccato al dente, il riassorbimento dell'osso alveolare e la perdita del dente [3].

La malattia parodontale ha una distribuzione globale e include una gamma di affezioni che possono essere lievi, come le gengiviti, o severe, come le parodontiti severe o anche malattie difficilmente curabili che mettono in pericolo di vita, come il cancro orale [4]. Virtualmente tutte i tipi di parodontiti sono di origine infettiva perché si sviluppano come conseguenza dell'interazione tra agenti patogeni (batteri, virus e lieviti) e il sistema immunitario dell'ospite. La *gengivite* è una patologia infiammatoria dei tessuti molli di sostegno dei denti (gengiva marginale); si manifesta con sanguinamento spontaneo e/o al sondaggio, ipertrofia gengivale, edema, assenza di tasca

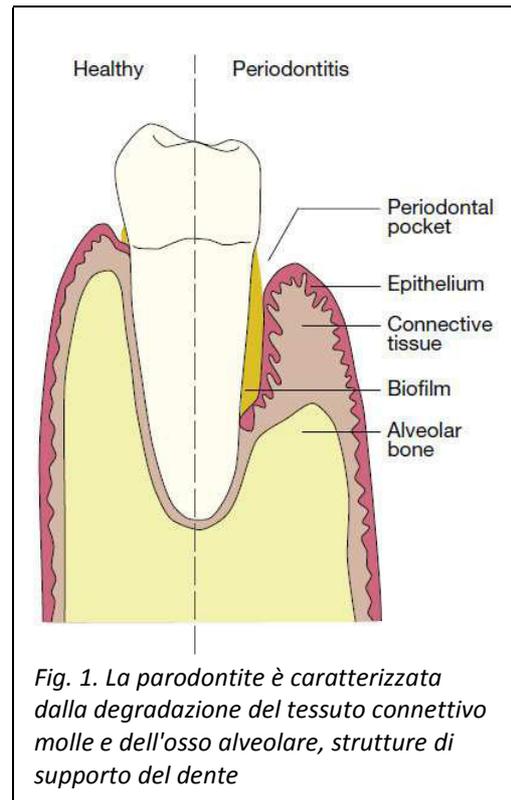


Fig. 1. La parodontite è caratterizzata dalla degradazione del tessuto connettivo molle e dell'osso alveolare, strutture di supporto del dente

parodontale; riconosce un'etiologia multifattoriale soprattutto batterica con l'interazione di tre cofattori principali: suscettibilità dell'ospite, fattori ambientali e comportamentali [5, 6]. La gengivite, se trattata, è reversibile.

La *parodontite* (ad insorgenza precoce aggressiva, dell'adulto cronica, necrotizzante), invece, si manifesta con perdita radiografica di osso in presenza di perdita di attacco al sondaggio; segno patognomonicamente è la tasca parodontale; insorge quando il processo degenerativo supera l'attacco connettivale dell'elemento dentario. La distruzione delle strutture di sostegno del dente è il risultato dell'inefficace azione dei sistemi di difesa dell'ospite in risposta all'accumulo della placca microbica. Questo processo patogeno è diverso per estensione e gravità da individuo ad individuo ed all'interno dello stesso individuo.

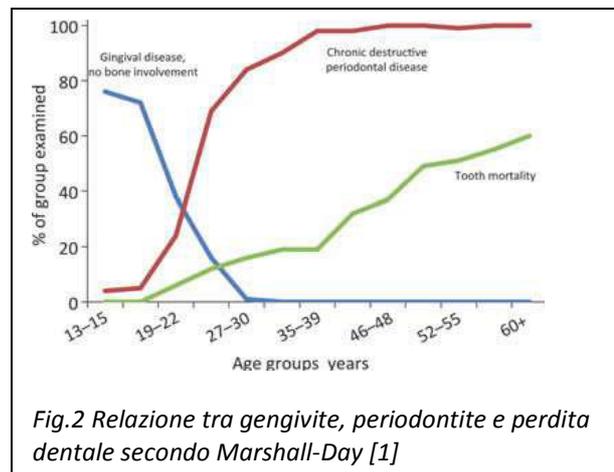
La malattia parodontale è una patologia frequente: circa il 5-15% della popolazione è affetta da parodontite severa [7-10].

Agli inizi del ventesimo secolo la malattia parodontale era definita nell'ambito delle infezioni focali; ha poi subito le influenze dell'era degli indici parodontali e della valutazione del rischio, e nei tempi più recenti, con lo sviluppo della medicina parodontale è stata nuovamente inquadrata come infezione focale.

L'inizio del primo periodo della teoria dell'infezione focale in odontoiatria ha spianato la strada per l'idea che le malattie parodontali fossero le principali cause di perdita dei denti negli adulti, e di malattie sistemiche. Nonostante la mancanza di prove più consistenti, molti medici e odontoiatri adottarono strategie aggressive contro denti e tonsille, ritenuti i serbatoi dei germi patogeni. Tali strategie di odontoiatria preventiva prevedevano anche l'estrazione di tutti i denti per evitare rischi di malattie sistemiche [11, 12].

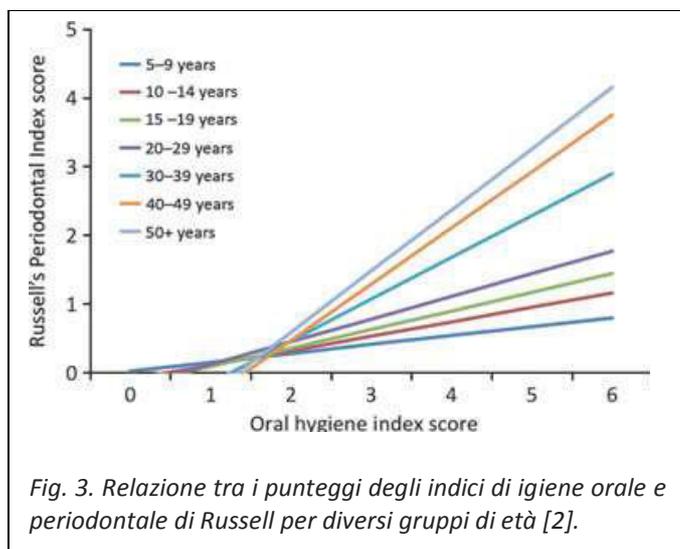
Intorno agli anni '50 nella comunità dei parodontologi si diffuse l'esigenza di applicare metodi scientifici di ricerca in parodontologia e nel 1955 fu pubblicato uno studio epidemiologico i cui risultati sostenevano due importanti punti di vista [1]:

- la malattia parodontale è la principale causa di perdita di denti;
- la gengivite porta sempre alla malattia parodontale distruttiva (Fig.2).



L'epidemiologia in ambito parodontale subì una svolta importante con l'introduzione di indici per il punteggio di malattia parodontale, come quelli di Russell [13] e di Ramfjord [14], e per la quantificazione di igiene orale, come l'indice di Greene e Vermillion [15]. Da un

punto di vista di analisi statistica, l'uso dell'indice di Russell fu facilitato dalla accurata selezione dei pesi dati ai diversi stadi di avanzamento della malattia per garantire la linearità tra l'indice e l'età. La Fig. 3 raffigura un tipico risultato di analisi di associazione tra età, stato d'igiene orale e indice di malattia parodontale: si deduce che se una persona mantiene scarsa igiene orale per pochi anni, tende a sviluppare la malattia parodontale distruttiva che avanza rapidamente [2]. Utilizzando analisi simili, Russell concluse che il 90% o più della varianza dell'indice parodontale fosse rappresentato dall'effetto combinato dei fattori età e igiene orale, indipendentemente dalla popolazione studiata [16].



Nonostante le limitazioni intrinseche degli stessi indici, pochi anni più tardi l'Organizzazione Mondiale della Sanità introdusse il nuovo Indice parodontale di comunità legato alla necessità di trattamento, che ebbe l'effetto di sovrastimare le necessità di trattamento, rispetto alle proporzioni di parodontiti registrate nella popolazione. L'uso di tale indice, indicato inizialmente solo a scopo epidemiologico, fu scoraggiato in tutti i campi.

Dai primi anni '80, gli indici parodontali si sono arricchiti di misurazioni sito-specifiche per combinare i seguenti parametri correlati alla malattia parodontale: perdita di osso alveolare, livello di attacco clinico (CAL), profondità di sondaggio, recessione gengivale, infiammazione gengivale, sanguinamento al sondaggio (BOP), placca e tartaro.

Sulla base di tali misurazioni dettagliate, uno studio ha suggerito che i siti con malattia parodontale possono subire cicli di esacerbazione e remissione spontanea [17]. Questi

risultati sono stati confermati da uno studio che ha dimostrato che la progressione significativa della malattia era un evento raro in soggetti con malattia parodontale non trattati per un massimo di 6 anni [18].

Tutte insieme queste osservazioni hanno portato a sostenere che i siti affetti da parodontopatia si attivano per periodi di tempo più brevi, seguiti da lunghi periodi di remissione e inattività [19].

Questo modello di malattia ha attirato notevole interesse perché ha fornito una base per lo studio dei fattori di rischio clinici e microbiologici sito-specifici per la progressione della parodontite. Da questo momento numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che la placca non è la sola causa di parodontite [20, 21], ma esiste una suscettibilità individuale e comportamenti, come il fumo [22-25], o malattie, come il diabete mellito [23, 26, 27] che aumentano il rischio di malattia parodontale. La suscettibilità individuale è geneticamente determinata ma subisce influenze esogene, orali e non orali, che sono comuni ma variano nel tempo e di intensità [28].

Negli ultimi anni, la ricerca dei fattori di rischio per lo sviluppo e progressione della parodontite è stata messa in ombra da studi che valutano l'impatto della parodontite come fattore di rischio per problemi di salute generale. Infatti, la scarsa salute orale è stata definita come fattore di rischio per l'infarto del miocardio [29], e più precisamente la parodontite è risultata implicata nello sviluppo delle malattie cardiovascolari [30-32], il basso peso alla nascita di bambini nati pre-termine [33, 34], il diabete [35-37], la pneumopatia cronico-ostruttivo e la polmonite [30], la malattia renale cronica [38, 39] e una serie di tumori [40, 41].

2. Epidemiologia della malattia parodontale

La classificazione della malattia parodontale e la risultante nomenclatura continuano ad essere modificate periodicamente. Quasi tutte le classificazioni di malattia parodontale finora proposti mancano della definizione di criteri operativi per stabilire l'entità della parodontite. La più recente classificazione messa a punto dall'International Workshop for a Classification of Periodontal Disease and Conditions del 1999 [42], ha definito le principali forme di parodontite: parodontite cronica (CP) e parodontite aggressiva (AgP). CP è

generalmente una forma di parodontite a progressione lenta, che può andare incontro a periodi in cui si osserva un acuto peggioramento associato ad una perdita di attacco parodontale. AgP, invece, è una forma di malattia parodontale familiare rapidamente progressiva che si caratterizza per la distruzione significativa dell'attacco parodontale in età precoce. Entrambe le forme di parodontite si possono verificare in una forma localizzata e in una forma generalizzata, e il punto di distinzione tra localizzata e generalizzata è stato fissato al 30% dei siti. Entrambe le forme possono essere di entità lieve, moderata o severa quando la perdita di attacco clinico è di 1-2, 3-4 o \geq a 5 mm, rispettivamente [42].

La mancanza di criteri univoci di classificazione rende difficile la raccolta di dati epidemiologici.

I dati epidemiologici finora disponibili, seppure con i loro limiti, dimostrano che la malattia parodontale rappresenta un problema di salute globale [43] che colpisce la maggior parte della popolazione adulta dopo i 35-40 anni di età. La malattia inizia con un gengivite in gioventù che, se non curata, degenera, fino ad arrivare alla parodontite progressiva e distruttiva. Il primo Consensus dell'European Workshop on Periodontology, infatti, ha stabilito che la parodontite è sempre preceduta dalla gengivite [44]; la prevenzione della gengivite, pertanto, consente un'efficace opera di prevenzione della parodontite [45].

Nel corso degli anni molti studi epidemiologici si sono focalizzati sulla prevalenza della malattia parodontale [46]; secondo questi studi la percentuale di individui con un parodonto sano (assenza di infiammazione e profondità di sondaggio non superiore a 4 mm) diminuisce con l'aumentare dell'età e non rappresenta più del 10% della popolazione adulta [47].

I dati epidemiologici relativi alla prevalenza della malattia parodontale variano in misura considerevole da studio a studio e spesso non sono confrontabili a causa della differente definizione dei casi e delle differenti metodologie usate. In Europa e nel Nord America sono stati riportati tassi di prevalenza della gengivite che oscillano dal 70 al 95% negli adulti. Studi più recenti hanno evidenziato una modificazione nei tassi di prevalenza con valori di gengivite compresi tra il 40 e il 50% negli adulti [48].

I valori di prevalenza della malattia parodontale nella popolazione italiana sono molto alti (circa 60%). La prevalenza di forme gravi o avanzate è elevata (10-14%) e aumenta drasticamente nelle fasce di età a partire da 35-44 anni.

Gli studi di prevalenza dimostrano che CP lieve o moderata è la forma più comune e si verifica con tassi di prevalenza variabili dal 13% al 57% nelle diverse popolazioni a seconda dello stato di salute orale e delle condizioni socio-economiche. Le forme severe di CP si verificano in una minoranza della popolazione globale e sembrano colpire il 10-25% dei soggetti che mostrano una particolare suscettibilità alla malattia [20, 21, 49-52]. Non si sono evidenziate delle differenze di prevalenza nei diversi gruppi etnici.

La maggior parte degli studi condotti su pazienti affetti da AgP dimostrano che la prevalenza di questa patologia è <1% (generalmente compresa tra 0.1-0.2% nella popolazione caucasica) [50, 53-55]. Questi tassi di prevalenza, comunque, non sono applicabili anche agli altri gruppi etnici, nei quali la prevalenza può mostrare delle variazioni in relazione al gruppo etnico o alla regione geografica. Ad esempio, la prevalenza di AgP tra gli afro-americani è del 2.6% [50, 55, 56], quella negli adolescenti marocchini è del 7.6% [57], quella della popolazione israeliana è compresa tra 6-38% [58-60].

I pochi studi ripetuti nel tempo sulla stessa popolazione e con l'impiego della stessa metodologia d'indagine hanno permesso di ottenere dati sulla tendenza nel tempo del verificarsi della malattia parodontale. Dye e collaboratori [61] hanno raccolto dati su una popolazione adulta e anziana americana a 10 anni di distanza. Hugoson e collaboratori [62-65] hanno effettuato uno studio di prevalenza su una popolazione svedese, analizzando i pazienti ogni 10 anni dal 1973. Ci sono prove evidenti sia dal primo che dal secondo studio che la prevalenza dell'edentulismo è diminuita notevolmente e che il numero medio di denti conservati tra i soggetti dentati è aumentato in tutti i gruppi di età. La prevalenza della parodontite è diminuita in tutte le fasce d'età della popolazione americana e svedese. In quest'ultimo studio si apprezza anche un sostanziale cambiamento nell'approccio terapeutico adottato: nel 1970, la strategia comune del trattamento parodontale consisteva nell'estrazione del dente che presentava perdita avanzata di osso, coinvolgimenti di biforcazioni e/o difetti di osso verticale. Negli anni successivi i dentisti sono diventati più restii ad estrarre un dente affetto da parodontopatia per la carenza di evidenza dell'effetto sui siti adiacenti.

3. Patogenesi della malattia parodontale

Tra le specie batteriche che colonizzano la cavità orale, alcune sono associate con parodontite, quindi sono chiamate parodontopatogeni. Questi possono invadere le cellule dell'epitelio gengivale legandosi alle integrine β -1 e replicarsi: in questo modo evadono il sistema di sorveglianza dell'ospite [66]. I Toll-like receptors (TLRs) presenti sulle cellule dell'epitelio gengivale possono riconoscere le strutture microbiche altamente conservate tra i patogeni, come il lipopolisaccaride (LPS), il peptidoglicano, il DNA batterico, l'RNA bicatenario e le lipoproteine chiamate Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [67]. Quando i TLR presenti sulle cellule dell'epitelio riconoscono le PAMPs, attivano una serie di fattori di trascrizione, come il nuclear factor κ B (NF κ B) e activator protein 1 (AP-1) [68, 69]. A loro volta, queste molecole attivano diversi meccanismi dell'immunità innata con produzione di citochine e chemochine che richiamano leucociti nello spazio parodontale. I leucociti, ovvero le cellule dell'immunità adattativa, rilasciano nel tessuto citochine e chemochine pro-infiammatorie, ma anche enzimi lisosomiali [70]. L'amplificazione di questa iniziale risposta infiammatoria locale (che dura circa 21 giorni) si manifesta con la propagazione dell'infiammazione e porta alla distruzione dei tessuti parodontali molli [71]. A questo punto, circa il 60-70% del collagene nel tessuto connettivo gengivale del sito della lesione risulta danneggiato, ma l'osso è ancora intatto, quindi è ancora possibile ripristinare il danno gengivale senza danni permanenti [72, 73]. In alcuni pazienti, però, a causa di numerosi fattori individuali e ambientali l'infiammazione non si risolve e il danno diventa irreversibile perché coinvolge l'osso [72, 74, 75].

3.1 Le cellule residenti e la risposta immunitaria innata

Le cellule della risposta immunitaria di tipo innata sono numerose ed includono le cellule epiteliali, i fibroblasti gengivali e dei legamenti parodontali, gli osteoblasti e le cellule dendritiche [69].

Le cellule epiteliali producono l'interleuchina 8 (IL-8), una molecola che richiama i neutrofili migranti per chemotassi [76] ed aumentano l'adesione dei monociti nei vasi sanguigni. I neutrofili che penetrano nello spazio parodontale si attivano e producono citochine pro-infiammatorie, come la IL-1, IL-6 e il Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) [77]. Queste citochine

mediano la distruzione del tessuto parodontale stimolando il riassorbimento osseo. I monociti, a loro volta, possono differenziarsi in osteoclasti (OCs) oppure produrre citochine infiammatorie, a seconda della tipologia di stimolo.

Le cellule dendritiche (DCs) sono chiamate in causa ogni volta che la barriera epiteliale risulta invasa dai microrganismi. Queste cellule attivano una risposta immune, agendo sia come cellule che presentano l'antigene, sia mediante la produzione di IL-12 e IL-18 che conseguentemente promuovono la produzione di interferon- γ (IFN- γ) da parte dei linfociti T [78].

I fibroblasti gengivali (GF) e i fibroblasti dei legamenti parodontali (PDLFs) sono le principali cellule del tessuto connettivo molle parodontale e vengono a contatto con i microrganismi appena questi invadono la barriera epiteliale. Tali cellule rispondono mediante la produzione e rilascio di citochine e molecole di degradazione. GF producono TNF- α , IL-6, IL-18, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α e stromal-derived factor (SDF)-1, che sono importanti regolatori del processo infiammatorio e del metabolismo osseo [79-81]. PDLFs producono le metalloproteinasi della matrice (MMPs), laminina-8/9, laminina-2/4, ma anche le molecole che contribuiscono all'infiammazione parodontale e alla perdita dell'osso (IL-6, IL-1 β , TNF- α e RANKL) [81-83].

I microrganismi possono andare in profondità nel tessuto parodontale e raggiungere la superficie dell'osso alveolare; è stato dimostrato che *Porphyromonas gingivalis* invade gli osteoblasti e ne induce l'apoptosi [84, 85]. Inoltre, le PAMPs promuovono l'osteoclastogenesi [86, 87]. Il processo infiammatorio iniziale in risposta all'infezione è responsabile della perdita dell'osso alveolare.

3.2 I leucociti e la risposta immunitaria adattativa

In seguito a questa iniziale risposta, si attiva la risposta adattativa: le cellule dendritiche ed altre cellule hanno la capacità di catturare e presentare l'antigene alle cellule T e B dell'immunità acquisita [88]. I linfociti T-helper CD4 producono una serie di citochine che stimolano il differenziamento in Th-1 per l'immunità cellulare, in Th-2 per l'immunità umorale [89], in Th-17 e in T regulatory (Treg) che hanno rispettivamente ruoli antagonisti come effettori e soppressori delle cellule [70, 90, 91]. Anche i linfociti B vengono attivati per

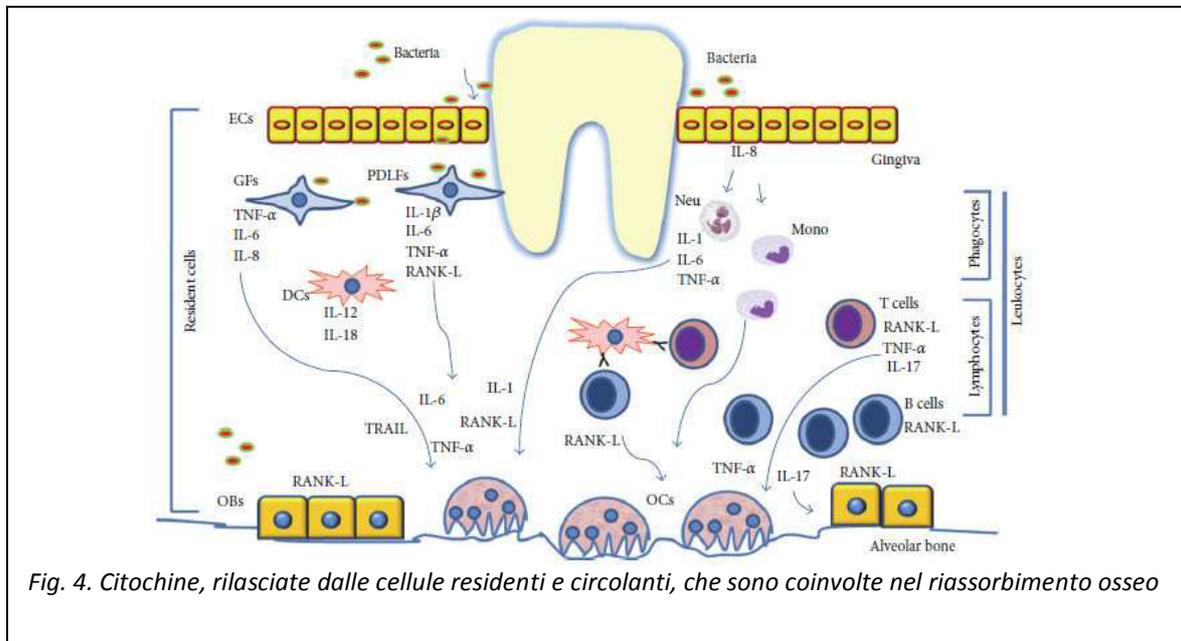
trasformarsi in plasmacellule capaci di produrre anticorpi contro gli antigeni batterici. Di conseguenza, il tessuto affetto da parodontite diventa colonizzato da entrambe le tipologie di linfociti, con prevalenza di cellule B [92].

3.3 Le citochine coinvolte nel riassorbimento osseo

- RANKL: espressa dagli osteoblasti e da altri tipi cellulari, come i fibroblasti e i linfociti T e B. In condizioni patologiche, come quelle di una parodontite, si verifica la produzione non regolata di questa citochina, che stimola l'osteoclastogenesi [93].
- OPG: prodotto dai fibroblasti parodontali residenti e dalle cellule endoteliali. OPG è una proteina solubile che si lega a RANKL bloccandone l'attività. La sua produzione è inibita in condizioni di malattia parodontale [93].
- TNF- α : questa ed altre citochine possono avere un effetto sinergico con RANKL nella promozione dell'osteoclastogenesi. Inoltre, alcuni studi hanno dimostrato che TNF- α è in grado di attivare un pathway che porta al differenziamento degli osteoclasti indipendente da RANKL [94]. TNF- α gioca un ruolo centrale nella reazione infiammatoria, nel riassorbimento osseo e nella perdita di attacco del tessuto connettivo [95, 96]. E' una citochina che si associa alle infiammazioni locali e sistemiche che coinvolgono la perdita di osso [95]. Inoltre, nel tessuto parodontale i suoi alti livelli correlano positivamente con quelli di RANKL [95-98]. TNF- α è prodotto localmente dalle cellule dell'immunità innata, come i neutrofili e i macrofagi, ma anche dai linfociti, dai fibroblasti, dalle cellule epiteliali, dalle cellule endoteliali e dagli osteoblasti. TNF- α contribuisce al danno parodontale attraverso il suo effetto diretto sull'osteoclastogenesi e sull'amplificazione della risposta infiammatoria [93].
- IL-17: proteina regolatoria prodotta dai linfociti T nei siti di infiammazione. La produzione non regolata di questa proteina si traduce nell'induzione dell'osteoclastogenesi e nella perdita dell'osso. Alti livelli di IL-17 si trovano nel fluido crevicolare delle tasche parodontali di pazienti affetti da parodontite [99]. IL-17 ha attività osteoclastogenica perché aumenta l'espressione di RANKL e contribuisce all'infiammazione reclutando e attivando cellule immunitarie che producono citochine, come IL-1 β e TNF- α [100].

- TRAIL: citochina con ruolo apoptotico nelle cellule cancerose, nelle cellule normali e negli osteoblasti [93].

La Fig. 4 schematizza il processo infiammatorio, le molecole e le cellule coinvolte nel riassorbimento osseo.



4. Microbiologia parodontale

La ricerca degli agenti patogeni coinvolti nella malattia parodontale è in corso da oltre 100 anni. Ancora oggi ci sono delle difficoltà nella definizione dei parodontopatogeni per i seguenti motivi:

- il microbiota sottogengivale è molto complesso e spesso in un unico sito è possibile identificare dalle 30 alle 1000 specie microbiche;
- il campione raccolto da una tasca parodontale può non essere rappresentativo di tutta la tasca;
- i microrganismi della placca sottogengivale sono difficili da coltivare, caratterizzare ed identificare. Molte specie che si trovano nella tasca parodontale non sono coltivabili o identificabili; inoltre, non esiste un unico terreno di coltura o ambiente di incubazione che permette di coltivare in modo ottimale tutte le specie parodontali;

- l'infezione può essere sostenuta da più specie microbiche: in questi casi la complessità della valutazione aumenta enormemente;
- le specie microbiche opportuniste possono sfruttare e colonizzare l'ambiente della lesione creata dai batteri patogeni e i loro livelli possono aumentare in maniera concomitante a quella dei veri patogeni, tanto da non essere facilmente distinguibile sperimentalmente;
- il campione di placca dovrebbe essere raccolto nel momento della massima attività della malattia; prelievi microbiologici nei periodi di remissione possono sottostimare il contributo dei patogeni nella lesione;
- le malattie parodontali possono essere di diversa tipologia e non sempre clinicamente distinguibili. La classificazione erranea può condurre a valutazioni microbiologiche non corrette;
- nello stesso soggetto ci possono essere lesioni parodontali di diverso tipo (superficiali, profonde) o localizzarsi in diversi siti e i batteri responsabili di queste possono essere diversi.
- alcuni soggetti sono portatori sani di patogeni in carica molto bassa, pur non mostrando segni clinici di parodontite;
- nell'ambito della stesse specie, alcuni ceppi patogeni possono essere più virulenti di altri perché hanno acquisito elementi genetici che conferiscono una maggiore invasività, aderenza, resistenza agli antimicrobici, oppure produzione di tossine.

4.1 Fattori di virulenza dei patogeni parodontali

La virulenza si riferisce alla capacità di un microbo di esprimere patogenicità e consiste in una complessa interazione tra il microrganismo, l'ospite e l'ambiente. Poulin e Combs hanno definito il concetto di virulenza in termini di "fattori di virulenza", ovvero di molecole prodotte dal microrganismo, che quando presenti, provocano un danno all'ospite, ma quando assenti perché mutati per esempio, questa capacità risulta compromessa [101]. Questa mutazione non influenza la capacità del microrganismo di crescere e riprodursi. Quindi, i fattori di virulenza possono avere una moltitudine di funzioni [102]:

- la capacità di indurre interazioni microbo-ospite;

- la capacità di invadere l'ospite;
- la capacità di crescere nella cellula ospite;
- la capacità di eludere/interferire con le difese dell'ospite.

4.2 Patogeni coinvolti nella malattia parodontale distruttiva

E' stato dimostrato che diversi agenti patogeni sono coinvolti nella malattia parodontale distruttiva. Di seguito ne vengono descritti alcuni dei più importanti.

4.2.1 Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Durante gli ultimi due decenni, è stato dimostrato che *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* può essere considerato come un importante agente patogeno nelle malattie parodontali distruttive [103-105]. La specie è rappresentata da sei sierotipi (a-f). Il sierotipo b è più frequente in lesioni parodontali attive, mentre i sierotipi a e c hanno una forte associazione con la salute parodontale [105]. Il sierotipo b è più spesso associato alla parodontite aggressiva rispetto a quella cronica. Il sierotipo b è stato anche trovato più frequentemente nei soggetti con parodontite di età inferiore ai 18 anni (60,9 %) rispetto a soggetti di età superiore a 35 anni (29 %). La distribuzione globale dei diversi sierotipi di *A. actinomycetemcomitans* non è omogenea, il che implica che l'associazione tra il sierotipo e lo stato di salute parodontale può dipendere dalla posizione geografica e/o dall'etnia della popolazione di studio [105, 106].

A. actinomycetemcomitans è stato inizialmente identificato come patogeno parodontale negli studi di parodontite aggressiva localizzata (LAP). La malattia parodontale distruttiva ad insorgenza precoce è spesso associata con *A. actinomycetemcomitans*, tantoché la prevalenza di tale microrganismo in questo gruppo di pazienti è del 40-100% [104]. *A. actinomycetemcomitans* è anche associato con le lesioni parodontali nei pazienti con sindrome di Papillon-Lefèvre, i quali mostrano una diminuita funzione dei monociti, dei neutrofili e linfociti, parzialmente causata da infezione da citomegalovirus [104]. Anche nella popolazione adulta con parodontite tale microrganismo è molto frequente (30-40 %) e la proporzione del microbiota sottogengivale comprendente *A. actinomycetemcomitans* aumenta notevolmente con l'aumentare della profondità di sondaggio parodontale [104] e con l'attivazione della malattia stessa [107]. *A. actinomycetemcomitans*

sembra essere particolarmente frequente nelle lesioni parodontali refrattarie, possibilmente a causa della capacità dell'organismo di invadere il tessuto gengivale e quindi di eludere gli sforzi per la pulizia operati dal dentista e dal paziente [104].

A.actinomycetemcomitans è stato dimostrato di possedere una miriade di fattori di virulenza che aumentano la sua sopravvivenza nella cavità orale e gli consentono di eludere le strategie protettive dell'ospite [108]. Molti di questi fattori di virulenza possono essere coinvolti nella patogenesi della parodontite e includono:

- Fattori che favoriscono la colonizzazione e la persistenza nella cavità orale: adesine, invasine, batteriocine, la resistenza agli antibiotici;
- I fattori che interferiscono con le difese dell'ospite: leucotossina, inibitori chemiotattici, proteine immunosoppressive, proteine leganti la porzione Fc degli anticorpi;
- Fattori che distruggono i tessuti dell'ospite: citotossine, collagenasi, agenti che stimolano il riassorbimento osseo, stimolatori dei mediatori di infiammazione;
- I fattori che inibiscono la riparazione dei tessuti dell'ospite: inibitori della proliferazione dei fibroblasti, inibitori della formazione ossea.

4.2.2 *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis è il secondo patogeno parodontale molto studiato. La maggior parte degli autori concorda sul fatto che i bambini e adolescenti con parodonto sano hanno una carica molto bassa, o addirittura non sono portatori di *P. gingivalis* nel microbiota sottogengivale. *P. gingivalis* è una specie descritta nel 37-63% dei pazienti affetti da parodontite giovanile localizzata; tuttavia, l'organismo rappresenta solo una piccola parte del microbiota nelle fasi iniziali della malattia. Al contrario, *P. gingivalis* è un microrganismo predominante nella parodontite giovanile generalizzata e può assumere un importante significato patogenetico nella malattia. Il 40-100% dei pazienti adulti con parodontite può ospitare il microrganismo, con proporzioni crescenti nelle tasche parodontali profonde [104, 109] e attive [110]. Diversi studi hanno suggerito che la prognosi del trattamento parodontale è migliore se alcuni agenti patogeni, in particolare *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*, non vengono più rilevati dopo la terapia [111-116], e che i siti positivi sono a maggior rischio di recidive [110, 117-121]. Nonostante il

fatto che il trattamento parodontale meccanico non chirurgico e il controllo della placca realizzato autonomamente siano efficaci nel ridurre il numero di *P. gingivalis* in un sito, *Prevotella intermedia* e *A. actinomycetemcomitans* tendono a ristabilirsi rapidamente nella maggior parte dei soggetti, quindi il controllo efficace della placca è costantemente richiesto [122, 123].

4.2.3 *Tannerella forsythia*

T. forsythia è il secondo elemento del complesso rosso definito da Socransky e collaboratori [124], il cui ruolo preciso nella grave distruzione ossea e tissutale rimane da stabilire a causa delle sue esigenze di crescita [125]. Questo microrganismo è stato spesso isolato insieme a *P. gingivalis* da casi di parodontite cronica attiva, ed è stato frequentemente associato a malattie parodontali severe, refrattarie, precoci [102]. I fattori di rischio per la parodontite in cui è maggiore la frequenza di rilevamento di *T. forsythia* sono da ricercare soprattutto nel fumo. *T. forsythia* sembra invadere la tasca parodontale con *P. gingivalis* (e *T. denticola*), e insieme queste specie possono produrre molecole ad attività apoptotica che impediscono ai globuli bianchi dell'ospite di esercitare la propria azione protettiva [102].

4.2.4 *Treponema denticola*

T. denticola è un membro dei treponemi orali e la sua presenza si osserva solo in caso di parodontite [102, 126]. Gli studi di Socransky e collaboratori hanno sottolineato la convivenza di specie batteriche orali che si raggruppano in cluster e si succedono, determinando la progressione della malattia parodontale e la gravità. Il cluster composto dalle specie altamente proteolitiche *P. gingivalis*, *T. forsythia*, e *T. denticola*, il cosiddetto "complesso rosso", è fortemente associato con la parodontite avanzata e progressiva [127]. Elevati livelli di *T. denticola* sono stati identificati insieme ad una dozzina di altre specie in siti contenenti solfuri, i cui livelli nelle tasche riflettono la percentuale di batteri presenti perché i solfuri sono rilasciati come prodotto finale del loro metabolismo [127]. I fattori di virulenza noti che determinano l'invasività dei treponemi sono le varie proteine coinvolte nella motilità flagellare e nella chemiotassi, le proteasi e le petidasi

[127]. I patogeni parodontali nel complesso proteolitico hanno la capacità di degradare componenti umani della matrice per migliorare la loro penetrazione nei tessuti e di quella delle specie vicine.

4.2.5 *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum, che comprende le tre sottospecie (*nucleatum*, *vincentii*, e *polymorphum*), è un marker significativo di malattia parodontale distruttiva in soggetti adulti [128, 129], si trova più spesso nei siti attivi [130], ed è associato ai livelli più alti di solfuri nelle tasche di soggetti con parodontite cronica [131].

Questo parodontopatogeno è coinvolto in una varietà di infezioni non orali come quelle pleuropolmonari, quelle del tratto urinario, endocarditi, e infezioni amniotiche [132, 133]. La capacità di *F. nucleatum* di co-aggregarsi con molti altri batteri della placca suggerisce che funge da “ponte” microbico tra i batteri che colonizzano negli stadi iniziali e quelli che occupano la tasca nelle fasi più avanzate. Inoltre, *F. nucleatum* è stato descritto come un importante organismo iniziatore perché promuove alterazioni chimico-fisiche del solco gengivale, e consente ai patogeni successivi di stabilirsi e proliferare. Un cambiamento importante associato all'insorgenza della malattia parodontale è l'alcalinizzazione del solco gengivale. L'ammoniaca prodotta dal metabolismo degli amminoacidi del fluido crevicolare gengivale e rilasciato dalla rottura dei tessuti dell'ospite porta ad un aumento del pH sopra 8, promuovendo così la proliferazione di batteri patogeni sensibili agli acidi. Inoltre, *F. nucleatum* altera la sua espressione genica in funzione del pH. Recentemente è stato inoltre suggerito che *F. nucleatum* facilita l'invasione delle cellule dell'ospite da parte di *P. gingivalis* [134] e che la sua capacità di co-aggregazione per formare un biofilm può essere importante nella persistenza dell'organismo durante la transizione dallo stato di salute alla malattia [135].

4.2.6 *Prevotella intermedia*

P. intermedia è un importante patogeno parodontale, significativamente prevalente in pazienti con parodontite cronica, parodontite aggressiva, parodontite distruttiva, gengivite in età puberale e gengivite ulcerativa necrotizzante acuta [124, 136-138]. *P. intermedia* è più frequente nelle tasche più profonde di 3 mm ed è strettamente

correlato al BOP. Inoltre, i siti colonizzati sia da *T. forsythia* e da *P. intermedia* hanno una peggiore risposta al trattamento.

4.2.7 *Campylobacter rectus*

C. rectus è stato spesso rilevato nelle tasche sottogengivali profonde [139-148], ed è stato implicato in casi di parodontite adulta, parodontite a progressione rapida, e parodontite associata con alcune condizioni come la gravidanza [149, 150], oppure associate ad altre malattie come AIDS e diabete [151, 152]. Studi longitudinali suggeriscono che *C. rectus* è una delle specie principali che caratterizza i siti che passano dallo stato di salute alla malattia [153], ed i suoi livelli sono ridotti dopo il trattamento parodontale [114, 154].

4.2.8 *Eikenella corrodens*

E. corrodens può essere causa anche di infezioni extra-orali, tra cui ascessi, endocardite, artrite, osteomielite, cheratite, congiuntivite e cellulite [155-159]. *E. corrodens* si trova prevalentemente nella placca sottogengivale dei pazienti con parodontite avanzata [160-162]. La frequenza di rilevamento di *E. corrodens* dai solchi sottogengivali di pazienti affetti da parodontite adulta e giovanile è del 52% e 59% [156]. In pazienti con parodontite, *E. corrodens* è correlato ai siti con malattia attiva sia prima che dopo terapia parodontale [163].

4.2.9 *Parvimonas micra*

P. micra è considerato un commensale naturale della cavità orale, ma livelli elevati di questo organismo sono associati con parodontite cronica, parodontite aggressiva e con i siti parodontali in distruzione attiva [124, 162, 164-171]. Nonnenmacher e collaboratori [160] hanno valutato la prevalenza di *P. micra* in diversi gruppi di malattie parodontali, e hanno riportato una prevalenza del 6,3% nella parodontite rapidamente progressiva, 5,1% nella parodontite cronica e del 2,9% nella parodontite aggressiva. Livelli significativamente più elevati di *P. micra* si osservano nelle tasche parodontali più profonde e in

pazienti fumatori [172, 173]. *P. micra* è stata anche associata con infezioni dei canali radicolari dentali [174] e con infezioni dentoalveolari [175, 176].

4.3 Ecologia tra le specie batteriche e l'ospite

I batteri parodontali possono essere responsabili dell'inizio o della progressione della parodontite. Tra questi, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *T. denticola* si trovano spesso in combinazione nelle tasche parodontali, quindi insieme contribuiscono alla distruzione del tessuto parodontale perché hanno un importante effetto nell'attivazione del processo distruttivo mediato dal sistema immunitario dell'ospite [155, 177]. Diversi studi suggeriscono che nelle tasche parodontali risiedono diversi complessi con diverse specie microbiche. Il complesso formato da *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* è fortemente associato ai parametri clinici di parodontite cronica e prende il nome di complesso rosso [129, 178, 179]. Il complesso arancio, che comprende *P. intermedia* e *F. nucleatum*, precede il complesso rosso nella colonizzazione e proliferazione della tasca parodontale [124]. I principali determinanti ecologici sono probabilmente forniti dall'interazione tra l'ospite e le specie batteriche che risiedono nelle tasche parodontali, ma anche tra le diverse specie. Queste interazioni possono produrre una serie di pressioni selettive che determinano la composizione del microbiota nella tasca parodontale [180].

I dati di numerosi studi clinici forniscono l'evidente associazione tra le specie batteriche e la parodontite cronica, ma gli stessi dati provenienti dai diversi paesi/popolazioni evidenziano le diversità nella composizione del microbiota sottogengivale [129, 169, 181, 182]. Probabilmente queste differenze sono legate a fattori ambientali, economici e genetici [172, 183, 184].

Lo studio del microbiota di popolazione assume particolare importanza non solo per comprendere le sue implicazioni nella patogenesi della parodontite, ma anche per valutarne l'impatto sull'esito post-terapia.

4.4 Metodologia applicata negli studi microbiologici

Ad oggi sono disponibili numerosi metodi, ciascuno con i propri vantaggi e svantaggi, per determinare la presenza di parodontopatogeni. I metodi più utilizzati consistono nella

coltura su idonei terreni di coltura e nella rilevazione del DNA batterico mediante tecniche di biologia molecolare. Questi metodi variano notevolmente in relazione alla valutazione quantitativa perché ciascuno di essi ha un limite al di sotto del quale non riesce a rilevare la presenza di microrganismi o di DNA.

4.4.1 Coltura

La caratterizzazione del microbiota associato alla malattia parodontale mediante tecnica colturale è fortemente influenzata dalla qualità del trasporto del campione in laboratorio. La sensibilità della coltura è stata notevolmente migliorata con l'impiego di procedure di manipolazione ed incubazione in ambiente anaerobio e con l'impiego di terreni non selettivi e dallo sviluppo di terreni che permettano l'isolamento o l'arricchimento delle specie coinvolte nella patologia parodontale. Ciononostante, le tecniche colturali dipendono da numerose variabili legate all'operatore e all'attrezzatura disponibile e ai metodi identificativi usati, quindi i risultati degli studi basati su tecniche colturali sono difficilmente confrontabili. Inoltre, gli studi condotti con tecniche di biologia molecolare dimostrano che oltre il 50% delle specie presenti nelle tasche parodontali sono non coltivabili [185].

4.4.2 Metodo immunometrici

Metodi che impiegano gli anticorpi sono stati tra i primi ad essere utilizzati per determinare la presenza di particolari specie di microrganismi senza doverli necessariamente coltivare. Infatti tali metodiche hanno permesso di valutare la prevalenza relativamente alta di *T. forsythia* nei campioni di placca sottogengivale di soggetti con parodontite cronica [186]. Le tecniche di immunofluorescenza e i test immunoenzimatici (ELISA) sono stati impiegati con successo per esaminare una gamma limitata di specie batteriche in un gran numero di campioni di placca (precedentemente analizzate e caratterizzate con tecniche colturali) [186-192]. Queste tecniche dipendono dalla specificità degli anticorpi sviluppati per riconoscere taxa specifici. Queste tecniche hanno il vantaggio di essere rapide e meno costose della coltura. Tuttavia esse sono limitate alle specie per le quali sono stati sviluppati i reagenti. Inoltre, è difficile

utilizzare queste tecniche, in particolare quella di immunofluorescenza, per valutare un gran numero di specie in un gran numero di campioni di placca.

4.4.3 Test di biologia molecolare

Negli ultimi vent'anni, la reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata utilizzato per rilevare la presenza di determinate specie batteriche nei campioni di placca sottogengivale [193-198]. Nelle giuste condizioni, questo metodo è rapido e semplice ed in grado di rilevare piccolissime quantità di sequenze genomiche di una data specie. A seconda della strategia utilizzata, la PCR può fornire informazioni sulla presenza o assenza di una o più specie nel campione, oppure può determinare la quantità di genoma batterico (PCR *real-time*). Questo metodo ha il vantaggio di essere specifico, sensibile, e fornisce la quantificazione del livello di determinate specie in campioni di biofilm, quindi risulta particolarmente adatta agli studi in parodontologia. Tuttavia, questa tecnica non permette lo screening di numerosi campioni sui quali determinare la quantità di un gran numero di specie batteriche.

Sonde di DNA forniscono un altro approccio per l'identificazione e la quantificazione di specie batteriche in comunità complesse come la placca dentale [199].

- Le sonde oligonucleotidiche sono brevi sonde progettate per identificare le regioni uniche di DNA nelle cellule di una determinata specie batterica. È stato suggerito che queste sonde sono altamente specifiche e la probabilità di reazioni crociate con altre specie è molto bassa. Numerosi studi hanno utilizzato queste sonde per identificare i batteri parodontali [200-203]. Poiché il bersaglio delle sonde oligonucleotidiche è un segmento limitato del DNA di un organismo, queste tendono ad essere meno sensibili per la rilevazione di una bassa carica batterica. Tuttavia, esistono sonde oligonucleotidiche dirette verso bersagli genomici che si ripetono più volte, come il 16S rRNA, che hanno la potenzialità di essere più sensibili. Fino ad oggi, non ci sono stati studi su larga scala del microbiota sottogengivale in cui siano state utilizzate sonde oligonucleotidiche per la rilevazione e la quantizzazione di una vasta gamma di specie batteriche.

- Le sonde di DNA genomico sono state ampiamente applicate per valutare la composizione della placca gengivale [124, 178, 179, 204-209]. Le sonde genomiche vengono costruite utilizzando l'intero genoma di una specie batterica e quindi possono essere molto sensibili. Le sonde di DNA possono essere molto efficaci per il rilevamento di specie batteriche, ma solo un numero limitato di sonde può essere impiegato per quantificare tanti campioni.
- Le tecniche di ibridazione in formato scacchiera, sia con modalità di ibridazione diretta o inversa, possono estendere notevolmente il numero di campioni valutati per un'ampia gamma di specie batteriche. Questa tecnica permette di rilevare almeno 28 taxa in 44 campioni su una singola membrana di nylon [210]. La tecnica ha il vantaggio di essere rapida, relativamente poco costosa, e potenzialmente specifica per specie, genere o a livello di famiglie. Ha lo svantaggio di non consentire una quantificazione precisa e di necessitare di un passaggio di amplificazione.
- La tecnica di ibridazione Checkerboard DNA - DNA offre una serie di vantaggi per lo studio di molte specie batteriche in un gran numero di campioni contenenti complessi raggruppamenti di microrganismi. La tecnica scacchiera è rapida, sensibile, e relativamente poco costoso. L'intero campione può essere impiegato senza diluizione o amplificazione. La tecnica, però, può rilevare solo le specie per le quali sono disponibili le sonde di DNA. Se correttamente impiegata, la tecnica a scacchiera di ibridazione DNA-DNA e altre tecniche di microbiologica rapida permettono di descrivere il microbiota in siti con diverse condizioni cliniche locali, ma anche in soggetti con diverse condizioni sistemiche. Questa tecnica è stata usata per studi microbiologici su campioni di placca sottogengivale di pazienti con parodontite provenienti da diverse zone geografiche e di diversa etnia [179]. Nonostante le sonde genomiche di alcune specie non siano altamente specifiche, il metodo è sensibile e fornisce informazioni semi-quantitative di alcune specie target che non sono influenzate dalle condizioni di trasporto in laboratorio. La metodologia è standardizzata e quindi i risultati dei diversi studi sono confrontabili.

5. Diagnosi della malattia parodontale

La diagnosi delle malattie parodontali deve essere effettuata da tutti i dentisti, su tutti i pazienti, su tutti i denti, applicando le appropriate metodiche cliniche. La diagnosi di parodontite si ottiene sulla base di informazioni cliniche, quali la misura del livello di attacco del tessuto parodontale alla radice del dente e le evidenze radiografiche del riassorbimento osseo [211]. Il clinico può anche avvalersi di un altro parametro considerato il principale indicatore clinico di infiammazione parodontale, il cosiddetto *bleeding on probing* (BOP), che consiste nel valutare se la tasca reagisce con il sanguinamento al sondaggio. La presenza di BOP correla positivamente con la dimensione dell'infiltrato infiammatorio nei tessuti gengivali adiacenti [212] con il rischio di progressione della parodontite [213] e con la presenza di mediatori pro-infiammatori (IL-1 β e IL-8) e di marcatori di distruzione ossea (metalloproteinasi-8) negli essudati gengivali [214].

La diagnosi parodontale deve essere fatta interpretando ed elaborando i dati derivanti dall'anamnesi e dall'esame obiettivo; se indicato, integrati da esami radiografici e da esami di laboratorio.

5.1 Anamnesi medica e dento-parodontale

Alcuni fattori possono influenzare l'insorgenza e la progressione delle malattie parodontali. I fattori di maggior interesse sono:

- fumo [23, 24, 215-226];
- alcuni farmaci che influenzano gli aumenti di volume gengivale (nifedipina, difenilidantoina, ciclosporina) [227-233];
- diabete e alcune malattie sistemiche rare (tra cui: S. di Ehlers, S. di Papillon-Lefevre) [234, 235];

5.2 Esame obiettivo

L'ispezione valuta:

- topografia, colore e forma della gengiva, delle mucose e delle strutture annesse [236-240];
- presenza di placca batterica [241, 242];
- presenza di fattori ritentivi di placca (tartaro, carie, restauri debordanti,

- malposizioni ed affollamenti dentari) [243-250];
- migrazioni dentarie [251, 252].

5.3 Mobilità

La mobilità dentale può aumentare a seguito di malattia parodontale associata a placca. Deve essere posta diagnosi differenziale con altre cause di ipermobilità, come il trauma occlusale, la riduzione dell'osso di supporto, il trattamento ortodontico in atto [211, 253-255].

5.4 Sondaggio Parodontale

Il sondaggio è la manovra diagnostica fondamentale per valutare lo stato di salute o di malattia dei tessuti parodontali [256-259]. Viene effettuato, mediante una sonda parodontale, applicando una forza di circa 30 grammi, lungo tutta la circonferenza di ogni elemento dentale fra dente e gengiva [260-272]. Il sondaggio permette di rilevare [237, 273, 274]:

- la profondità di solchi gengivali e/o tasche parodontali;
- il livello di attacco clinico;
- il coinvolgimento delle forcazioni;
- il sanguinamento;
- la presenza di tartaro subgengivale e/o di restauri incongrui.

5.5 L'esame radiografico endorale periapicale

L'esame radiografico endorale periapicale viene effettuato dove consenta di ottenere nuove informazioni indispensabili alla diagnosi e/o alla formulazione del piano di trattamento [130, 275-280].

5.6 Esami di laboratorio

Nei soggetti in cui la diagnosi parodontale fa emergere la presenza di parodontiti molto gravi, soprattutto nelle forme ad insorgenza precoce o associate a patologie sistemiche, può essere indicato un supplemento diagnostico, mediante esami di laboratorio [141, 240, 281-286]. Il

loro impiego è giustificato nel caso in cui il loro esito possa modificare o perfezionare il trattamento.

5.7 Esame microbiologico

In alcune particolari situazioni cliniche i test microbiologici possono risultare utili per orientare la terapia antimicrobica. La coltura è l'unico esame microbiologico che permette di effettuare un antibiogramma. I test possono venire utilizzati per il monitoraggio delle parodontiti ad insorgenza precoce e ad evoluzione rapida. La positività dell'esame indica un aumento del rischio di malattia pur non indicando con certezza i siti ammalati. L'assenza di specie patogene nelle tasche indica invece uno stato di stabilità del sito [112, 141, 187, 188, 281-290].

6. Terapia parodontale

6.1 Terapia causale

La terapia causale comprende tutta una serie di metodiche appropriate di rimozione meccanica della placca batterica del cavo orale mediante l'utilizzo di spazzolino e strumenti per la pulizia delle superfici approssimali [291]. La terapia causale viene eseguita dal paziente mediante l'igiene orale domiciliare quotidiana e dal clinico. Il controllo meccanico della placca sopragengivale può essere affiancato da un controllo chimico, tenendo però in considerazione il fatto che, a lungo termine, gli agenti chimici antiplacca mostrano una riduzione dei benefici e la comparsa di effetti indesiderati [292].

6.2 Terapia meccanica non chirurgica

La terapia meccanica non chirurgica (levigatura radicolare) deve costituire il trattamento di base delle parodontiti. Essa prevede la strumentazione meccanica, sopra e sottogengivale, delle superfici radicolari, allo scopo di renderle biologicamente compatibili con i tessuti parodontali mediante l'eliminazione dei depositi duri e molli [293-295].

I risultati attesi della levigatura radicolare includono [296, 297]:

- riduzione del sanguinamento al sondaggio (al di sotto del 30%);
- riduzione della profondità di sondaggio;

- guadagno del livello clinico di attacco per tasche > 3mm;
- recessione del tessuto marginale.

La maggior parte dei pazienti affetti da parodontite può essere trattata con successo con terapia non chirurgica se associata ad una efficace terapia di supporto [295, 298, 299].

6.3 Terapia antimicrobica

6.3.1 Terapia antimicrobica sistemica

L'obiettivo della terapia sistemica è concorrere alla massima riduzione dei microrganismi patogeni parodontali, in situazioni cliniche come ascessi parodontali, parodontiti ad insorgenza precoce, parodontiti refrattarie al trattamento meccanico, gengivite necrotizzante e parodontite necrotizzante. Vari sono i regimi terapeutici, monoterapici o in associazione, proposti in letteratura nelle diverse situazioni cliniche [300] ma l'associazione metronidazolo + amoxicillina [301-303] o ciprofloxacina [304, 305] in caso di allergia alle beta lattamine, risulta essere la combinazione farmacologica clinicamente più efficace nelle parodontiti ad insorgenza precoce. La continua emergenza di specie batteriche antibiotico-resistenti rende necessaria una limitazione all'uso degli antibiotici in terapia parodontale [142, 306, 307].

6.3.2 Terapia antimicrobica topica

La terapia antimicrobica topica ha lo scopo di ridurre la microflora patogena in siti localizzati che non rispondono alla terapia meccanica [308, 309]. Si esegue mediante l'uso di sostanze antimicrobiche applicate localmente quali: fibre di tetraciclina Hcl, gel di metronidazolo, polimero di doxiciclina Hcl, minociclina HCl (pomata), chips di clorexidina. I risultati attesi in seguito a terapia antimicrobica topica consistono nella riduzione della profondità di sondaggio e del sanguinamento al sondaggio a medio termine [310-318].

6.4 Terapia chirurgica

6.4.1 Terapia chirurgica per l'eliminazione e/o la riduzione delle tasche

Il trattamento chirurgico deve essere considerato come un mezzo aggiuntivo alla

terapia causale e alla terapia meccanica non chirurgica [295, 319, 320].

Le diverse tecniche chirurgiche devono essere valutate primariamente in base alla loro capacità di ridurre tasche profonde e correggere altre situazioni che favoriscono l'accumulo di placca batterica, quali alterazioni dell'architettura gengivale ed ossea o coinvolgimento delle forcazioni [321-323]. L'obiettivo primario della terapia chirurgica è quello di facilitare l'igiene orale domiciliare instaurando una morfologia gengivale, ossea e dentale conforme al raggiungimento di questo obiettivo [295, 319-321, 324]. Diverse procedure chirurgiche, variamente combinate, consentono di modificare l'anatomia gengivale/ossea/dentale [320, 321, 325-330]. I risultati attesi dalla terapia chirurgica consistono nella riduzione del sanguinamento al sondaggio, riduzione della profondità di sondaggio, modificazioni del livello clinico di attacco e recessione del tessuto marginale [320, 321, 326-330].

6.4.2 Terapia chirurgica rigenerativa

Lo scopo della chirurgia rigenerativa è quello di ottenere un guadagno di tessuto di supporto attorno ad elementi dentari gravemente compromessi dalla malattia parodontale [331]. Questo obiettivo può essere raggiunto solo se la terapia causale e la levigatura radicolare sono state effettuate con successo [332]. I risultati attesi della terapia rigenerativa includono la riduzione della profondità di sondaggio, il guadagno del livello clinico di attacco e la recessioni del tessuto marginale [333, 334].

6.4.3 Chirurgia Muco-Gengivale

La chirurgia mucogengivale comprende l'insieme delle procedure atte alla correzione di difetti di morfologia, posizione e/o quantità dei tessuti molli parodontali [335, 336]. I risultati attesi della terapia muco-gengivale includono: il guadagno del livello clinico di attacco, l'eliminazione o riduzione delle recessioni del tessuto marginale e l'incremento di tessuto cheratinizzato.

7. Materiali e Metodi di studio

7.1 Pazienti, valutazioni cliniche e raccolta dei campioni

Il presente studio osservazionale è stato condotto arruolando 352 pazienti consecutivi affetti da parodontite cronica. I criteri di inclusione sono i seguenti:

- diagnosi di parodontite cronica;
- presenza di almeno 12 denti (ad eccezione dei terzi molari);
- nessuna terapia parodontale nei sei mesi precedenti l'arruolamento;
- assenza di malattie sistemiche come il diabete, artriti, colite ulcerativa, morbo di Crohn, infezioni da HIV, cancro e cardiopatie;
- nessuna terapia antibiotica e/o antiinfiammatoria nel mese precedente l'arruolamento;
- donne non in stato di gravidanza.

Tutti i pazienti arruolati sono stati esaminati clinicamente e radiologicamente. I dati riguardanti la profondità di tasca (PPD), il livello clinico di attacco (CAL), il sanguinamento al sondaggio (BOP) e la presenza di pus sono stati ottenuti da siti selezionati mediante l'uso di sonde calibrate standard (Hu Friedy PCP11) a partire dal margine gengivale fino al fondo della tasca parodontale.

La raccolta di campioni di placca è stata sempre eseguita prima dell'inizio del trattamento.

Per ciascun paziente sono stati selezionati 5 denti compromessi da un punto di vista parodontale ed è stato esaminato almeno un dente per quadrante. Prima del campionamento, la placca sopragengivale è stata accuratamente rimossa mediante una curette di Gracey e il sito è stato isolato dalla contaminazione salivare con un cotton roll. Il prelievo microbiologico è stato eseguito in ogni tasca parodontale inserendovi un cono di carta sterile per 10 secondi. Tutti i coni di carta raccolti dalle tasche parodontali di ciascun paziente sono stati raggruppati in una provetta sterile ed inviati al laboratorio per la valutazione microbiologica.

7.2 Analisi Microbiologica

I campioni sono stati inviati al laboratorio GABA International GmbH (Munster, Germany) per l'analisi in PCR *real-time*. Questa metodica è stata sviluppata e validata da Carpegen GmbH [337]. Brevemente, dopo l'aggiunta di una sospensione di Wilkins–Chalgren, i campioni sono stati agitati per 30 secondi per ottenere una sospensione omogenea. Per l'analisi in PCR

real-time, un volume di 0.5 ml della sospensione è stato centrifugato (15,000 g at 41° C) per 10 minuti e le cellule raccolte sono state immediatamente processate mediante analisi automatica meridol® Perio Diagnostics (GABA International, Svizzera). Questa metodica determina la carica batterica totale e la carica di 6 principali parodontopatogeni presenti in un campione con una sensibilità analitica di 100 cellule per ciascuna tipologia di microrganismo: *Aggregatibacterium actinomycetemcomitans* (Aa), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi), *Tannerella forsythia* (Tf) e *Treponema denticola* (Td).

Seguendo i principi di Socransky, i microrganismi rilevati sono stati raggruppati nel complesso rosso (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) e complesso arancio (*P. intermedia*, *F. nucleatum*).

7.3 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata condotta per calcolare il tasso di prevalenza e gli errori standard. Il coefficiente di correlazione Rho Spearman è stato usato per valutare la correlazione tra la carica batterica e la maggiore profondità di sondaggio della tasca, il numero di siti sanguinanti al sondaggio e il numero di siti con pus. Il test χ^2 è stato usato per confrontare la prevalenza dei microrganismi tra i soggetti fumatori e non fumatori. Ciascun paziente è stato identificato con un valore mediano delle 5 profondità di tasche misurate. La regressione logistica binaria incondizionale (metodo a rovescio) è stata usata per spiegare quale tra le seguenti variabili (età, genere, fumo, PPD, numero di siti con BOP, numero di siti con pus) è associata con la presenza delle specie microbiche. $\alpha = 0.05$; per le comparazioni multiple è stata aggiustata a 0.003.

8. Risultati

Le caratteristiche cliniche e demografiche dei 352 pazienti sono presentate nella Tab. 1

Tab 1. Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti arruolati.

Caratteristiche	
% Donne	58
Età (media ± SD)	47 ± 12
% Fumatori	29
PPD (media ± SD)	6 ± 2
CAL (media ± SD)	7 ± 2
% siti con BOP (± SE)	31 ± 0.01
% siti con pus (± SE)	0.04 ± 0.02

SD: deviazione standard; SE: errore standard; PPD: profondità di tasca al sondaggio misurata in mm; CAL: livello clinico di attacco misurato in mm; BOP: sanguinamento al sondaggio.

I risultati della PCR *real-time* mostrano che in ogni paziente almeno uno dei parodontopatogeni è sempre stato rilevato, ma la frequenza relativa di ciascuno è diversa (Tab. 2). Fn è stato il batterio con una maggiore prevalenza, mentre Aa è stato il meno prevalente. In relazione alla carica batterica media, i microrganismi del complesso rosso si sono rilevati i più abbondanti, rappresentando il 44% della carica batterica totale.

Tab 2. Numero e prevalenza dei pazienti positivi per i microrganismi ricercati nella popolazione di studio (N=352). Pazienti con carica microbica al di sotto del limite di sensibilità del test sono considerati negativi.

Microrganismo		Prevalenza		Carica batterica media ^a		Proporzione della carica batterica ^b	
		N (%)	CI 95% (%)	(*10 ⁵ cells ^c)	IR	(%)	CI 95% (%)
Complesso rosso	Tf	306 (87)	85-89	12	57500 – 3550000	17	13-21
	Td	289 (82)	80-84	11	2525 – 5525000	15	11-19
	Pg	275 (78)	76-80	8.55	250 – 8125000	12	9-15
Complesso arancio	Fn	334 (95)	94-96	1.45	11000 – 700000	2	1-3
	Pi	232 (66)	63.5-68.5	1.07	0 – 2200000	2	1-3
	Aa	5 (18.5)	17-21	0	-	-	-

CI: intervallo di confidenza; IR: range interquartile; ^a: carica batterica media di ciascun microrganismo ricercato; ^b: proporzione della carica batterica di ciascun microrganismo ricercato sulla carica totale media; ^c: cellule batteriche/campione di placca

Il coefficiente di correlazione di Spearman tra la carica batterica e la media dei 5 PPD dei siti di ogni paziente è sempre stato positivo e significativo, con valori più alti per Tf (r=0.52, p=0.0001) e più bassi per Aa (r=0.15, p=0.04). La carica batterica correla statisticamente con il numero dei siti con BOP e il coefficiente varia da 0.14 (p=0.01) per Pi a 0.39 (p=0.001) per Td.

Con l'eccezione di Aa e Pi, i coefficienti di correlazione tra la carica batterica e il numero di

siti con pus sono statisticamente significativi e variano da 0.18 (p=0.001) per Fn a 0.26 (p=0001) per Td.

In generale si è osservata una più alta prevalenza dei sei parodontopatogeni tra i fumatori rispetto ai non fumatori; questa osservazione è statisticamente supportata per Td e Tf (rispettivamente 89% vs 79%, p = 0.04; 96% vs 83%, p = 0.002). Non si sono osservate differenze statisticamente significative nella profondità delle 5 tasche parodontali dei pazienti fumatori rispetto ai non fumatori, così come non esistono differenze in questi due gruppi tra i siti con BOP e con pus.

I risultati della regressione logistica tra i parodontopatogeni e le variabili studiate sono riportati in Tab. 3.

Tab 3. Regressione logistica tra le specie microbiche e il genere, età, fumo, BOP e PPD. Solo le variabili con un contributo significativo al modello progressivo sono riportate.

Microorganismo	PPD (mm)		Numero di siti con BOP		Genere ^a		Fumo ^b		Età (anni)	
	OR	CI 95%	OR	CI 95%	OR	CI 95%	OR	CI 95%	OR	CI 95%
Tf	1.73	1.37-2.20	1.35	1.02-1.80	-	-	4.87	1.63-14.53	-	-
Td	1.44	1.19-1.74	1.50	1.16-1.93	-	-	2.44	1.14-5.24	-	-
Pg	1.40	1.17-1.67	1.34	1.09-1.65	1.67	1.02-2.75	-	-	1.03	1.01-1.06
Fn	2.02	1.43-2.86	-	-	-	-	-	-	-	-
Pi	1.32	1.16-1.52	-	-	-	-	-	-	-	-
Aa	-	-	1.27	1.10-1.47	-	-	-	-	-	-

^acategoria di riferimento: femmina; ^bcategoria di riferimento: non fumatore

Si osserva che all'aumentare dei valori di PPD aumenta la probabilità di trovare una delle specie ricercate, ad eccezione di Aa. Il fumo risulta associato con la presenza di Td e Tf, mentre BOP è associato con la presenza del complesso rosso e Aa. Tra i microrganismi ricercati, Pg è l'unico che correla significativamente con tutte le variabili esaminate, tranne che con il fumo.

9. Discussione

Nel campo della parodontologia si è a lungo pensato che il profilo microbiologico di una determinata malattia parodontale fosse simile nelle diverse regioni geografiche. Tuttavia i pochi studi pubblicati hanno dimostrato che il microbiota della placca di soggetti provenienti da diverse regioni geografiche è diverso nella composizione microbica [129, 169, 181, 182].

Questi studi sono stati condotti prevalentemente in Europa, USA, Sud America e più recentemente in Cina e Giappone. I risultati di questi studi devono essere interpretati e confrontati con cautela perché il diverso numero di siti campionati per ciascun paziente e la metodologia microbiologica impiegata hanno un forte impatto sulla proporzione di soggetti considerati positivi per una specie microbica.

I dati del presente studio offrono un quadro della distribuzione epidemiologica di sei importanti parodontopatogeni (Pg, Tf, Td, Pi, Fn, Aa) rilevati mediante PCR in una popolazione di pazienti adulti affetti da parodontite cronica. I parametri studiati sono relativi alla prevalenza e la carica microbica e la possibile correlazione con

- fattori demografici quali l'età e il genere,
- fattori legati allo stile di vita, come il fumo,
- parametri clinici, quali PPD, BOP e la presenza di pus

in un totale di 1760 siti parodontali di 352 pazienti.

I risultati della PCR *real-time* mostrano che i sei patogeni parodontali sono stati tutti rilevati e ciascun paziente è risultato positivo per almeno uno di questi.

La presenza di Fn è stata valutata nel 95% dei pazienti e questo dato è in linea con quello documentato da altri studi (80-100%) [181, 338-340]. Secondo i dati di uno studio [185], Fn è uno dei batteri gram-negativi anaerobi più abbondanti nei campioni di placca sopragengivale e sottogengivale sia nei soggetti sani, sia in quelli con parodontite. I dati del presente studio confermano l'ubiquità di Fn e supportano l'ipotesi che questo possa essere un microrganismo centrale nella colonizzazione del complesso rosso e nello sviluppo del biofilm microbico, come precedentemente suggerito da Socransky [124].

Il microrganismo meno prevalente nella popolazione studiata è Aa, la cui presenza è stata rilevata solo in 5 pazienti (18,5%). Questo risultato è in accordo con i dati di uno studio condotto sui lavoratori dello Sri Lanka [341], ed molto simile al range definito da altri autori (20-40%) [181, 338-340, 342, 343]. Negli ultimi due decenni, molti studi hanno documentato il ruolo patogeno di Aa nella parodontite aggressiva [103, 105, 344]. Inoltre, questa specie è rappresentata da 6 sierotipi (a-f) che hanno diversa attività patogena in funzione della diversa quantità di leucotossina prodotta. I ceppi produttori di elevate quantità di leucotossina sono associati a parodontite aggressiva [345]. La distribuzione globale dei

diversi sierotipi di Aa non è omogenea ed implica che l'associazione tra i sierotipi e lo stato parodontale può dipendere dalla regione geografica e/o dall'etnia della popolazione studiata [105, 106].

Aa è l'unico tra i batteri ricercati che non correla con PPD e altri parametri (ad eccezione della presenza di BOP); questa osservazione conferma i dati di Yano-Higuchi e collaboratori [182].

Tra le specie del complesso rosso, la prevalenza di Pg può essere confrontata con quella valutata da altri studi in cui sono state esaminate diverse popolazioni con diverse condizioni orali. In questo contesto, la prevalenza di Pg mostra i più alti valori (78%) ed è in accordo con la popolazione spagnola [181], keniota [342], norvegese [340], rumena [343]. Inoltre, tra i batteri esaminati Pg è l'unico che correla significativamente con tutte le variabili studiate, tranne il fumo. I dati di altri studi sono eterogenei: alcuni autori supportano la diversità del tasso di prevalenza tra i fumatori e non fumatori [346], altri, invece, non hanno trovato differenze statisticamente significative [347]. Riguardo ai parametri clinici, i dati del presente studio confermano parzialmente quelli di Mombelli e collaboratori che hanno trovato una correlazione positiva e significativa tra il numero dei siti profondi (PPD > 4 mm) e la prevalenza di Pg nei siti positivi [348].

I risultati di prevalenza di Aa e Pg di questo studio sono in accordo con alcuni studi recenti che hanno dimostrato una relazione inversa tra la carica batterica di questi batteri e hanno identificato una correlazione negativa tra la proporzione di Aa e il complesso rosso in pazienti con parodontite [349, 350]. Questi risultati supportano l'ipotesi che Aa sia un batterio coinvolto nella fase iniziale della malattia parodontale, la sua presenza non correla con il peggioramento delle condizioni cliniche e la sua carica è più alta nelle tasche parodontali superficiali. Di contro, Pg è associato con la progressione della malattia e le proporzioni di carica di questo batterio aumentano nelle tasche parodontali profonde [349, 350]. Lo studio di Preus e collaboratori ha dimostrato che la carica batterica di Pg aumenta progressivamente con la severità della malattia parodontale [341].

La presenza di Tf è stata valutata solo in pochi altri studi epidemiologici [182, 339] e il tasso di prevalenza documentato da questo studio è tra i più alti (87%) [339]. Oltre alla così alta prevalenza, Tf risulta il batterio che ha la più alta correlazione con PPD, la sua presenza è

associata ai siti con BOP e l'attitudine al fumo è un fattore di rischio per la colonizzazione e l'infezione. Queste osservazioni sono in accordo con altri studi pubblicati che hanno documentato che i fumatori hanno una carica significativamente più alta di Tf e sono a più alto rischio di infezioni da Tf rispetto ai non fumatori [182].

Un altro aspetto importante evidenziato dal presente studio consiste nel fatto che Pg e Tf infettano contemporaneamente il 95% dei pazienti studiati; questa osservazione conferma i dati di altri studi ecologici [182]. Come suggerito da Byrne e collaboratori Tf può facilitare la colonizzazione da parte di Pg perché fornisce un ambiente favorevole alla sua proliferazione [351].

Td è fortemente associato al fumo, come precedentemente dimostrato da Haffajee e collaboratori [346] e la sua carica correla statisticamente con il numero di siti con BOP e pus. La proporzione di parodontopatogeni sulla carica batterica totale calcolata in questo studio varia dal 2% per Fn e Pi al 17% per Tf. La carica delle specie rilevate con l'eccezione di Aa è in correlazione diretta con l'aumentare della profondità di tasca. Inoltre, la carica batterica dei 6 parodontopatogeni esaminati è significativamente più alta nei siti con BOP rispetto a quelli non sanguinanti. Questo parametro potrebbe predire la presenza del complesso rosso vista la loro associazione significativa.

Il presente studio epidemiologico ha due limiti principali:

- i microrganismi ricercati non rappresentano tutte le specie patogene parodontali;
- non è possibile estrapolare alcuna indicazione clinica perché i prelievi dai singoli siti di ogni paziente sono stati raggruppati per una analisi complessiva e il test molecolare non permette di eseguire un antibiogramma.

10. Conclusioni

Questo studio di prevalenza ha l'obiettivo di fornire informazioni epidemiologiche riguardanti la prevalenza di alcuni parodontopatogeni e la loro possibile associazione con parametri clinici e demografici in un ampio gruppo di pazienti adulti italiani affetti da parodontite cronica.

I risultati dimostrano che i 6 microrganismi studiati sono coinvolti nella malattia parodontale. I parametri clinici esaminati più importanti sono PPD e BOP: infatti, l'aumento della

profondità di sondaggio della tasca è direttamente correlato alla presenza e alla carica di tutte le specie studiate, ad eccezione di Aa e BOP è il parametro che potrebbe predire la presenza del complesso rosso.

Considerando le diverse forme di parodontiti, studi ulteriori in altri paesi sono necessari per rivelare le eventuali differenze microbiologiche nelle diverse popolazioni al fine di individuare approcci specifici nella prevenzione e terapia delle malattie parodontali.

11. Bibliografia

1. Marshall-Day CD, S.R., Quigley LF, *Periodontal disease: prevalence and incidence*. J Periodontol, 1955. **26**: p. 185-203.
2. Greene, J.C., *Oral hygiene and periodontal disease*. Am J Public Health Nations Health, 1963. **53**: p. 913-22.
3. Hernandez, M., et al., *Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis*. J Dent Res, 2011. **90**(10): p. 1164-70.
4. Petersen, P.E. and H. Ogawa, *The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control*. Periodontol 2000, 2012. **60**(1): p. 15-39.
5. Anerud, A., et al., *The natural history of periodontal disease in man. Changes in gingival health and oral hygiene before 40 years of age*. J Periodontal Res, 1979. **14**(6): p. 526-40.
6. Loe, H., et al., *Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age*. J Clin Periodontol, 1986. **13**(5): p. 431-45.
7. Burt, B., *Position paper: epidemiology of periodontal diseases*. J Periodontol, 2005. **76**(8): p. 1406-19.
8. Eke, P.I., et al., *Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010*. J Dent Res, 2012. **91**(10): p. 914-20.
9. Papapanou, P.N., *Epidemiology of periodontal diseases: an update*. J Int Acad Periodontol, 1999. **1**(4): p. 110-6.
10. Papapanou, P.N., *The prevalence of periodontitis in the US: forget what you were told*. J Dent Res, 2012. **91**(10): p. 907-8.
11. Dussault, G. and A. Sheiham, *Medical theories and professional development. The theory of focal sepsis and dentistry in early twentieth century Britain*. Soc Sci Med, 1982. **16**(15): p. 1405-12.
12. Pallasch, T.J. and M.J. Wahl, *The focal infection theory: appraisal and reappraisal*. J Calif Dent Assoc, 2000. **28**(3): p. 194-200.
13. Russell, A.L., *A system of classification and scoring for prevalence surveys of periodontal disease*. J Dent Res, 1956. **35**(3): p. 350-9.
14. Ramfjord, S., *Indices for prevalence and incidence of periodontal disease*. J Periodontol, 1959. **30**: p. 51-59.
15. Greene, J., Vermillion, JR. , *The oral hygiene index: a method for classifying oral hygiene status*. J Am Dent Assoc, 1960. **61**: p. 172-179.
16. Russell, A.L., *International nutrition surveys: a summary of preliminary dental findings*. J Dent Res, 1963. **42**(1)Pt 2: p. 233-44.
17. Goodson, J.M., et al., *Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease*. J Clin Periodontol, 1982. **9**(6): p. 472-81.
18. Lindhe, J., A.D. Haffajee, and S.S. Socransky, *Progression of periodontal disease in adult subjects in the absence of periodontal therapy*. J Clin Periodontol, 1983. **10**(4): p. 433-42.
19. Socransky, S.S., et al., *New concepts of destructive periodontal disease*. J Clin Periodontol, 1984. **11**(1): p. 21-32.
20. Baelum, V., O. Fejerskov, and T. Karring, *Oral hygiene, gingivitis and periodontal breakdown in adult Tanzanians*. J Periodontal Res, 1986. **21**(3): p. 221-32.
21. Baelum, V., O. Fejerskov, and F. Manji, *Periodontal diseases in adult Kenyans*. J Clin Periodontol, 1988. **15**(7): p. 445-52.
22. Bergstrom, J., *Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease*. Community Dent Oral Epidemiol, 1989. **17**(5): p. 245-7.
23. Grossi, S.G., et al., *Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss*. J Periodontol, 1994. **65**(3): p. 260-7.
24. Haber, J., et al., *Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis*. J Periodontol, 1993. **64**(1): p. 16-23.
25. Locker, D. and J.L. Leake, *Risk indicators and risk markers for periodontal disease experience in older adults living independently in Ontario, Canada*. J Dent Res, 1993. **72**(1): p. 9-17.
26. Shlossman, M., et al., *Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease*. J Am Dent Assoc, 1990. **121**(4): p. 532-6.
27. Emrich, L.J., M. Shlossman, and R.J. Genco, *Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. J Periodontol, 1991. **62**(2): p. 123-31.
28. Wilton, J.M., et al., *Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Systemic predisposition and markers of general health*. J Clin Periodontol, 1988. **15**(6): p. 339-46.
29. Mattila, K.J., et al., *Association between dental health and acute myocardial infarction*. Bmj, 1989. **298**(6676): p. 779-81.
30. Scannapieco, F.A., R.B. Bush, and S. Paju, *Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review*. Ann Periodontol, 2003. **8**(1): p. 38-53.
31. Beck, J., et al., *Periodontal disease and cardiovascular disease*. J Periodontol, 1996. **67**(10 Suppl): p. 1123-37.
32. DeStefano, F., et al., *Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality*. Bmj, 1993. **306**(6879): p. 688-91.

33. Offenbacher, S., et al., *Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight*. J Periodontol, 1996. **67**(10 Suppl): p. 1103-13.
34. Scannapieco, F.A., R.B. Bush, and S. Paju, *Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes. A systematic review*. Ann Periodontol, 2003. **8**(1): p. 70-8.
35. Grossi, S.G. and R.J. Genco, *Periodontal disease and diabetes mellitus: a two-way relationship*. Ann Periodontol, 1998. **3**(1): p. 51-61.
36. Taylor, G.W., *Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective*. Ann Periodontol, 2001. **6**(1): p. 99-112.
37. Taylor, G.W., et al., *Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. J Periodontol, 1996. **67**(10 Suppl): p. 1085-93.
38. Fisher, M.A., et al., *Periodontal disease and other nontraditional risk factors for CKD*. Am J Kidney Dis, 2008. **51**(1): p. 45-52.
39. Pradeep, A.R., et al., *Risk factors for chronic kidney diseases may include periodontal diseases, as estimated by the correlations of plasma pentraxin-3 levels: a case-control study*. Int Urol Nephrol, 2011. **44**(3): p. 829-39.
40. Meyer, M.S., et al., *A review of the relationship between tooth loss, periodontal disease, and cancer*. Cancer Causes Control, 2008. **19**(9): p. 895-907.
41. Michaud, D.S., et al., *Periodontal disease, tooth loss, and cancer risk in male health professionals: a prospective cohort study*. Lancet Oncol, 2008. **9**(6): p. 550-8.
42. Armitage, G.C., *Development of a classification system for periodontal diseases and conditions*. Ann Periodontol, 1999. **4**(1): p. 1-6.
43. Scherp, H.W., *Current Concepts in Periodontal Disease Research: Epidemiological Contributions*. J Am Dent Assoc, 1964. **68**: p. 667-75.
44. Axelsson P. , *Diagnosis and risk prediction of periodontal diseases. A clinical textbook and atlas*. 2002, Chicago: Quintessence Publishing.
45. Garmyn P, V.S.D., Quirynen M. . *Efficacy of plaque control in the maintenance of gingival health: plaque control in primary and secondary prevention*. in *Proceeding of the European Workshop on Mechanical Plaque Control*. 1998. Chicago: Quintessence Publishing.
46. Jenkins, W.M. and P.N. Papapanou, *Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents*. Periodontol 2000, 2001. **26**: p. 16-32.
47. Van der Velden, U., *Effect of age on the periodontium*. J Clin Periodontol, 1984. **11**(5): p. 281-94.
48. Oliver, R.C., L.J. Brown, and H. Loe, *Periodontal diseases in the United States population*. J Periodontol, 1998. **69**(2): p. 269-78.
49. Baelum, V., et al., *A 10-year study of the progression of destructive periodontal disease in adult and elderly Chinese*. J Periodontol, 1997. **68**(11): p. 1033-42.
50. Brown, L.J., et al., *Early-onset periodontitis: progression of attachment loss during 6 years*. J Periodontol, 1996. **67**(10): p. 968-75.
51. Papapanou, P.N., *Periodontal diseases: epidemiology*. Ann Periodontol, 1996. **1**(1): p. 1-36.
52. Van der Velden, U., et al., *Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants*. J Clin Periodontol, 2006. **33**(8): p. 540-8.
53. Kronauer, E., G. Borsa, and N.P. Lang, *Prevalence of incipient juvenile periodontitis at age 16 years in Switzerland*. J Clin Periodontol, 1986. **13**(2): p. 103-8.
54. Saxen, L., *Prevalence of juvenile periodontitis in Finland*. J Clin Periodontol, 1980. **7**(3): p. 177-86.
55. Brown, L.J., J.A. Brunelle, and A. Kingman, *Periodontal status in the United States, 1988-1991: prevalence, extent, and demographic variation*. J Dent Res, 1996. **75 Spec No**: p. 672-83.
56. Loe, H. and L.J. Brown, *Early onset periodontitis in the United States of America*. J Periodontol, 1991. **62**(10): p. 608-16.
57. Haubek, D., et al., *Early-onset periodontitis in Morocco is associated with the highly leukotoxic clone of Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Dent Res, 2001. **80**(6): p. 1580-3.
58. Stabholz, A., et al., *The description of a unique population with a very high prevalence of localized juvenile periodontitis*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(11 Pt 1): p. 872-8.
59. Levin, L., et al., *Aggressive periodontitis among young Israeli army personnel*. J Periodontol, 2006. **77**(8): p. 1392-6.
60. Timmerman, M.F., et al., *Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Clinical and microbiological baseline data*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(3): p. 215-24.
61. Dye, B.A., et al., *Trends in oral health status: United States, 1988-1994 and 1999-2004*. Vital Health Stat 11, 2007(248): p. 1-92.
62. Hugoson, A. and T. Jordan, *Frequency distribution of individuals aged 20-70 years according to severity of periodontal disease*. Community Dent Oral Epidemiol, 1982. **10**(4): p. 187-92.
63. Hugoson, A., L. Laurell, and D. Lundgren, *Frequency distribution of individuals aged 20-70 years according to severity of periodontal disease experience in 1973 and 1983*. J Clin Periodontol, 1992. **19**(4): p. 227-32.

64. Hugoson, A., et al., *Distribution of periodontal disease in a Swedish adult population 1973, 1983 and 1993*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(7): p. 542-8.
65. Hugoson, A., B. Sjodin, and O. Norderyd, *Trends over 30 years, 1973-2003, in the prevalence and severity of periodontal disease*. J Clin Periodontol, 2008. **35**(5): p. 405-14.
66. Bostanci, N. and G.N. Belibasakis, *Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen*. FEMS Microbiol Lett, 2012. **333**(1): p. 1-9.
67. Mahanonda, R. and S. Pichyangkul, *Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease*. Periodontol 2000, 2007. **43**: p. 41-55.
68. Hayashi, C., et al., *Review: Pathogen-induced inflammation at sites distant from oral infection: bacterial persistence and induction of cell-specific innate immune inflammatory pathways*. Mol Oral Microbiol, 2010. **25**(5): p. 305-16.
69. Hans, M. and V.M. Hans, *Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review*. J Oral Sci, 2011. **53**(3): p. 263-71.
70. Garlet, G.P., *Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints*. J Dent Res, 2010. **89**(12): p. 1349-63.
71. Cochran, D.L., *Inflammation and bone loss in periodontal disease*. J Periodontol, 2008. **79**(8 Suppl): p. 1569-76.
72. Ohlrich, E.J., M.P. Cullinan, and G.J. Seymour, *The immunopathogenesis of periodontal disease*. Aust Dent J, 2009. **54** Suppl 1: p. S2-10.
73. Page, R.C. and H.E. Schroeder, *Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work*. Lab Invest, 1976. **34**(3): p. 235-49.
74. Serhan, C.N., N. Chiang, and T.E. Van Dyke, *Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 349-61.
75. Van Dyke, T.E. and C.N. Serhan, *Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases*. J Dent Res, 2003. **82**(2): p. 82-90.
76. Han, Y.W., et al., *Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: Fusobacterium nucleatum adheres to and invades epithelial cells*. Infect Immun, 2000. **68**(6): p. 3140-6.
77. Trevani, A.S., et al., *Bacterial DNA activates human neutrophils by a CpG-independent pathway*. Eur J Immunol, 2003. **33**(11): p. 3164-74.
78. Tew, J.G., et al., *Dendritic cells, antibodies reactive with oxLDL, and inflammation*. J Dent Res, 2012. **91**(1): p. 8-16.
79. Ekhlassi, S., et al., *Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide induces tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 secretion, and CCL25 gene expression, in mouse primary gingival cell lines: interleukin-6-driven activation of CCL2*. J Periodontal Res, 2008. **43**(4): p. 431-9.
80. Ara, T., et al., *Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease*. J Periodontal Res, 2009. **44**(1): p. 21-7.
81. Morandini, A.C., et al., *Differential production of macrophage inflammatory protein-1alpha, stromal-derived factor-1, and IL-6 by human cultured periodontal ligament and gingival fibroblasts challenged with lipopolysaccharide from P. gingivalis*. J Periodontol, 2010. **81**(2): p. 310-7.
82. Scheres, N., et al., *Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res, 2010. **45**(2): p. 262-70.
83. Jung, I.H., et al., *Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament*. J Periodontal Implant Sci, 2012. **42**(6): p. 185-95.
84. Zhang, W., et al., *Porphyromonas gingivalis invades osteoblasts and inhibits bone formation*. Microbes Infect, 2010. **12**(11): p. 838-45.
85. Zhang, W., et al., *Integrin alpha5beta1-fimbriae binding and actin rearrangement are essential for Porphyromonas gingivalis invasion of osteoblasts and subsequent activation of the JNK pathway*. BMC Microbiol, 2013. **13**: p. 5.
86. Kim, M., et al., *Td92, an outer membrane protein of Treponema denticola, induces osteoclastogenesis via prostaglandin E(2)-mediated RANKL/osteoprotegerin regulation*. J Periodontal Res, 2010. **45**(6): p. 772-9.
87. Tang, Y., et al., *Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharides induce RANKL by mouse osteoblast in a way different from that of Escherichia coli lipopolysaccharide*. J Endod, 2011. **37**(12): p. 1653-8.
88. Cutler, C.W. and R. Jotwani, *Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis*. Periodontol 2000, 2004. **35**: p. 135-57.
89. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 933-44.
90. Appay, V., et al., *Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 975-83.
91. Weaver, C.T. and R.D. Hatton, *Interplay between the TH17 and TReg cell lineages: a (co-)evolutionary perspective*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(12): p. 883-9.
92. Berthelot, J.M. and B. Le Goff, *Rheumatoid arthritis and periodontal disease*. Joint Bone Spine, 2010. **77**(6): p. 537-41.

93. Di Benedetto, A., et al., *Periodontal disease: linking the primary inflammation to bone loss*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 503754.
94. Yarinina, A., et al., *TNF activates calcium-nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 signaling pathways in human macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(4): p. 1573-8.
95. Graves, D., *Cytokines that promote periodontal tissue destruction*. J Periodontol, 2008. **79**(8 Suppl): p. 1585-91.
96. Graves, D.T. and D. Cochran, *The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction*. J Periodontol, 2003. **74**(3): p. 391-401.
97. Garlet, G.P., et al., *Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease*. J Clin Periodontol, 2004. **31**(8): p. 671-9.
98. Ritchlin, C.T., et al., *Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis*. J Clin Invest, 2003. **111**(6): p. 821-31.
99. Vernal, R., et al., *Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis*. J Clin Periodontol, 2005. **32**(4): p. 383-9.
100. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 677-88.
101. Poulin, R. and C. Combes, *The concept of virulence: interpretations and implications*. Parasitol Today, 1999. **15**(12): p. 474-5.
102. Holt, S.C. and J.L. Ebersole, *Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis*. Periodontol 2000, 2005. **38**: p. 72-122.
103. Slots, J., D. Feik, and T.E. Rams, *Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides intermedius in human periodontitis: age relationship and mutual association*. J Clin Periodontol, 1990. **17**(9): p. 659-62.
104. Slots, J. and M. Ting, *Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment*. Periodontol 2000, 1999. **20**: p. 82-121.
105. van der Reijden, W.A., et al., *Java project on periodontal diseases: serotype distribution of Aggregatibacter actinomycetemcomitans and serotype dynamics over an 8-year period*. J Clin Periodontol, 2008. **35**(6): p. 487-92.
106. Fine, D.H., et al., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(12): p. 3859-69.
107. Mandell, R.L., *A longitudinal microbiological investigation of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Eikenella corrodens in juvenile periodontitis*. Infect Immun, 1984. **45**(3): p. 778-80.
108. Fives-Taylor, P.M., et al., *Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Periodontol 2000, 1999. **20**: p. 136-67.
109. Ready, D., et al., *Disease severity associated with presence in subgingival plaque of Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Tannerella forsythia, singly or in combination, as detected by nested multiplex PCR*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(10): p. 3380-3.
110. Slots, J., et al., *The occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius in destructive periodontal disease in adults*. J Clin Periodontol, 1986. **13**(6): p. 570-7.
111. Slots, J., B.G. Rosling, and R.J. Genco, *Suppression of penicillin-resistant oral Actinobacillus actinomycetemcomitans with tetracycline. Considerations in endocarditis prophylaxis*. J Periodontol, 1983. **54**(4): p. 193-6.
112. Christersson, L.A., et al., *Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis*. J Clin Periodontol, 1985. **12**(6): p. 465-76.
113. Kornman, K.S. and P.B. Robertson, *Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis*. J Periodontol, 1985. **56**(8): p. 443-6.
114. Haffajee, A.D., J.L. Dzink, and S.S. Socransky, *Effect of modified Widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions*. J Clin Periodontol, 1988. **15**(4): p. 255-62.
115. Haffajee, A.D., et al., *Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases*. J Clin Periodontol, 1988. **15**(6): p. 390-8.
116. Rodenburg, J.P., et al., *Occurrence of Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in severe periodontitis in relation to age and treatment history*. J Clin Periodontol, 1990. **17**(6): p. 392-9.
117. Slots, J. and M.A. Listgarten, *Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal diseases*. J Clin Periodontol, 1988. **15**(2): p. 85-93.
118. Bragd, L., et al., *The capability of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius to indicate progressive periodontitis; a retrospective study*. J Clin Periodontol, 1987. **14**(2): p. 95-9.
119. Fine, D.H., *Microbial identification and antibiotic sensitivity testing, an aid for patients refractory to periodontal therapy. A report of 3 cases*. J Clin Periodontol, 1994. **21**(2): p. 98-106.
120. Rams, T.E., M.A. Listgarten, and J. Slots, *Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care*. J Clin Periodontol, 1996. **23**(4): p. 346-54.

121. Brochut, P.F., et al., *Predictive value of clinical and microbiological parameters for the treatment outcome of scaling and root planing*. J Clin Periodontol, 2005. **32**(7): p. 695-701.
122. Doungudomdacha, S., et al., *Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Actinobacillus actinomycetemcomitans at adult periodontitis sites*. J Clin Periodontol, 2001. **28**(5): p. 437-45.
123. Johnson, J.D., et al., *Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis*. J Periodontol, 2008. **79**(12): p. 2305-12.
124. Socransky, S.S., et al., *Microbial complexes in subgingival plaque*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(2): p. 134-44.
125. Tanner, A.C. and J. Izard, *Tannerella forsythia, a periodontal pathogen entering the genomic era*. Periodontol 2000, 2006. **42**: p. 88-113.
126. Sakamoto, M., M. Umeda, and Y. Benno, *Molecular analysis of human oral microbiota*. J Periodontal Res, 2005. **40**(3): p. 277-85.
127. Ellen, R.P. and V.B. Galimanas, *Spirochetes at the forefront of periodontal infections*. Periodontol 2000, 2005. **38**: p. 13-32.
128. Mosca, A., et al., *Antimicrobial profiles of Prevotella spp. and Fusobacterium nucleatum isolated from periodontal infections in a selected area of southern Italy*. Int J Antimicrob Agents, 2007. **30**(6): p. 521-4.
129. Papapanou, P.N., et al., *Periodontal microbiota and clinical periodontal status in a rural sample in southern Thailand*. Eur J Oral Sci, 2002. **110**(5): p. 345-52.
130. Dzink, J.L., S.S. Socransky, and A.D. Haffajee, *The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases*. J Clin Periodontol, 1988. **15**(5): p. 316-23.
131. Torresyap, G., et al., *Relationship between periodontal pocket sulfide levels and subgingival species*. J Clin Periodontol, 2003. **30**(11): p. 1003-10.
132. Grenier, D. and L. Grignon, *Response of human macrophage-like cells to stimulation by Fusobacterium nucleatum ssp. nucleatum lipopolysaccharide*. Oral Microbiol Immunol, 2006. **21**(3): p. 190-6.
133. Bolstad, A.I., H.B. Jensen, and V. Bakken, *Taxonomy, biology, and periodontal aspects of Fusobacterium nucleatum*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(1): p. 55-71.
134. Saito, A., et al., *Fusobacterium nucleatum enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by Porphyromonas gingivalis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008. **54**(3): p. 349-55.
135. Zilm, P.S. and A.H. Rogers, *Co-adhesion and biofilm formation by Fusobacterium nucleatum in response to growth pH*. Anaerobe, 2007. **13**(3-4): p. 146-52.
136. Dahlen, G., et al., *Biochemical and serological characterization of Bacteroides intermedius strains isolated from the deep periodontal pocket*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(10): p. 2269-74.
137. Dzink, J.L., et al., *ELISA and conventional techniques for identification of black-pigmented Bacteroides isolated from periodontal pockets*. J Periodontal Res, 1983. **18**(4): p. 369-74.
138. Moore, W.E., et al., *Comparative bacteriology of juvenile periodontitis*. Infect Immun, 1985. **48**(2): p. 507-19.
139. Dzink, J.L., et al., *Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions*. J Clin Periodontol, 1985. **12**(8): p. 648-59.
140. Gmur, R. and B. Guggenheim, *Interdental supragingival plaque--a natural habitat of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides forsythus, Campylobacter rectus, and Prevotella nigrescens*. J Dent Res, 1994. **73**(8): p. 1421-8.
141. Lai, C.H., et al., *Wolinella recta in adult gingivitis and periodontitis*. J Periodontal Res, 1992. **27**(1): p. 8-14.
142. Listgarten, M.A., C.H. Lai, and V. Young, *Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis*. J Periodontol, 1993. **64**(3): p. 155-61.
143. Lopez, N.J., et al., *Occurrence of certain bacterial species and morphotypes in juvenile periodontitis in Chile*. J Periodontol, 1995. **66**(7): p. 559-67.
144. van Steenberghe, T.J., et al., *Microbiological and clinical monitoring of non-localized juvenile periodontitis in young adults: a report of 11 cases*. J Periodontol, 1993. **64**(1): p. 40-7.
145. Ihara, H., et al., *Detection of Campylobacter rectus in periodontitis sites by monoclonal antibodies*. J Periodontal Res, 2003. **38**(1): p. 64-72.
146. Moore, W.E., et al., *Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans*. Infect Immun, 1983. **42**(2): p. 510-5.
147. Rams, T.E., D. Feik, and J. Slots, *Campylobacter rectus in human periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 1993. **8**(4): p. 230-5.
148. Macuch, P.J. and A.C. Tanner, *Campylobacter species in health, gingivitis, and periodontitis*. J Dent Res, 2000. **79**(2): p. 785-92.
149. Yokoyama, M., et al., *Effect of female sex hormones on Campylobacter rectus and human gingival fibroblasts*. Oral Microbiol Immunol, 2005. **20**(4): p. 239-43.
150. Yokoyama, M., et al., *Relationship between Campylobacter rectus and periodontal status during pregnancy*. Oral Microbiol Immunol, 2008. **23**(1): p. 55-9.
151. Zambon, J.J., et al., *Microbiological and immunological studies of adult periodontitis in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus*. J Periodontol, 1988. **59**(1): p. 23-31.

152. Zambon, J.J., H.S. Reynolds, and R.J. Genco, *Studies of the subgingival microflora in patients with acquired immunodeficiency syndrome*. J Periodontol, 1990. **61**(11): p. 699-704.
153. Tanner, A., et al., *Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(2): p. 85-98.
154. Bostanci, N., et al., *Porphyromonas gingivalis antagonises Campylobacter rectus induced cytokine production by human monocytes*. Cytokine, 2007. **39**(2): p. 147-56.
155. Haffajee, A.D. and S.S. Socransky, *Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases*. Periodontol 2000, 1994. **5**: p. 78-111.
156. Chen, C.K., et al., *Eikenella corrodens in the human oral cavity*. J Periodontol, 1989. **60**(11): p. 611-6.
157. Fujise, O., et al., *Clonal diversity and stability of subgingival Eikenella corrodens*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(5): p. 2036-42.
158. Chang, C.C. and S.Y. Huang, *Eikenella corrodens arthritis of the knee after a toothpick injury: report of one case*. Acta Paediatr Taiwan, 2005. **46**(5): p. 318-20.
159. Karunakaran, R., et al., *Eikenella corrodens from a brain abscess*. Malays J Pathol, 2004. **26**(1): p. 49-52.
160. Nonnenmacher, C., R. Mutters, and L.F. de Jacoby, *Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects*. Clin Microbiol Infect, 2001. **7**(4): p. 213-7.
161. Noiri, Y., L. Li, and S. Ebisu, *The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets*. J Dent Res, 2001. **80**(10): p. 1930-4.
162. Salari, M.H. and Z. Kadkhoda, *Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic periodontitis*. J Oral Sci, 2004. **46**(3): p. 157-61.
163. Tanner, A.C., et al., *Wolinella recta, campylobacter concisus, bacteroides gracilis, and Eikenella corrodens from periodontal lesions*. J Periodontal Res, 1987. **22**(4): p. 327-30.
164. Rams, T.E., et al., *Peptostreptococcus micros in human periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 1992. **7**(1): p. 1-6.
165. von Troil-Linden, B., et al., *Salivary levels of suspected periodontal pathogens in relation to periodontal status and treatment*. J Dent Res, 1995. **74**(11): p. 1789-95.
166. Choi, B.K., et al., *Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced adult periodontitis patients using a nucleic acid-based approach*. J Periodontol, 2000. **71**(9): p. 1387-94.
167. Gajardo, M., et al., *Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population*. J Periodontol, 2005. **76**(2): p. 289-94.
168. van Winkelhoff, A.J., et al., *Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain*. J Clin Periodontol, 2005. **32**(8): p. 893-8.
169. Haffajee, A.D., et al., *Subgingival microbiota of chronic periodontitis subjects from different geographic locations*. J Clin Periodontol, 2004. **31**(11): p. 996-1002.
170. Lee, J.W., et al., *Distribution of periodontal pathogens in Korean aggressive periodontitis*. J Periodontol, 2003. **74**(9): p. 1329-35.
171. van Winkelhoff, A.J., et al., *Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction*. J Clin Periodontol, 2002. **29**(11): p. 1023-8.
172. Van der Velden, U., et al., *Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora*. J Clin Periodontol, 2003. **30**(7): p. 603-10.
173. Gomes, S.C., et al., *Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens*. J Periodontol, 2006. **77**(9): p. 1483-90.
174. Gomes, B.P., et al., *Microbiological examination of infected dental root canals*. Oral Microbiol Immunol, 2004. **19**(2): p. 71-6.
175. Dymock, D., et al., *Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(3): p. 537-42.
176. Kuriyama, T., et al., *Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics*. Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(4): p. 285-8.
177. Yoneda, M., et al., *Stimulation of growth of Porphyromonas gingivalis by cell extracts from Tannerella forsythia*. J Periodontal Res, 2005. **40**(2): p. 105-9.
178. Haffajee, A.D., et al., *Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(5): p. 346-53.
179. Ximenez-Fyvie, L.A., A.D. Haffajee, and S.S. Socransky, *Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis*. J Clin Periodontol, 2000. **27**(9): p. 648-57.
180. Socransky, S.S., A.D. Haffajee, and J.L. Dzink, *Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites*. J Clin Periodontol, 1988. **15**(7): p. 440-4.
181. Sanz, M., et al., *Differences in the composition of the subgingival microbiota of two periodontitis populations of different geographical origin. A comparison between Spain and The Netherlands*. Eur J Oral Sci, 2000. **108**(5): p. 383-92.
182. Yano-Higuchi, K., et al., *Prevalence of Bacteroides forsythus, Porphyromonas gingivalis and Actinobacillus actinomycetemcomitans in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis*. J Clin Periodontol, 2000. **27**(8): p. 597-602.

183. Mager, D.L., A.D. Haffajee, and S.S. Socransky, *Effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects*. J Clin Periodontol, 2003. **30**(12): p. 1031-7.
184. Sirinian, G., et al., *Periodontopathic bacteria in young healthy subjects of different ethnic backgrounds in Los Angeles*. J Periodontol, 2002. **73**(3): p. 283-8.
185. Paster, B.J., et al., *Bacterial diversity in human subgingival plaque*. J Bacteriol, 2001. **183**(12): p. 3770-83.
186. Gmur, R., J.R. Strub, and B. Guggenheim, *Prevalence of Bacteroides forsythus and Bacteroides gingivalis in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall*. J Periodontal Res, 1989. **24**(2): p. 113-20.
187. Beck, J.D., et al., *Evaluation of oral bacteria as risk indicators for periodontitis in older adults*. J Periodontol, 1992. **63**(2): p. 93-9.
188. Grossi, S.G., et al., *Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss*. J Periodontol, 1995. **66**(1): p. 23-9.
189. Zambon, J.J., et al., *Cigarette smoking increases the risk for subgingival infection with periodontal pathogens*. J Periodontol, 1996. **67**(10 Suppl): p. 1050-4.
190. Gersdorf, H., et al., *Identification of Bacteroides forsythus in subgingival plaque from patients with advanced periodontitis*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(4): p. 941-6.
191. Gmur, R., C.P. Marinello, and B. Guggenheim, *Periodontitis associated bacteria in supragingival plaque of dental hygienists: stability of carrier state and clinical development*. Eur J Oral Sci, 1999. **107**(3): p. 225-8.
192. Machtei, E.E., et al., *Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss*. J Clin Periodontol, 1999. **26**(6): p. 374-80.
193. Lotufo, R.F., et al., *Molecular detection of Bacteroides forsythus in human periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 1994. **9**(3): p. 154-60.
194. Ashimoto, A., et al., *Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions*. Oral Microbiol Immunol, 1996. **11**(4): p. 266-73.
195. Leys, E.J., et al., *Detection and strain identification of Actinobacillus actinomycetemcomitans by nested PCR*. J Clin Microbiol, 1994. **32**(5): p. 1288-94.
196. McClellan, D.L., A.L. Griffen, and E.J. Leys, *Age and prevalence of Porphyromonas gingivalis in children*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(8): p. 2017-9.
197. Meurman, J.H., et al., *Identification of Bacteroides forsythus in subgingival dental plaque with the aid of a rapid PCR method*. J Dent Res, 1997. **76**(7): p. 1376-80.
198. Tuite-McDonnell, M., et al., *Concordance of Porphyromonas gingivalis colonization in families*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(2): p. 455-61.
199. Socransky, S.S. and A.D. Haffajee, *Periodontal microbial ecology*. Periodontol 2000, 2005. **38**: p. 135-87.
200. Gersdorf, H., K. Pelz, and U.B. Gobel, *Fluorescence in situ hybridization for direct visualization of gram-negative anaerobes in subgingival plaque samples*. FEMS Immunol Med Microbiol, 1993. **6**(2-3): p. 109-14.
201. Moncla, B.J., et al., *Use of synthetic oligonucleotide DNA probes for the identification of Bacteroides gingivalis*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(2): p. 324-7.
202. Moncla, B.J., et al., *Direct detection of Porphyromonas gingivalis in Macaca fascicularis dental plaque samples using an oligonucleotide probe*. J Periodontol, 1994. **65**(5): p. 398-403.
203. Moter, A., et al., *Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(5): p. 1399-403.
204. Papapanou, P.N., et al., *Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression*. J Periodontol, 1997. **68**(7): p. 651-66.
205. Colombo, A.P., et al., *Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(2): p. 169-80.
206. Lundgren, T., et al., *Subgingival microbial profile of Papillon-Lefevre patients assessed by DNA-probes*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(8): p. 624-9.
207. Papapanou, P.N., et al., *"Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota*. Eur J Oral Sci, 1997. **105**(5 Pt 1): p. 389-96.
208. Papapanou, P.N., et al., *"Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study*. J Periodontol, 2000. **71**(6): p. 885-97.
209. Ximenez-Fyvie, L.A., A.D. Haffajee, and S.S. Socransky, *Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis*. J Clin Periodontol, 2000. **27**(10): p. 722-32.
210. Becker, M.R., et al., *Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(3): p. 1001-9.
211. Armitage, G.C., *Clinical evaluation of periodontal diseases*. Periodontol 2000, 1995. **7**: p. 39-53.
212. Greenstein, G., J. Caton, and A.M. Polson, *Histologic characteristics associated with bleeding after probing and visual signs of inflammation*. J Periodontol, 1981. **52**(8): p. 420-5.
213. Tanner, A.C., et al., *Clinical characteristics and microbiota of progressing slight chronic periodontitis in adults*. J Clin Periodontol, 2007. **34**(11): p. 917-30.
214. Teles, R., et al., *Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota*. J Periodontol, 2010. **81**(1): p. 89-98.

215. Goultschin, J., et al., *Association of smoking with periodontal treatment needs*. J Periodontol, 1990. **61**(6): p. 364-7.
216. Ah, M.K., et al., *The effect of smoking on the response to periodontal therapy*. J Clin Periodontol, 1994. **21**(2): p. 91-7.
217. Bergstrom, J., S. Eliasson, and H. Preber, *Cigarette smoking and periodontal bone loss*. J Periodontol, 1991. **62**(4): p. 242-6.
218. Haber, J. and R.L. Kent, *Cigarette smoking in a periodontal practice*. J Periodontol, 1992. **63**(2): p. 100-6.
219. Horning, G.M., C.L. Hatch, and M.E. Cohen, *Risk indicators for periodontitis in a military treatment population*. J Periodontol, 1992. **63**(4): p. 297-302.
220. Kaldahl, W.B., et al., *Levels of cigarette consumption and response to periodontal therapy*. J Periodontol, 1996. **67**(7): p. 675-81.
221. Locker, D., *Smoking and oral health in older adults*. Can J Public Health, 1992. **83**(6): p. 429-32.
222. Preber, H. and J. Bergstrom, *Effect of cigarette smoking on periodontal healing following surgical therapy*. J Clin Periodontol, 1990. **17**(5): p. 324-8.
223. Ragnarsson, E., S.T. Eliasson, and S.H. Olafsson, *Tobacco smoking, a factor in tooth loss in Reykjavik, Iceland*. Scand J Dent Res, 1992. **100**(6): p. 322-6.
224. Stoltenberg, J.L., et al., *Association between cigarette smoking, bacterial pathogens, and periodontal status*. J Periodontol, 1993. **64**(12): p. 1225-30.
225. Tonetti, M.S., G. Pini-Prato, and P. Cortellini, *Effect of cigarette smoking on periodontal healing following GTR in infrabony defects. A preliminary retrospective study*. J Clin Periodontol, 1995. **22**(3): p. 229-34.
226. Wouters, F.R., et al., *Significance of some variables on interproximal alveolar bone height based on cross-sectional epidemiologic data*. J Clin Periodontol, 1993. **20**(3): p. 199-206.
227. Barclay, S., et al., *The incidence and severity of nifedipine-induced gingival overgrowth*. J Clin Periodontol, 1992. **19**(5): p. 311-4.
228. Hancock, R.H. and R.H. Swan, *Nifedipine-induced gingival overgrowth. Report of a case treated by controlling plaque*. J Clin Periodontol, 1992. **19**(1): p. 12-4.
229. Little, T.M., S.S. Girgis, and R.E. Masotti, *Diphenylhydantoin-induced gingival hyperplasia: its response to changes in drug dosage*. Dev Med Child Neurol, 1975. **17**(4): p. 421-4.
230. Lucas, R.M., L.P. Howell, and B.A. Wall, *Nifedipine-induced gingival hyperplasia. A histochemical and ultrastructural study*. J Periodontol, 1985. **56**(4): p. 211-5.
231. McGaw, T., S. Lam, and J. Coates, *Cyclosporin-induced gingival overgrowth: correlation with dental plaque scores, gingivitis scores, and cyclosporin levels in serum and saliva*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1987. **64**(3): p. 293-7.
232. Schincaglia, G.P., et al., *Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts in vitro*. J Oral Pathol Med, 1992. **21**(4): p. 181-5.
233. Thomason, J.M., R.A. Seymour, and J. Ellis, *The periodontal problems and management of the renal transplant patient*. Ren Fail, 1994. **16**(6): p. 731-45.
234. Genco, R.J. and H. Loe, *The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease*. Periodontol 2000, 1993. **2**: p. 98-116.
235. Saffkan-Seppala, B. and J. Ainamo, *Periodontal conditions in insulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Periodontol, 1992. **19**(1): p. 24-9.
236. *Guidelines for periodontal therapy. The American Academy of Periodontology*. J Periodontol, 1998. **69**(3): p. 405-8.
237. Lobene, R.R., et al., *A modified gingival index for use in clinical trials*. Clin Prev Dent, 1986. **8**(1): p. 3-6.
238. Loe, H. and J. Silness, *Periodontal Disease in Pregnancy. I. Prevalence and Severity*. Acta Odontol Scand, 1963. **21**: p. 533-51.
239. Loesche, W.J., *Clinical and microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis*. J Dent Res, 1979. **58**(12): p. 2404-12.
240. Loe, H., E. Theilade, and S.B. Jensen, *Experimental Gingivitis in Man*. J Periodontol, 1965. **36**: p. 177-87.
241. Theilade, E., et al., *Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation*. J Periodontol Res, 1966. **1**: p. 1-13.
242. Zander, H.A., S.P. Hazen, and D.B. Scott, *Mineralization of dental calculus*. Proc Soc Exp Biol Med, 1960. **103**: p. 257-60.
243. Allen, D.L. and D.A. Kerr, *Tissue Response in the Guinea Pig to Sterile and Non-Sterile Calculus*. J Periodontol, 1965. **36**: p. 121-6.
244. Friskopp, J. and L. Hammarstrom, *A comparative, scanning electron microscopic study of supragingival and subgingival calculus*. J Periodontol, 1980. **51**(10): p. 553-62.
245. Horup, N., B. Melsen, and S. Terp, *Relationship between malocclusion and maintenance of teeth*. Community Dent Oral Epidemiol, 1987. **15**(2): p. 74-8.
246. Jeffcoat, M.K. and T.H. Howell, *Alveolar bone destruction due to overhanging amalgam in periodontal disease*. J Periodontol, 1980. **51**(10): p. 599-602.

247. Listgarten, M.A. and B. Ellegaard, *Electron microscopic evidence of a cellular attachment between junctional epithelium and dental calculus*. J Periodontal Res, 1973. **8**(3): p. 143-50.
248. Rodriguez-Ferrer, H.J., J.D. Strahan, and H.N. Newman, *Effect of gingival health of removing overhanging margins of interproximal subgingival amalgam restorations*. J Clin Periodontol, 1980. **7**(6): p. 457-62.
249. Theilade, J., et al., *Electron Microscopic Observations of Dental Calculus in Germfree and Conventional Rats*. Arch Oral Biol, 1964. **9**: p. 97-100.
250. Waerhaug, J., *Effect of rough surfaces upon gingival tissue*. J Dent Res, 1956. **35**(2): p. 323-5.
251. Martinez-Canut, P., et al., *A study on factors associated with pathologic tooth migration*. J Clin Periodontol, 1997. **24**(7): p. 492-7.
252. Towfighi, P.P., et al., *Pathologic migration of anterior teeth in patients with moderate to severe periodontitis*. J Periodontol, 1997. **68**(10): p. 967-72.
253. Burgett, F.G., et al., *A randomized trial of occlusal adjustment in the treatment of periodontitis patients*. J Clin Periodontol, 1992. **19**(6): p. 381-7.
254. Jin, L.J. and C.F. Cao, *Clinical diagnosis of trauma from occlusion and its relation with severity of periodontitis*. J Clin Periodontol, 1992. **19**(2): p. 92-7.
255. Rateitschak, K.H., *Orthodontics and periodontology*. Int Dent J, 1968. **18**(1): p. 108-20.
256. Caton, J., G. Greenstein, and A.M. Polson, *Depth of periodontal probe penetration related to clinical and histologic signs of gingival inflammation*. J Periodontol, 1981. **52**(10): p. 626-9.
257. Fowler, C., et al., *Histologic probe position in treated and untreated human periodontal tissues*. J Clin Periodontol, 1982. **9**(5): p. 373-85.
258. Keagle, J.G., et al., *Gingival resistance to probing forces. I. Determination of optimal probe diameter*. J Periodontol, 1989. **60**(4): p. 167-71.
259. Polson, A.M., et al., *Histological determination of probe tip penetration into gingival sulcus of humans using an electronic pressure-sensitive probe*. J Clin Periodontol, 1980. **7**(6): p. 479-88.
260. Aguerro, A., et al., *Histological location of a standardized periodontal probe in man*. J Periodontol, 1995. **66**(3): p. 184-90.
261. Atassi, F., H.N. Newman, and J.S. Bulman, *Probe tine diameter and probing depth*. J Clin Periodontol, 1992. **19**(5): p. 301-4.
262. Garnick, J.J., et al., *Gingival resistance to probing forces. II. The effect of inflammation and pressure on probe displacement in beagle dog gingivitis*. J Periodontol, 1989. **60**(9): p. 498-505.
263. Hull, P.S., V. Clerehugh, and A. Ghassemi-Aval, *An assessment of the validity of a constant force electronic probe in measuring probing depths*. J Periodontol, 1995. **66**(10): p. 848-51.
264. Mombelli, A. and H. Graf, *Depth-force-patterns in periodontal probing*. J Clin Periodontol, 1986. **13**(2): p. 126-30.
265. Mombelli, A., T. Muhle, and R. Frigg, *Depth-force patterns of periodontal probing. Attachment-gain in relation to probing force*. J Clin Periodontol, 1992. **19**(5): p. 295-300.
266. Almas, K., J.S. Bulman, and H.N. Newman, *Assessment of periodontal status with CPITN and conventional periodontal indices*. J Clin Periodontol, 1991. **18**(9): p. 654-9.
267. Baelum, V., et al., *Influence of CPITN partial recordings on estimates of prevalence and severity of various periodontal conditions in adults*. Community Dent Oral Epidemiol, 1993. **21**(6): p. 354-9.
268. Baelum, V., et al., *Validity of CPITN's assumptions of hierarchical occurrence of periodontal conditions in a Kenyan population aged 15-65 years*. Community Dent Oral Epidemiol, 1993. **21**(6): p. 347-53.
269. Baelum, V., et al., *Relationship between CPITN and periodontal attachment loss findings in an adult population*. J Clin Periodontol, 1995. **22**(2): p. 146-52.
270. Butterworth, M. and A. Sheiham, *Changes in the Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN) after periodontal treatment in a general dental practice*. Br Dent J, 1991. **171**(11-12): p. 363-6.
271. Hunt, R.J. and S.J. Fann, *Effect of examining half the teeth in a partial periodontal recording of older adults*. J Dent Res, 1991. **70**(10): p. 1380-5.
272. Kingman, A., et al., *Systematic errors in estimating prevalence and severity of periodontal disease*. J Periodontol, 1988. **59**(11): p. 707-13.
273. Blieden, T.M., et al., *Examiner reliability for an invasive gingival bleeding index*. J Clin Periodontol, 1992. **19**(4): p. 262-7.
274. Jeffcoat, M.K., *Radiographic methods for the detection of progressive alveolar bone loss*. J Periodontol, 1992. **63**(4 Suppl): p. 367-72.
275. Benn, D.K., *A review of the reliability of radiographic measurements in estimating alveolar bone changes*. J Clin Periodontol, 1990. **17**(1): p. 14-21.
276. Goodson, J.M., A.D. Haffajee, and S.S. Socransky, *The relationship between attachment level loss and alveolar bone loss*. J Clin Periodontol, 1984. **11**(5): p. 348-59.
277. Kornman, K.S., *Nature of periodontal diseases: assessment and diagnosis*. J Periodontal Res, 1987. **22**(3): p. 192-204.
278. Lang, N.P. and R.W. Hill, *Radiographs in periodontics*. J Clin Periodontol, 1977. **4**(1): p. 16-28.

279. Suomi, J.D., J. Plumbo, and J.P. Barbano, *A comparative study of radiographs and pocket measurements in periodontal disease evaluation*. J Periodontol, 1968. **39**(6): p. 311-5.
280. Van der Stelt, P.F., *Modern radiographic methods in the diagnosis of periodontal disease*. Adv Dent Res, 1993. **7**(2): p. 158-62.
281. Armitage, G.C., *Periodontal diseases: diagnosis*. Ann Periodontol, 1996. **1**(1): p. 37-215.
282. Asikainen, S., et al., *Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes in periodontal health and disease*. Oral Microbiol Immunol, 1991. **6**(2): p. 115-8.
283. Holtta, P., et al., *Isolation frequency and serotype distribution of mutans streptococci and Actinobacillus actinomycetemcomitans, and clinical periodontal status in Finnish and Vietnamese children*. Scand J Dent Res, 1994. **102**(2): p. 113-9.
284. Mombelli, A., et al., *Actinobacillus actinomycetemcomitans in adult periodontitis. I. Topographic distribution before and after treatment*. J Periodontol, 1994. **65**(9): p. 820-6.
285. Mombelli, A., et al., *Actinobacillus actinomycetemcomitans in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment*. J Periodontol, 1994. **65**(9): p. 827-34.
286. Nieminen, A., et al., *Prognostic criteria for the efficiency of non-surgical periodontal therapy in advanced periodontitis*. J Clin Periodontol, 1995. **22**(2): p. 153-61.
287. Slots, J., *Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work*. J Clin Periodontol, 1986. **13**(10): p. 912-7.
288. Slots, J. and B.G. Rosling, *Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline*. J Clin Periodontol, 1983. **10**(5): p. 465-86.
289. Haffajee, A.D., et al., *Clinical risk indicators for periodontal attachment loss*. J Clin Periodontol, 1991. **18**(2): p. 117-25.
290. Wolff, L., G. Dahlen, and D. Aepli, *Bacteria as risk markers for periodontitis*. J Periodontol, 1994. **65**(5 Suppl): p. 498-510.
291. Bergholtz, A. and J. Brithon, *Plaque removal by dental floss or toothpicks. An intra-individual comparative study*. J Clin Periodontol, 1980. **7**(6): p. 516-24.
292. Caton, J.G., et al., *Comparison between mechanical cleaning and an antimicrobial rinse for the treatment and prevention of interdental gingivitis*. J Clin Periodontol, 1993. **20**(3): p. 172-8.
293. Hill, R.W., et al., *Four types of periodontal treatment compared over two years*. J Periodontol, 1981. **52**(11): p. 655-62.
294. Kaldahl, W.B., et al., *Evaluation of four modalities of periodontal therapy. Mean probing depth, probing attachment level and recession changes*. J Periodontol, 1988. **59**(12): p. 783-93.
295. Lindhe, J., et al., *Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease*. J Clin Periodontol, 1984. **11**(7): p. 448-58.
296. Badersten, A., R. Nilveus, and J. Egelberg, *Effect of nonsurgical periodontal therapy. II. Severely advanced periodontitis*. J Clin Periodontol, 1984. **11**(1): p. 63-76.
297. Lindhe, J., et al., *Healing following surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. A clinical study*. J Clin Periodontol, 1982. **9**(2): p. 115-28.
298. Lindhe, J. and S. Nyman, *Long-term maintenance of patients treated for advanced periodontal disease*. J Clin Periodontol, 1984. **11**(8): p. 504-14.
299. Renvert, S., et al., *5-year follow up of periodontal intraosseous defects treated by root planing or flap surgery*. J Clin Periodontol, 1990. **17**(6): p. 356-63.
300. van Winkelhoff, A.J., T.E. Rams, and J. Slots, *Systemic antibiotic therapy in periodontics*. Periodontol 2000, 1996. **10**: p. 45-78.
301. Berglundh, T., et al., *The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(5): p. 354-62.
302. Flemmig, T.F., et al., *Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring Actinobacillus actinomycetemcomitans and/or Porphyromonas gingivalis*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(5): p. 380-7.
303. Tinoco, E.M., et al., *Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial*. J Periodontol, 1998. **69**(12): p. 1355-63.
304. Pavicic, M.J., A.J. van Winkelhoff, and J. de Graaff, *In vitro susceptibilities of Actinobacillus actinomycetemcomitans to a number of antimicrobial combinations*. Antimicrob Agents Chemother, 1992. **36**(12): p. 2634-8.
305. Slots, J., D. Feik, and T.E. Rams, *In vitro antimicrobial sensitivity of enteric rods and pseudomonads from advanced adult periodontitis*. Oral Microbiol Immunol, 1990. **5**(5): p. 298-301.
306. Ellen, R.P. and C.A. McCulloch, *Evidence versus empiricism: rational use of systemic antimicrobial agents for treatment of periodontitis*. Periodontol 2000, 1996. **10**: p. 29-44.
307. Walker, C.B., *The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora*. Periodontol 2000, 1996. **10**: p. 79-88.
308. Goodson, J.M., *Principles of pharmacologic intervention*. J Clin Periodontol, 1996. **23**(3 Pt 2): p. 268-72.

309. Kornman, K.S., *Refractory periodontitis: critical questions in clinical management*. J Clin Periodontol, 1996. **23**(3 Pt 2): p. 293-8.
310. Drisko, C.H., *The use of locally delivered doxycycline in the treatment of periodontitis. Clinical results*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(11 Pt 2): p. 947-52; discussion 978-9.
311. Garrett, S., et al., *Two multi-center studies evaluating locally delivered doxycycline hyclate, placebo control, oral hygiene, and scaling and root planing in the treatment of periodontitis*. J Periodontol, 1999. **70**(5): p. 490-503.
312. Graca, M.A., et al., *A randomized controlled trial of a 2% minocycline gel as an adjunct to non-surgical periodontal treatment, using a design with multiple matching criteria*. J Clin Periodontol, 1997. **24**(4): p. 249-53.
313. Jeffcoat, M.K., et al., *Adjunctive use of a subgingival controlled-release chlorhexidine chip reduces probing depth and improves attachment level compared with scaling and root planing alone*. J Periodontol, 1998. **69**(9): p. 989-97.
314. Killoy, W.J., *The use of locally delivered chlorhexidine in the treatment of periodontitis. Clinical results*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(11 Pt 2): p. 953-8; discussion 978-9.
315. Polson, A.M., et al., *Multi-center comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis. I. Study design, procedures, and management*. J Periodontol, 1997. **68**(2): p. 110-8.
316. Soskolne, W.A., et al., *Sustained local delivery of chlorhexidine in the treatment of periodontitis: a multi-center study*. J Periodontol, 1997. **68**(1): p. 32-8.
317. Stoller, N.H., et al., *The pharmacokinetic profile of a biodegradable controlled-release delivery system containing doxycycline compared to systemically delivered doxycycline in gingival crevicular fluid, saliva, and serum*. J Periodontol, 1998. **69**(10): p. 1085-91.
318. Timmerman, M.F., et al., *Evaluation of the long-term efficacy and safety of locally-applied minocycline in adult periodontitis patients*. J Clin Periodontol, 1996. **23**(8): p. 707-16.
319. Lindhe, J. and S. Nyman, *The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease*. J Clin Periodontol, 1975. **2**(2): p. 67-79.
320. Olsen, C.T., W.F. Ammons, and G. van Belle, *A longitudinal study comparing apically repositioned flaps, with and without osseous surgery*. Int J Periodontics Restorative Dent, 1985. **5**(4): p. 10-33.
321. Kaldahl, W.B., et al., *Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities*. J Periodontol, 1996. **67**(2): p. 93-102.
322. McGuire, M.K. and M.E. Nunn, *Prognosis versus actual outcome. II. The effectiveness of clinical parameters in developing an accurate prognosis*. J Periodontol, 1996. **67**(7): p. 658-65.
323. McGuire, M.K. and M.E. Nunn, *Prognosis versus actual outcome. III. The effectiveness of clinical parameters in accurately predicting tooth survival*. J Periodontol, 1996. **67**(7): p. 666-74.
324. Flores-de-Jacoby, L. and R. Mengel, *Conventional surgical procedures*. Periodontol 2000, 1995. **9**: p. 38-54.
325. Palkanis, K.G., *Surgical pocket therapy*. Ann Periodontol, 1996. **1**(1): p. 589-617.
326. Isidor, F. and T. Karring, *Long-term effect of surgical and non-surgical periodontal treatment. A 5-year clinical study*. J Periodontal Res, 1986. **21**(5): p. 462-72.
327. Knowles, J.W., et al., *Results of periodontal treatment related to pocket depth and attachment level. Eight years*. J Periodontol, 1979. **50**(5): p. 225-33.
328. Ramfjord, S.P., et al., *Four modalities of periodontal treatment compared over five years*. J Periodontal Res, 1987. **22**(3): p. 222-3.
329. Kaldahl, W.B., et al., *Long-term evaluation of periodontal therapy: II. Incidence of sites breaking down*. J Periodontol, 1996. **67**(2): p. 103-8.
330. Lindhe, J. and S. Nyman, *Scaling and granulation tissue removal in periodontal therapy*. J Clin Periodontol, 1985. **12**(5): p. 374-88.
331. Garrett, S., *Periodontal regeneration around natural teeth*. Ann Periodontol, 1996. **1**(1): p. 621-66.
332. Tonetti, M.S., G.P. Prato, and P. Cortellini, *Factors affecting the healing response of intrabony defects following guided tissue regeneration and access flap surgery*. J Clin Periodontol, 1996. **23**(6): p. 548-56.
333. Cortellini, P., et al., *Treatment of deep and shallow intrabony defects. A multicenter randomized controlled clinical trial*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(12): p. 981-7.
334. Cortellini, P., et al., *Long-term stability of clinical attachment following guided tissue regeneration and conventional therapy*. J Clin Periodontol, 1996. **23**(2): p. 106-11.
335. Wennstrom, J.L., *Mucogingival therapy*. Ann Periodontol, 1996. **1**(1): p. 671-701.
336. *Consensus report. Mucogingival therapy*. Ann Periodontol, 1996. **1**(1): p. 702-6.
337. Jervoe-Storm, P.M., et al., *Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples*. J Clin Periodontol, 2005. **32**(7): p. 778-83.
338. Papapanou, P.N., et al., *An analysis of the subgingival microflora in randomly selected subjects*. Oral Microbiol Immunol, 1993. **8**(1): p. 24-9.
339. Kamma, J.J., M. Nakou, and F.A. Manti, *Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters*. J Periodontol, 1994. **65**(11): p. 1073-8.

340. Ali, R.W., et al., *Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients*. J Periodontol, 1994. **65**(11): p. 1046-52.
341. Preus, H.R., et al., *The natural history of periodontal disease. The correlation of selected microbiological parameters with disease severity in Sri Lankan tea workers*. J Clin Periodontol, 1995. **22**(9): p. 674-8.
342. Dahlen, G., et al., *Black-pigmented Bacteroides species and Actinobacillus actinomycetemcomitans in subgingival plaque of adult Kenyans*. J Clin Periodontol, 1989. **16**(5): p. 305-10.
343. Ali, R.W., et al., *Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients*. J Clin Periodontol, 1996. **23**(2): p. 133-9.
344. Slots, J., *Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in periodontal disease: introduction*. Periodontol 2000, 1999. **20**: p. 7-13.
345. Mombelli, A., F. Casagni, and P.N. Madianos, *Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review*. J Clin Periodontol, 2002. **29 Suppl 3**: p. 10-21; discussion 37-8.
346. Haffajee, A.D. and S.S. Socransky, *Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota*. J Clin Periodontol, 2001. **28**(5): p. 377-88.
347. Lie, M.A., et al., *Oral microbiota in smokers and non-smokers in natural and experimentally-induced gingivitis*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(8): p. 677-86.
348. Mombelli, A., et al., *Persistence patterns of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia/nigrescens, and Actinobacillus actinomycetemcomitans after mechanical therapy of periodontal disease*. J Periodontol, 2000. **71**(1): p. 14-21.
349. Favari, M., et al., *Microbiological profile of untreated subjects with localized aggressive periodontitis*. J Clin Periodontol, 2009. **36**(9): p. 739-49.
350. Chen, C., T. Wang, and W. Chen, *Occurrence of Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotypes in subgingival plaque from United States subjects*. Mol Oral Microbiol, 2010. **25**(3): p. 207-14.
351. Byrne, S.J., et al., *Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in subgingival plaque*. Oral Microbiol Immunol, 2009. **24**(6): p. 469-77.