

parodontale che sarà opportuno eseguire. È essenziale, cioè spiegare al paziente, già in occasione della prima visita, la necessità di effettuare controlli periodici, la cui scadenza verrà stabilita in maniera personalizzata, in base alle singole esigenze e previa valutazione aggiornata delle condizioni di salute orali e generali, nonché dei fattori di rischio eventualmente presenti^{Allen E, 2008; AAP, 2008}. **È importante che il paziente comprenda bene l'importanza di sottoporsi a sedute di igiene professionale e a visite specialistiche di controllo, con periodicità co-**

stante, proprio per garantire la stabilità dei risultati ottenuti. In questo modo il paziente diventa a pieno titolo il principale terapeuta di se stesso^{AAP, 2000}.

Può essere estremamente utile consegnare al paziente, sempre in occasione della prima visita, una nota scritta, che sottolinei il valore di tale principio e che rappresenta anche una sorta di consenso informato.

Nelle riquadro si illustra un esempio di tale promemoria, a cui ispirarsi per elaborarne una versione personalizzata da consegnare al paziente (vd Figg. 146a,b).

Gentile Paziente,

è importante che Lei sappia: che i risultati che desideriamo ottenere, sono influenzati moltissimo dal Suo grado di collaborazione nel:

1. seguire le tecniche di Igiene Domiciliare che Le abbiamo suggerito;
2. presentarsi agli appuntamenti di richiamo, successivi al trattamento, con una frequenza che Le verrà indicata.

Terminata questa prima fase di trattamento parodontale non chirurgico, Le verrà fissato un appuntamento per la RIVALUTAZIONE del Suo caso e, in tale occasione si valuterà e si deciderà, con il Suo consenso, se tale trattamento si è dimostrato risolutivo per alcune zone e per tutta la cavità orale, oppure Le verranno illustrati eventuali, ulteriori necessità di trattamento.

MICROBIOMA

Per microbioma si intende l'insieme del patrimonio genetico e delle interazioni ambientali della totalità dei microrganismi di un ambiente definito, come quello della cavità orale^{Turnbaugh P J e Coll., 2007}.

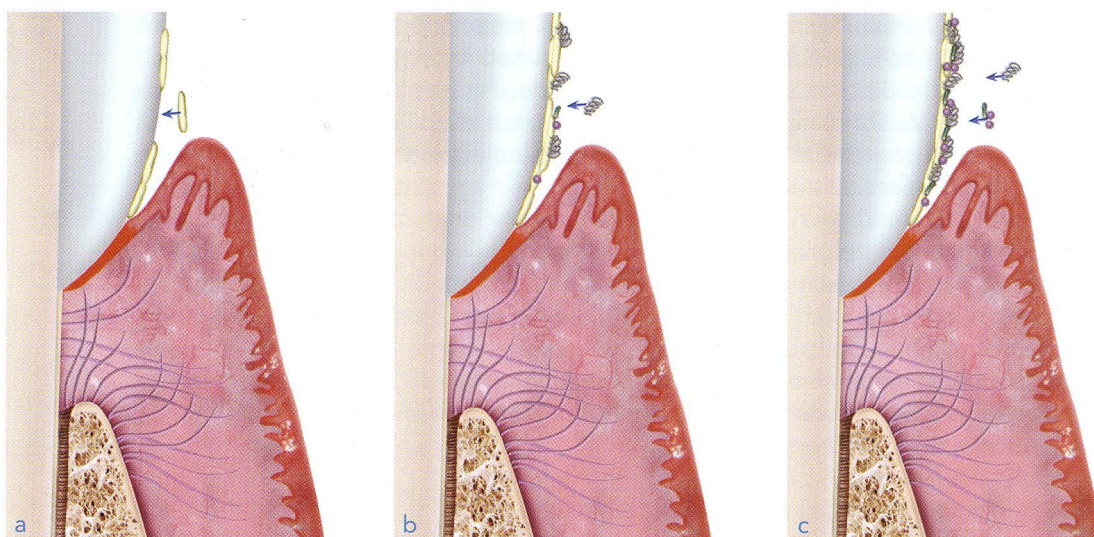
Dati recenti stimano che nella cavità orale si possono identificare fino a 19.000 specie batteriche diverse^{Wade WG, 2013}. Ogni individuo presenta una carica microbica in percentuale ridotta, rispetto al numero totale dei potenziali agenti patogeni. La microflora si diversifica in modo significativo tra individuo e individuo, è cioè paziente specifica^{Nasidze I e Coll., 2009}, tra i vari elementi del cavo orale di uno stesso individuo, è dunque, pure, dente specifica^{Aas JA e Coll. 2005} e anche tra sito e sito di uno stesso elemento dentale, per cui è, altresì, sito specifica^{Socransky SS, Haffajee AD, 1998}.

FORMAZIONE DEL BIOFILM

Dopo un'accurata ed efficace igiene professionale, la superficie dentale dovrebbe risultare priva di batteri.

Dopo pochi minuti però, glicoproteine di derivazione salivare, si depositano sulle superfici deterse di denti e manufatti protesici, formando la pellicola acquisita (Fig. 137a), che rappresenta la base per la successiva adesione iniziale da parte di colonie batteriche, principalmente di forma rotondeggiante, di tipo Gram+, aerobie (Fig. 137b). La placca si deposita in modo più abbondante (4 volte di più) a livello del margine gengivale^{Axelsson P e Coll., 1987}.

La microflora del cavo orale è un'entità molto complessa e dinamica, profondamente influenzata dalle variazioni ambientali locali^{Armitage GC, 2010}. La presenza di una flora batterica composta da commen-



Figg. 137a-c La sequenza dei disegni illustra le fasi iniziali della formazione della placca microbica. Nel primo disegno a sinistra, si nota una superficie dentale, recentemente deteresa, su cui si forma la cosiddetta "pellicola acquisita" di derivazione salivare (a). Nel disegno centrale si illustra l'adesione iniziale alla pellicola acquisita, da parte delle colonie batteriche di forma rotondeggiante (b). Nell'ultimo di destra si osserva l'adesione di altre forme batteriche, associata, anche, alla replicazione di quelle presenti (c).

sali, tra cui potenziali patogeni, è essenziale per il corretto sviluppo dell'immunità della mucosa orale^{Davey ME, O'toole GA, 2000}.

Tali microrganismi sopravvivono in un complesso biofilm composto di comunità polimicrobiche organizzate, che si adattano a sopravvivere nei molteplici micro-ecosistemi della cavità orale (i.e. superficie dei denti, mucose, cripte tonsillari, solco dento-gengivale, eccetera^{Kuboniwa M e Coll., 2009; Berezow AB, Darveau RP, 2011}).

I batteri si organizzano in microcolonie, che poi secernono una sostanza polimerica extracellulare, che permette loro di aderire alle superfici dure. All'interno di tale architettura, molteplici specie si organizzano in rapporti biologici reciproci. Il biofilm rappresenta una forma di "impropria" protezione per i batteri, che riescono spesso così a eludere l'azione del sistema immunitario e dei farmaci^{Dentino A, e Coll., 2013}.

Di conseguenza, il biofilm risulta un'entità dinamica che si modifica nel tempo^{Darveau RP, 2009}. Se il biofilm non viene rimosso adeguatamente, si accumula determinando processi infettivi-infiammatori, che sono alla base dei processi patologici del parodonto. Numerosi studi hanno cercato di identificare i ceppi responsabili della malattia parodontale;

tuttavia il compito è risultato arduo, sia perché il biofilm è un'entità dinamica, sia perché esistono diversi quadri clinici di malattia parodontale. Dai dati della letteratura odontoiatrica si evince che i ceppi batterici, più frequentemente associati allo sviluppo della malattia parodontale^{Listgarten MA, Loomer PM, 2003}, sono:

- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*,
- *Porphyromonas gingivalis*,
- *Tannerella forsythia*,
- *Treponema denticola*,
- *Eubacterium sapenum*,
- *Atopobium rimae*,
- *Porphyromonas endodontalis*,
- *Treponema lecithinolyticum*,
- *Capnocytophaga ochracea*.

Sia *Porphyromonas gingivalis* che *Treponema denticola* si associano a segni clinici di distruzione parodontale. Sono presenti nel biofilm in via di formazione e, *in vitro*, hanno la capacità di produrre un certo numero di proteinasi di membrana, responsabili della distruzione clinica dei tessuti parodontali. Insieme a *Tannerella forsythia*, sono i ceppi batterici più frequentemente identificati negli individui affetti da parodontite^{Mineoka T e Coll., 2008}.

Porphyromonas gingivalis e *Porphyromonas endodontalis* appartengono al genere *Porphyromonas*. Alcuni studi hanno dimostrato che tali patogeni giocano un ruolo fondamentale, rispettivamente nelle forme di parodontite e nelle infezioni del canale radicolare^{van Winkelhoff AJ, 1985}.

L'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, detto precedentemente *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, è un comune batterio presente nelle infezioni della cavità orale, soprattutto in caso di parodontite^{Kachlany SC, 2010}.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans è un *Coccobacillus* gram-negativo, fortemente associato alla parodontite aggressiva e in misura minore alla parodontite cronica^{Slots J, 1999}, i cui effetti dipendono dalla carica batterica e dalla suscettibilità dell'ospite^{Fine DH e Coll., 2006}.

L'*Aggregatibacter* è l'agente eziologico delle forme localizzate di parodontite aggressiva (LAP), che si manifesta negli adolescenti^{Fine DH e Coll., 2013}. Secerne una tossina proteica, leucotossina (LtxA), una tossina di membrana attiva, specifica dei globuli bianchi, che aiuta il batterio a eludere la risposta immunitaria in corso di infezione^{Kachlany SC, 2010}.

Capnocytophaga ochracea, è un bacillo gram-negativo, anch'esso riconosciuto come agente patogeno della parodontite^{Griffen AL e Coll. 2003; Newman MG e Coll. 1977; Socransky SS e Coll. 1979}.

Eubacterium saphenum e *Atopobium rimae*, sono entrambi batteri anaerobi gram-positivi, ma il primo è associato alla parodontite cronica mentre il secondo è più frequente nei soggetti parodontalmente sani, rispetto a quelli malati^{Kuboniwa M e Coll., 2009}.

Treponema lecithinolyticum appartiene al gruppo filogenetico delle spirochete orali, frequentemente associate sia alla parodontite cronica, che a quella aggressiva.

I principali microrganismi coinvolti nelle parodontiti possono essere suddivisi principalmente in due gruppi, quelli del **complesso rosso** e quelli del **complesso arancione**, secondo la definizione microbiologica introdotta da Socransky^{Socransky SS, 1998}.

Al **complesso rosso** appartengono *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. A quelli del **complesso**

arancione *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*^{Hajishengallis G, Lamont RJ, 2012}.

Un fattore da approfondire, di indiscussa rilevanza, è la variabilità genetica individuale, in grado di modulare la risposta immunitaria all'insulto infettivo e all'entità dell'infiammazione.

Gli studi di Michalowicz, del 1991 hanno dimostrato come, nei gemelli monozygoti si riscontrasse un'analogia reattività alla stessa noxa patogena, confermando come **l'infezione parodontale fosse determinata per il 50% da un fattore ereditario**. Kornman introdusse nel 1997 il termine "Polymorphism" (polimorfismo)^{Michalowicz BS, 1991}.

Più recentemente si identificano come fattori chiave nella regolazione della risposta immunitaria di tipo innato contro gli agenti microbici, la interleuchina IL6, citochine pro e anti-infiammatorie, prodotte da cellule quali macrofagi e linfociti, IL10 e il recettore della vitamina D (VDR), un fattore di trascrizione che si trova nel nucleo delle nostre cellule, che ha la capacità, una volta attivato, di legarsi al DNA e di accendere (o spegnere) i geni vicini.^{Bikle DD, 2014}

TEST DIAGNOSTICI

I batteri hanno sicuramente un ruolo primario nell'insorgenza della malattia parodontale, in altre parole: **in assenza di batteri non c'è patologia placca indotta**. Questo dato rafforza il razionale di una rimozione efficace, domiciliare e professionale, della componente batterica come strategia comunque necessaria e imprescindibile. Tuttavia, **l'assetto genetico influenza la suscettibilità alla patologia parodontale e, insieme a una serie di altri fattori legati all'ospite, modula anche l'evoluzione clinica e la velocità di progressione, in sintesi predispone alcuni individui, più di altri ad ammalare**^{Heitz-Mayfield LJ., 2005}.

Si è visto che anche tra gruppi di pazienti, clinicamente omogenei, esiste eterogeneità polimorfa a carico di quei geni che influenzano la suscettibilità a sviluppare parodontiti e/o periimplantiti^{Loos BG, Van der Velden U., 2002}.

Per polimorfismo si intende la variabilità di un carattere codificato da un gene. Se il gene codifica per la proteina "colore degli occhi", in base al polimorfismo, l'iride può essere verde, azzurra, marrone, eccetera.

Sembrerebbe che mutazioni a carico di tali geni possano essere responsabili del ripetersi di episodi infiammatori, la cui cadenza ciclica è caratteristica della malattia parodontale^{Scarel-Caminaga RM e Coll., 2003}.

I polimorfismi genetici sono marcatori molecolari, in grado di rivelare quali elementi, all'interno di una complessa rete di proteine, siano fondamentali nel determinare il rischio e la gravità della malattia. Di conseguenza, conoscere il profilo genetico di ogni paziente è utile per adottare strategie di prevenzione e trattamento della parodontite, nonché per individuare interventi terapeutici mirati.

Per cui, nella fase diagnostica iniziale, oltre a un'accurata valutazione clinica e strumentale, può essere opportuno utilizzare un test microbiologico affidabile, che oltre ad analizzare la flora batterica del cavo orale, consenta di caratterizzare il profilo genetico del soggetto in cura. Tale dato è essenziale per elaborare un piano terapeutico altamente personalizzato e mirato alle criticità individuali.

TEST GENETICO

Anche in assenza di manifestazioni cliniche di malattia, il test genetico valuta la predisposizione individuale ad ammalarsi, di conseguenza rende possibile un intervento di prevenzione primaria efficace, che se applicato con regolarità nel tempo, modifica la suscettibilità del soggetto.

Si tratta dunque di uno strumento da raccomandare soprattutto ai famigliari di pazienti affetti da patologia parodontale, per verificarne la predisposizione genetica, con l'obiettivo di prevenirla e/o intercettarne l'insorgenza^{Dentino A e Coll., 2013}.

È sufficiente eseguire il test genetico, una sola volta, infatti la tipizzazione cromosomica non varia nel tempo^{Higashi MK e Coll., 2002}.

Il test genetico individua variazioni alleliche a carico di geni maggiormente associati in letteratura alla patologia parodontale quali: IL-10, IL-6 e VDR (Fig. 138). L'esame è effettuato sul DNA genomico del paziente utilizzando la tecnica TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Questa metodica permette di discriminare la variante allelica di uno specifico polimorfismo, servendosi di due sonde marcate con fluorocromi diversi.

Fig. 138



TEST PARODONTALE

La LAB s.r.l. (www.labsrl.com) ha messo a punto un esame particolarmente sensibile (Fig. 138), che si avvale della tecnica Real Time-Polymerase Chain Reaction (Real-Time PCR), previo prelievo di fluido crevicolare, riuscendo così ad amplificare e contemporaneamente a quantificare molecole di DNA, di un determinato campione biologico, utilizzando sonde fluorescenti specifiche, che ibridano (cioè si legano) con le sequenze target. Il test prevede alcune fasi operative, qui di seguito descritte:

• Modalità di prelievo

Prelievo del fluido crevicolare, in cui sono ovviamente presenti batteri e cellule epiteliali, utilizzando punte coniche di carta assorbente.

Tale cono, trattenuto con una pinzetta chirurgica (Fig. 139), è inserito nelle tasche parodontali o periimplantari (Fig. 140) e lasciato *in situ* per almeno 30 secondi, in modo che la carta si imbibisca di fluido crevicolare, dopodiché viene introdotto in una micro provetta sterile (Fig. 142). La raccolta dei campioni è rapida e totalmente indolore per il paziente. Il campione è identificato tramite un codice, a garanzia della rintracciabilità dei risultati e dell'anonimato del paziente. Una volta effettuato il prelievo questo può essere spedito a temperatura ambiente in una semplice busta di carta, sulla quale è indicato l'indirizzo del laboratorio, LAB s.r.l., che effettuerà le analisi e ne invierà i risultati all'operatore sanitario, in tempi rapidi, tramite posta elettronica (Fig. 141).



Fig. 139

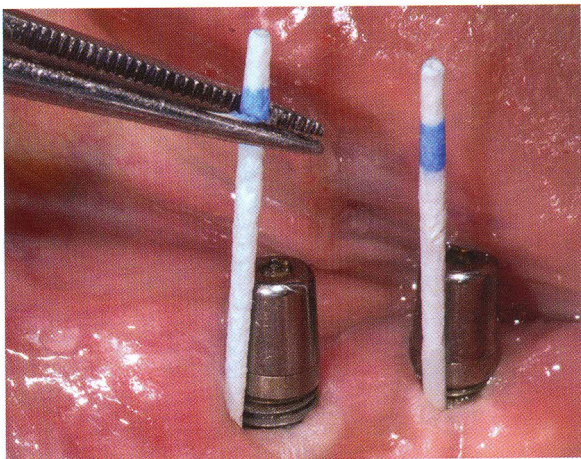


Fig. 140

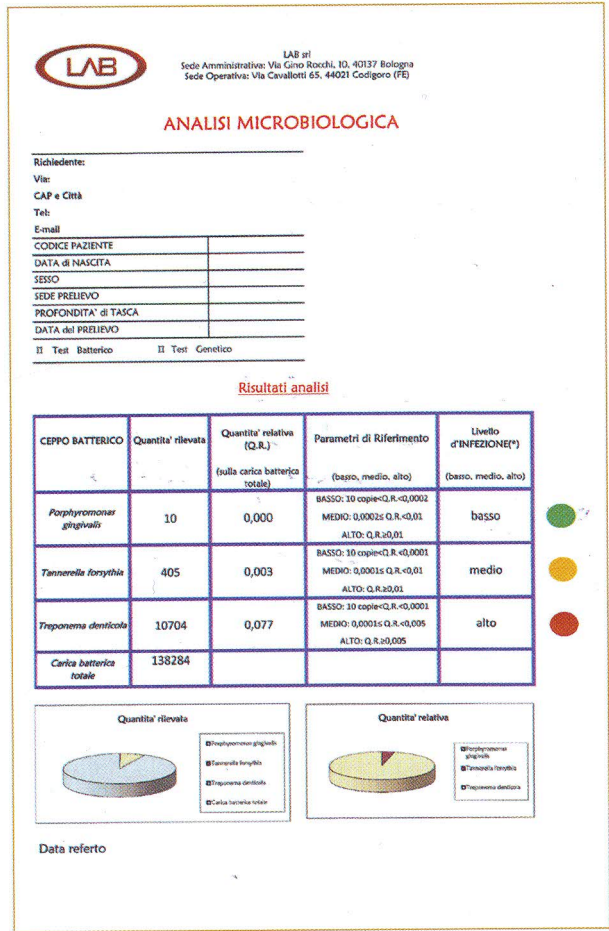


Fig. 141

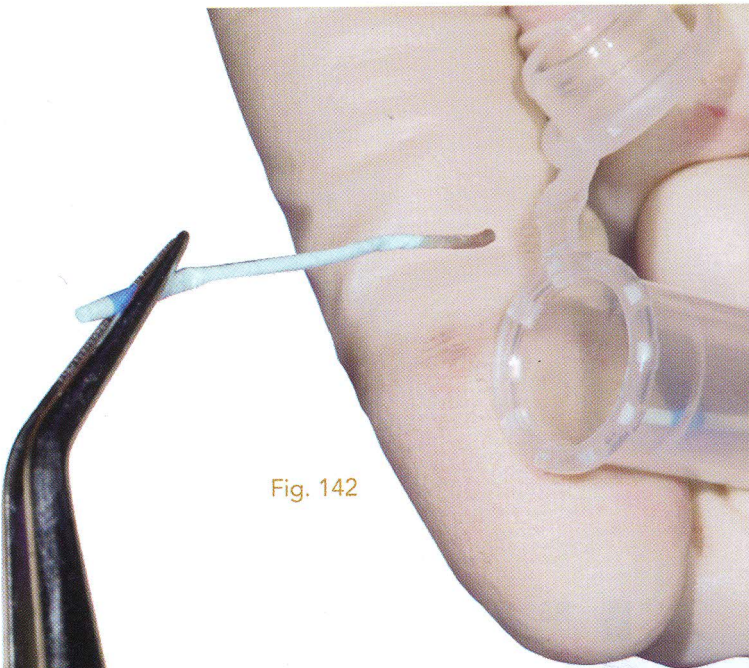


Fig. 142

- Estrazione del DNA totale

Estrazione del DNA batterico e umano

Il DNA batterico, insieme a quello umano, viene estratto e purificato dal fluido crevicolare raccolto, mediante un apposito kit di estrazione, che prevede una lisi enzimatica della parete batterica, con lisozima e della membrana nucleare delle cellule umane, con proteinasi K.

Dopo 2 ore di incubazione a 55 °C, il DNA totale si libera, viene caricato su un'apposita colonnina contenente una resina in grado di trattenerlo, eliminando i detriti cellulari residui.

Il DNA è quindi lavato con appositi buffer, eluito in una soluzione, per poterlo conservare e analizzare.

- Si procede poi...

... all'amplificazione e quantificazione di specifiche sequenze genomiche di batteri parodontali e del genoma umano, che predispongono all'insorgenza di parodontite.

Il test microbiologico consente di accertare, in modo affidabile, la carica batterica totale presente nel prelievo, ed esamina quantitativamente le specie batteriche più rilevanti, specifiche della malattia parodontale. In particolare, si ricercano i ceppi *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (Fig. 141).

Il test è effettuato sullo strumento ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizzando sonde florescenti TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) specifiche per ogni ceppo batterico e marcate con fluorocromi diversi, che permettono la co-amplificazione di più target in un'unica reazione. Si ottiene così un parametro oggettivo della condizione clinica del paziente, che, in quanto tale, **assume il valore di documento, con valore medico legale.**

Una valutazione microbiologica di tipo molecolare, può essere ripetuta a distanza di tempo, per verificare l'efficacia del trattamento, determinare la stabilità biologica dei risultati clinici ottenuti oppure per orientare il clinico a un diverso programma terapeutico. **Si raccomanda l'utilizzo di un'analisi microbiologica, nelle fasi di elaborazione di un piano di trattamento complesso, implantare, soprattutto in soggetti vulnerabili alla malattia parodontale.**