



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in:
IGIENE DENTALE

Tesi di Laurea:

**STUDIO CLINICO RANDOMIZZATO IN DOPPIO
CIECO PER LA VALUTAZIONE DI DUE COLLUTORI
IN PAZIENTI CON GENGIVITE**

Candidato:
Vittoria Ciattaglia

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa Giovanna Orsini

Correlatori:
Prof.ssa Scilla Sparabombe

Dott. Riccardo Monterubbianesi

Anno Accademico 2020-2021

INDICE

INTRODUZIONE	5
1.0 La salute parodontale	6
1.1 Cenni istologici sulla salute parodontale.....	6
1.2 I determinanti di un parodonto sano.....	6
1.3 La salute parodontale clinica.....	7
1.3.1 Gli indicatori clinici di salute parodontale	7
1.3.2 I quattro livelli di salute parodontale.....	8
1.4 La classificazione della salute parodontale: applicazione clinica e pratica.....	9
1.5 La microbiologia del parodonto sano.....	9
2.0 Le condizioni gengivali placca indotte	10
2.1 L'insorgenza della gengivite	10
2.2 Le caratteristiche universali della gengivite.....	10
2.2.1 La semeiotica della gengivite placca indotta.....	11
2.3 La gengivite in un parodonto ridotto.....	11
2.4 Revisioni del sistema di classificazione delle malattie gengivali placca correlate del 1999	12
2.4.1 Descrizione dell'estensione dell'infiammazione gengivale	12
2.4.2 La severità dell'infiammazione gengivale	12
2.4.3 La severità del gonfiore gengivale	12
2.4.4 Alcune considerazioni finali	13
3.0 La definizione del caso di gengivite placca indotta	14
3.1 La necessità di definizione di gengivite placca indotta.....	14
3.1.1 Il volume del fluido crevicolare: vantaggi e limiti.....	14
3.1.2 Il Gingival Index (GI): vantaggi e limiti	14
3.1.3 L'indice di sanguinamento gengivale	15
3.2 Gli approcci futuri nella definizione del caso di gengivite	15
3.2.1 La proteomica del fluido crevicolare: vantaggi e limiti	16
3.2.2 La proteomica salivare: vantaggi e limiti.....	16
3.2.3 I markers microbiologici: vantaggi e limiti.....	16
3.2.4 I markers genetici: vantaggi e limiti.....	17
3.3 La diagnosi di gengivite	17
4.0 Malattie gengivali non indotte da placca	20

5.0 Le Parodontiti	24
5.1 La parodontite: definizione della patologia.....	24
5.1.1 La definizione del paziente parodontale.....	24
5.2 Il sistema di staging e grading della parodontite.....	24
5.2.1 La stadiazione: un focus sullo stadio 1.....	26
5.2.2 La stadiazione: un focus sullo stadio 2.....	26
5.3 La microbiologia della parodontite cronica	26
6.0 La Clorexidina	27
6.1 La Clorexidina: accenni di chimica.....	27
6.2 Formulazioni ed usi della Clorexidina	27
6.3 L'attività antimicrobica della clorexidina	28
6.4 Effetti collaterali, controindicazioni e reazioni allergiche della Clorexidina.....	28
6.5 Impiego della Clorexidina per il management della malattia orale.....	29
7.0 Verso nuove prospettive: l'alternativa del fitoterapico	30
7.1.4.1 L'alternativa del fitoterapico: alcuni esempi.....	30
8.0 La sperimentazione	32
8.1 OBIETTIVO:	32
8.2 MATERIALI E METODI.....	32
8.2.1 Collutori	32
8.2.2 Pazienti.....	32
8.2.3 Disegno dello studio.....	34
8.2.4 Lo studio microbiologico	35
8.2.5 Esecuzione del Full Mouth Bleeding Score	35
8.2.6 Esecuzione del Full Mouth Plaque Score.....	35
8.2.7 Il Modified Lobene Stain Index: applicazione ed uso nel nostro contesto.....	36
8.3 ANALISI DEI DATI	36
8.4 RISULTATI.....	37
8.4.1 Gli indici clinici.....	37
8.4.2 La conta microbica.....	38
8.4.3 Il Modified Lobene Stain Index (MLSI).....	39
8.4.4 La scala VAS.....	40
8.4.5 Gli effetti avversi.....	41
8.5 DISCUSSIONE.....	41
8.7 CONCLUSIONE	43

8.6 ALLEGATI.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	47

INTRODUZIONE

La placca dentale è un biofilm di microorganismi che si trova sulla superficie del dente, inglobata in una matrice polimerica originata dall'ospite e dai batteri (Loe et al. 1965; Escribano et al. 2016). La presenza di placca, se non rimossa, può portare allo sviluppo di gengivite e parodontite (Tatakis et Kumar 2005; Kinane et al. 2017) ed il trattamento di queste condizioni consiste nella rimozione meccanica della placca, attraverso lo spazzolamento, la pulizia degli spazi interdentali attraverso l'uso degli scovolini e del filo e le procedure di scaling e root planning. A ciò si aggiunge la terapia antimicrobica topica e/o sistemica e il controllo chimico/inibizione della formazione di placca attraverso l'uso di collutori (Dyke, 2008; Pretzl et al. 2019). Sebbene il controllo meccanico della placca abbia un ruolo preventivo primario nello sviluppo della malattia parodontale, da solo, non è sufficiente (Pretzl et al. 2019; Page ed Eke 2007; Sälzer et al. 2015; Tonetti et al. 2015). Ci sono, infatti, forti evidenze a favore dell'uso di agenti antimicrobici come coadiuvanti del controllo meccanico della placca (Gunsolley, 2006). Gli agenti antimicrobici, o collutori, possono essere divisi in sintetici (clorexidina, Sali di ammonio e di fluoro) o naturali (oli essenziali o piante). Nonostante la clorexidina 0,12% appresenti la soluzione gold standard, gli effetti collaterali, nel lungo periodo sono frequenti. Per questo motivo nuovi collutori vengono studiati e sviluppati al fine di risolvere questi problemi. I collutori naturali rappresentano un'alternativa alla clorexidina, poichè sembrano non avere effetti avversi (Eick et al. 2011; Lang e Brex 1986). Per cui lo scopo della tesi è indagare l'efficacia clinica di collutori e valutare fino a che punto possono sostituirsi all'uso della clorexidina.

In questa tesi, infatti, descritto il concetto di salute parodontale e di infiammazione gengivale, si farà un focus generale sulle conoscenze odierne degli attuali collutori sintetici e naturali. Si illustrerà, poi, una sperimentazione condotta al fine di confrontare l'efficacia di un collutorio fitoterapico e di un collutorio contenente CITROX® nei confronti della clorexidina.

1.0 La salute parodontale

1.1 Cenni istologici sulla salute parodontale

Con il termine salute parodontale, si intende una condizione libera da malattie parodontali infiammatorie. È importante la sua intercettazione al fine di comprendere la malattia e stabilire i risultati di un trattamento (Lang e Bartold 2018).

La salute parodontale è classificabile sia dal punto di vista istologico, che clinico.

Nel primo caso, studi istologici sull'uomo hanno dimostrato che un infiltrato infiammatorio sottostante l'epitelio giunzionale è sempre presente in tessuti gengivali clinicamente sani. È caratterizzato dalla presenza di linfociti, intorno al 17%, di fibroblasti, intorno al 48% e di leucociti polimorfonucleati, in una percentuale del 20-22%. Le percentuali variano in presenza di malattia (Loe e Silness 1963).

È stata inoltre dimostrata la presenza di linfociti B (Lang e Bartold 2018).

È stato dimostrato che la densità del tessuto connettivo infiltrato diminuisce in modo significativo a seguito di un periodo di sei mesi di regime di ottima e meticolosa igiene domiciliare (Brecx et al. 1987).

Il termine gengiva clinicamente sana può, quindi, indicare o una assenza o una lieve presenza di indicatori di infiammazione, come l'indice di sanguinamento (Lang e Bartold 2018).

1.2 I determinanti di un parodonto sano

I determinanti di un parodonto sano si distinguono in:

- determinanti microbiologici, tra cui la composizione della placca sopra e sotto gengivale;
- determinanti dell'ospite, tra cui i fattori predisponenti locali, quali tasche parodontali, restauri, anatomia delle radici, posizione dentale e fattori sistemici;
- determinanti ambientali, tra cui il fumo, l'utilizzo di farmaci, lo stress e l'alimentazione.

I seguenti determinanti si distinguono in:

- fattori predisponenti, nonché ogni agente o condizione che contribuisce all'accumulo di placca, come l'anatomia, l'affollamento dentario;
- fattori che influenzano la risposta, nonché ogni agente o condizione che altera il modo in cui l'individuo risponde all'accumulo di placca, come il fumo, le condizioni sistemiche;
- fattori modificabili, come la rimozione di sottosquadri, il controllo glicemico, la cessazione dell'abitudine tabagica;
- fattori non modificabili, nonché la predisposizione genetica, lo stato immunitario, la necessità di assunzione di determinati farmaci.

Si ricorda che la placca batterica è un fattore di rischio diretto di insorgenza della malattia parodontale per il 20%. Il rimanente 80% è attribuibile a fattori diretti, indiretti e a quelli che influenzano la risposta (Lang e Bartold 2018).

1.3 La salute parodontale clinica

Con salute parodontale clinica, invece si intende una condizione caratterizzata da una assenza o da una minima quantità di infiammazione parodontale includendo sia il parodonto intatto che quello ridotto.

Con quest'ultimo si intende il parodonto di un paziente che ha già avuto esperienza di malattia parodontale, trattata, e che attualmente presenta una certa stabilità parodontale, o il parodonto di un paziente non parodontale, ma che presenta recessioni o che si è sottoposto ad un intervento di allungamento di corona clinica (Lang e Bartold 2018).

1.3.1 Gli indicatori clinici di salute parodontale

La profondità di sondaggio, il livello di attacco clinico e di osso, da soli, non possono essere utilizzati come evidenza di salute gengivale o malattia. La mobilità, lo spazio del legamento parodontale hanno una grande variabilità e non possono considerarsi indicatori di salute. Occorre invece considerare altri parametri clinici importanti, come l'indice di sanguinamento, i fattori che influenzano e i fattori predisponenti la malattia (Lang e Bartold 2018).

Dati clinici e istologici suggeriscono che il sanguinamento al sondaggio è un segno precoce di gengivite insieme al rossore e al gonfiore gengivale. La pressione al sondaggio dovrebbe essere sufficiente per consentire la misurazione della tasca, ma delicata al fine di non creare un trauma. La pressione ideale al sondaggio corrisponde a 0,25 N; un valore maggiore potrebbe creare falsi positivi del 13% in più (Lang et al. 1991; Karayiannis et al. 1992).

In caso di sanguinamento positivo, il valore predittivo rimane basso, anche in presenza di ripetute valutazioni positive ($\leq 30\%$). In caso di valutazione negativa, il valore predittivo si avvicina al 100%. Ciò a riprova del fatto che l'assenza di sanguinamento a ripetute valutazioni è indice di stabilità parodontale. Il BoP, *Bleeding on Probing* (o anche FMBS- *Full Mouth Bleeding Score*) si valuta tramite stimolazione con sonda parodontale inserita fino al solco. Il rapporto tempo-efficacia dell'indice è di dieci secondi.

Il sondaggio dovrebbe esser fatto su tutta la bocca, alla stessa pressione di 0,25 N, con lo stesso tipo di sonda (Lang e Bartold 2018).

1.3.2 I quattro livelli di salute parodontale

Ad oggi possiamo identificare quattro livelli di salute parodontale:

- Parodonto intatto: indica la totale assenza di infiammazione, è presente una sorveglianza immunitaria fisiologica, i tessuti parodontali di supporto, osso e legamento, sono intatti.
- Parodonto clinicamente sano: è caratterizzato dall'assenza o da minimi livelli di infiammazione clinica. I tessuti di supporto parodontali sono senza segni di infiammazione.
- Malattia parodontale stabilizzata: è una condizione in cui la malattia parodontale è stata trattata con successo attraverso il controllo dei fattori locali e sistemici. Il BoP è minimo, ottimi sono i miglioramenti della profondità di sondaggio e di attacco clinico e non c'è progressione di malattia.
- Malattia parodontale remissiva/sotto controllo: indica una condizione in cui il trattamento ha portato ad una riduzione dell'infiammazione, c'è stato un miglioramento della profondità di sondaggio e di attacco clinico ma non c'è un controllo ottimale dei fattori locali, sistemici e ambientali. In questo caso una

progressione molto lenta della malattia potrebbe essere un obiettivo accettabile della terapia (Lang e Bartold 2018).

1.4 La classificazione della salute parodontale: applicazione clinica e pratica

Per gengiva clinicamente sana in un parodonto intatto o in un parodonto ridotto di un paziente non parodontale si intende una condizione caratterizzata dall'assenza di sanguinamento al sondaggio, eritema, edema, fastidi riferiti dal paziente, perdita di osso alveolare di supporto. Il BoP deve essere <10% con profondità di sondaggio ≤ 3 mm.

Per gengiva clinicamente sana in un parodonto ridotto di un paziente con stabilità parodontale, si intende una condizione caratterizzata dall'assenza di sanguinamento al sondaggio, eritema, edema, fastidi riferiti dal paziente in presenza di un ridotto attacco clinico e un ridotto livello di osso. Il BoP deve essere <10%, non ci deve essere sanguinamento al sondaggio in siti ≥ 4 mm, non ci deve essere nessuna progressione di perdita di attacco clinico (Lang e Bartold 2018).

1.5 La microbiologia del parodonto sano

La microflora batterica associata a tessuti parodontali sani è principalmente caratterizzata dalla presenza di microorganismi Gram-positivi con la predominanza di *Actinomyces* e *Streptococcus spp.* Gli streptococchi sono considerati microorganismi pionieri, che creano un ambiente favorevole alla colonizzazione di specie più patogene. Tra questi sono predominanti *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguis*. Questi sono principalmente aerobi o anerobi facoltativi. Specie di microorganismi Gram-negativi e spirochete possono esser presenti ma in minor concentrazione (Popova et al. 2013; Marsh,2000).

2.0 Le condizioni gengivali placca indotte

2.1 L'insorgenza della gengivite

L'inizio di una gengivite si verifica quando la placca dentale, accumulatasi e non rimossa nell'arco di giorni e/o settimane, causa una perdita di simbiosi tra il biofilm e lo stato immuno-infiammatorio dell'individuo, portando ad una disbiosi incipiente.

La risposta infiammatoria può essere modificata da fattori sistemici quali endocrinopatie, condizioni ematologiche, dieta e farmaci (Murakami et al. 2018).

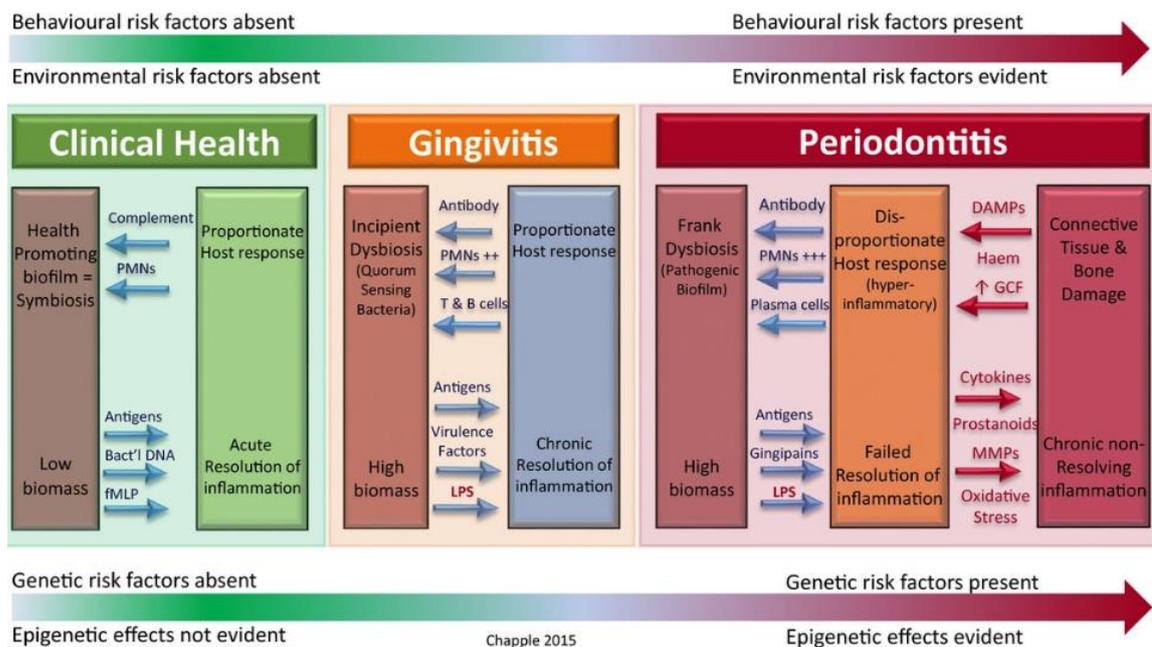


Fig 1.0: Modello contemporaneo di interazione ospite-microorganismo nella patogenesi della malattia parodontale (Murakami et al. 2018)

2.2 Le caratteristiche universali della gengivite

Le caratteristiche universali della gengivite, sia essa associata a placca e/o fattori sistemici sono:

- segni e sintomi clinici di infiammazione limitati alla gengiva libera e aderente;
- reversibilità dell'infiammazione in seguito alla rimozione del biofilm;
- presenza di placca batterica;
- attacco clinico parodontale stabile;

- nessuna perdita di osso alveolare (Murakami et al. 2018).

2.2.1 La semeiotica della gengivite placca indotta

I cambiamenti iniziali dello stato di salute gengivale potrebbero non essere rilevati clinicamente.

Tuttavia, col progredire della patologia, i segni e sintomi diventano più evidenti e possono diffondersi dal margine gengivale fino all'intera unità gengivale restante.

Tra questi si hanno:

- sanguinamento allo spazzolamento;
- sangue presente nella saliva;
- gonfiore;
- rossore;
- alitosi nel caso di forme consolidate.

L'intensità dei segni e dei sintomi clinici varia da individuo a individuo, così come tra i vari siti della dentatura.

La severità della gengivite placca indotta dipende anche da:

- condizioni sistemiche, quali associazione agli ormoni steroidei sessuali, all'iperglicemia, alla leucemia, al fumo, alla malnutrizione;
- fattori orali che promuovono l'accumulo di placca, come restauri con margine debordante sotto gengivale e iposalivazione;
- farmaci (Murakami et al. 2018).

2.3 La gengivite in un parodonto ridotto

La gengivite, in un parodonto ridotto, è caratterizzata dal ripristino di una infiammazione dovuta alla presenza di batteri sul margine gengivale. Anche in questo caso non c'è evidenza di progressione di perdita di attacco clinico, ma c'è un rischio maggiore di recidiva della malattia parodontale, nonostante i richiami di igiene professionale e l'igiene domiciliare (Murakami et al. 2018).

2.4 Revisioni del sistema di classificazione delle malattie gengivali placca correlate del 1999

La classificazione delle malattie e condizioni parodontali e perimplantari del 2017 ha revisionato il sistema di classificazione del 1999 per le malattie gengivali placca correlate, includendo la descrizione dei seguenti parametri:

- l'estensione dell'infiammazione gengivale;
- la severità dell'infiammazione gengivale;
- il gonfiore gengivale (Murakami et al. 2018).

2.4.1 Descrizione dell'estensione dell'infiammazione gengivale

L'infiammazione gengivale può definirsi localizzata quando colpisce meno del 30% dei denti, mentre generalizzata quando supera questo range. Si può inoltre parlare di gengivite incipiente, quando solo alcuni siti sono colpiti da una modesta infiammazione che si presenta come un rossore e una sottile linea interrotta di sanguinamento sulcolare al sondaggio o come un edema con una lieve linea continua di sanguinamento al sondaggio (Murakami et al. 2018).

2.4.2 La severità dell'infiammazione gengivale

La severità dell'infiammazione gengivale può essere valutata considerando il sito, il dente o l'intera dentizione. Si utilizza il GI, ovvero Gingival Index.

L'infiammazione gengivale lieve si presenta come una zona con una lieve variazione di colore e aspetto del tessuto gengivale.

Una zona colpita da infiammazione moderata, invece, presenta rossore, edema, gonfiore e sanguinamento al sondaggio.

Un'infiammazione severa porta ad un evidente rossore e gonfiore e tende a provocare sanguinamento spontaneo (Murakami et al. 2018).

2.4.3 La severità del gonfiore gengivale

Il gonfiore gengivale può essere localizzato, quando è presente solo su un dente o su alcuni denti o, invece, generalizzato quando colpisce l'intera bocca.

Il gonfiore si definisce lieve, quando è limitato alla papilla interdentale. Si definisce moderato, quando il gonfiore provoca l'ingrossamento della papilla e del margine gengivale.

Si parla di gonfiore severo, quando si ha un coinvolgimento della papilla, della gengiva libera e aderente (Murakami et al. 2018).

2.4.4 Alcune considerazioni finali

La presenza clinica o l'assenza di una risposta infiammatoria non può essere necessariamente considerata un segno di salute o di malattia. L'infiammazione, intesa come meccanismo di protezione, è necessaria alla sopravvivenza; l'esacerbazione della risposta infiammatoria è una risposta protettiva contro agenti locali o sistemici.

Peraltro, l'assenza di segni clinici di infiammazione non esclude la presenza di processi infiammatori presenti istologicamente, come succede per i fumatori. Alcuni studi hanno confermato l'associazione tra la gengivite e la parodontite, ma ciò non significa che tutti i siti colpiti da gengivite progrediscono in parodontite.

L'eterogeneità della risposta da parte dell'ospite non può essere interamente attribuita agli aspetti quantitativi e qualitativi del biofilm (Murakami et al. 2018).

3.0 La definizione del caso di gengivite placca indotta

3.1 La necessità di definizione di gengivite placca indotta

Studi longitudinali hanno dimostrato la relazione tra gengivite e parodontite. La presenza di elevati livelli di infiammazione gengivale sembra esser associata allo sviluppo e alla progressione della parodontite. Questo rende necessario definire il caso di gengivite. Esistono tre potenziali strumenti per l'intercettazione dell'infiammazione gengivale:

- il volume del fluido crevicolare;
- l'indice gengivale (GI) (Loe e Silness, 1963);
- gli indici di sanguinamento al sondaggio (Trombelli et al. 2018).

3.1.1 Il volume del fluido crevicolare: vantaggi e limiti

Il volume del fluido crevicolare aumenta all'aumentare dell'infiammazione gengivale. Dunque, potrebbe rappresentare un valido strumento per indicare la presenza di infiammazione ma essendo una procedura lunga e costosa, nella pratica clinica non viene utilizzato (Trombelli et al. 2018).

3.1.2 Il Gingival Index (GI): vantaggi e limiti

Il GI viene eseguito con la sonda e valuta i tessuti marginali e prossimali. Indica lo stato dell'infiammazione della gengiva. La sonda si impegna di 1-2 mm a livello del margine gengivale con angolazione di 45° ed una lieve pressione. In base alla valutazione, vengono assegnati quattro differenti codici:

- codice 0: indica l'assenza di sanguinamento al sondaggio;
- codice 1: indica l'assenza di sanguinamento al sondaggio e la presenza di una lieve infiammazione localizzata, in genere, a livello della papilla dentale;
- codice 2: indica la presenza di sanguinamento al sondaggio, infiammazione moderata a livello del margine gengivale ed aspetto lucido della gengiva aderente;

- codice 3: indica la presenza di sanguinamento spontaneo e di una grave infiammazione che colpisce tutto lo spessore della gengiva libera.

Il GI viene valutato lingualmente, vestibolarmente e nelle zone interprossimali. Vengono valutati i denti di Ramfjord.

Il GI ha trovato impiego in studi istologici sull'uomo ed è correlato all'infiammazione gengivale.

Presenta dei limiti, in quanto trova principalmente impiego nella valutazione della gengivite in gravidanza: il sanguinamento spontaneo è un evento raro al di fuori di questa condizione. Inoltre, l'aspetto della gengiva viene valutato in maniera soggettiva, pertanto non univoca tra gli operatori, se non dopo un'accurata calibrazione (Trombelli et al. 2018).

3.1.3 L'indice di sanguinamento gengivale

Il sanguinamento al sondaggio è un accurato segno precoce di infiammazione. I siti BoP (*Bleeding on Probing*) positivi, istologicamente presentano un infiltrato infiammatorio denso.

Gli indici di sanguinamento più usati sono:

- BoP o FMBS (*Full Mouth Bleeding Score*) (Ainamo e Bay 1975);
- valori 2 e 3 del GI (Van der Weijden et al. 2015);
- indice di sanguinamento angolato (AngBS) (Trombelli et al. 2004; Trombelli et al. 2008).

3.2 Gli approcci futuri nella definizione del caso di gengivite

Per definire l'infiammazione gengivale, diverse metodologie sembrano aver aperto una nuova strada di analisi. Tra queste, si annoverano:

- la proteomica del fluido crevicolare;
- la proteomica salivare;
- i markers microbiologici;
- i markers genetici (Trombelli et al. 2018).

3.2.1 La proteomica del fluido crevicolare: vantaggi e limiti

Il profilo proteomico del fluido crevicolare è distintivo. Dall'analisi quantitativa è emerso un certo numero di proteine presenti in condizioni di salute. In presenza di gengivite, si verifica un incremento sia qualitativo che quantitativo di alcune proteine: Il1-beta, fattori del complemento, MMP-9, fibronectina, precursori della lactotransferrina. La difficoltà emerge nella selezione del campione e nella scelta della metodica di campionamento. Inoltre, gli studi a riguardo risultano molto eterogenei (Trombelli et al.2018).

3.2.2 La proteomica salivare: vantaggi e limiti

Dall'analisi di alcuni studi, sembra che il profilo proteomico riscontrabile in presenza di gengivite sia differente da quello che si può trovare in un paziente in salute: aumenta, infatti, il quantitativo di albumina, emoglobina, MMP-8, MMP-9 e IL-6; diminuisce la cistatina.

Per gli stessi motivi sopra elencati non appare possibile l'applicazione di questa metodologia (Trombelli et al. 2018).

3.2.3 I markers microbiologici: vantaggi e limiti

Già dagli anni 90' si era iniziato a definire la microbiologia della gengivite.

- Gram-positivi: *Actinomyces viscosus*, *Peptostreptococco micros*, ecc;
- Gram-positivi facoltativi: specie *Streptococco*;
- Gram-negativi anerobi: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella parvula*, *Campilobacter gracilis*.

Le evidenze hanno mostrato una forte relazione tra un piccolo gruppo di microorganismi e la parodontite, costituito da *A. actinomycetemcomitans*, *Tannarella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis*. Questi sono fortemente associati all'inizio della malattia parodontale, alla sua progressione e all'insuccesso della terapia parodontale.

Altri microorganismi, come *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum* e alcune spirochete come *Treponema denticola* sono stati associati alla parodontite, seppur il loro ruolo sia meno chiaro.

Si ricorda che la presenza di batteri parodontopatogeni nella flora subgingivale è considerata necessaria, ma non sufficiente per promuovere un'inflammatione parodontale. Bisogna infatti considerare anche la suscettibilità dell'ospite e il rapporto tra microorganismi benefici e patogeni.

La gengivite placca indotta è tra le più comuni forme di malattie parodontali.

Le evidenze affermano che la microflora tipica della gengivite è composta approssimativamente da una proporzione uguale di Gram positivi (56%) e Gram-negativi (44%) di cui il 59% sono anaerobi facoltativi e il 41% anaerobi obbligati. Le specie *Actinomyces* e *Streptococco* sono dominanti e c'è un piccolo numero di bacilli Gram-negativi e anaerobi obbligati come *P. gingivalis* e *P.intermedia* (Popova et al. 2013; Lenartova et al. 2021).

Alcuni studi hanno riportato una correlazione significativa tra GI, BoP ed elevati valori di proteina C reattiva, ma non ci sono ancora evidenze significative (Trombelli et al. 2018).

3.2.4 I markers genetici: vantaggi e limiti

Alcune evidenze emergenti hanno indicato che la risposta infiammatoria può dipendere da processi epigenetici: l'espressione genetica può essere modificata dall'ambiente, dalla dieta, dalle infezioni, ecc. Dunque, la suscettibilità genetica alle infezioni può variare nella vita post-natale senza mutazioni di geni del DNA. Ciò rende impossibile classificare la gengivite solo su base genetica (Trombelli et al.2018).

3.3 La diagnosi di gengivite

La diagnosi di gengivite va effettuata con l'indice di sanguinamento (BoP %) valutato tramite sondaggio parodontale su sei siti per ogni dente presente in bocca, attraverso una valutazione dicotomica, imprimendo una forza di venticinque grammi.

Il BoP score viene usato per differenziare lo stato di salute e classificare la gengivite in localizzata e generalizzata.

Fumo, farmaci, anticoagulanti, caratteristiche genetiche possono influenzare la risposta alla stimolazione della sonda (Trombelli et al. 2018).

	Gengivite localizzata	Gengivite Generalizzata
Perdita di attacco clinico	NO	NO
Perdita di osso radiografica	NO	NO
BOP	$\geq 10\%$, $\leq 30\%$	$> 30\%$

Sondaggi:	$\leq 3\text{mm}$
RX:	Distanza tra CEJ e cresta ossea da 1 a 3 mm

Tab 1.0: La diagnosi di gengivite in un parodonto intatto (Trombelli et al. 2018)

	Gengivite localizzata	Gengivite Generalizzata
Perdita di attacco clinico	SI	Si
Perdita di osso radiografica	Possibile	Possibile
BOP	$\geq 10\%$, $\leq 30\%$	$> 30\%$
Profondità di sondaggio	$\leq 3\text{ mm}$	$\geq 3\text{ mm}$

Tab 1.1: La diagnosi di gengivite in un parodonto ridotto ma sano (senza storia di parodontite)
(Trombelli et al. 2018)

	Gengivite localizzata	Gengivite Generalizzata
Perdita di attacco clinico	SI	Si
Perdita di osso radiografica	Possibile	Possibile
BOP	$\geq 10\%$, $\leq 30\%$	$> 30\%$
Profondità di sondaggio	$\leq 4\text{mm}^*$	$\geq 4\text{ mm}^*$

*= senza sanguinamento

RX	Distanza tra CEJ e cresta oltre 3 mm
CAL	Presenza di perdita di attacco radiografica e clinica
Indice di sanguinamento	$< 10\%$
Tasche	$\geq 5\text{ mm}$

Tab 1.2: La diagnosi di gengivite in un parodonto ridotto a seguito del trattamento per parodontite
(paziente stabile) (Trombelli et al. 2018)

	Infiammazione localizzata	Infiammazione generalizzata
Perdita di attacco clinico	SI	SI
Perdita di osso radiografica	Possibile	Possibile
Profondità di sondaggio	>5mm in massimo 10 siti	>5mm in massimo 10 siti
BOP	>/=10%, </=30%	>30%
RX	Distanza tra CEJ e cresta ossea oltre 3 mm	

Tab 1.3: Condizioni su un parodonto ridotto sotto controllo (Trombelli et al. 2018)

4.0 Malattie gengivali non indotte da placca

1.0 Disturbi genetici/dello sviluppo	1.1 Fibromatosi gengivale ereditaria (HGF)
2.0 Infezioni specifiche	<p>2.1 Infezioni di origine batterica</p> <ul style="list-style-type: none"> • Malattie parodontali necrotizzanti (<i>Treponema</i> spp., <i>Selenomonas</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Prevotella intermedia</i> e altri) • <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (gonorrea) • <i>Treponema pallidum</i> (sifilide) • <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (tubercolosi) • Gengivite streptococcica (ceppi di streptococco) <p>2.2 Infezioni di origine virale</p> <ul style="list-style-type: none"> • Virus Coxsackie (malattia mano-piede-bocca) • Herpes simplex 1/2 (primario o ricorrente) • Virus della Varicella-Zoster (varicella o fuoco di Sant'Antonio che colpisce il nervo V) • Virus del mollusco contagioso • Virus del papilloma umano (papilloma a cellule squamose, condiloma acuminato, verruca <i>vulgaris</i> e iperplasia epiteliale focale)

	<p>2.3 Infezioni di origine fungina</p> <ul style="list-style-type: none"> • candidosi • Altre micosi (p. es., istoplasmosi, aspergillosi)
<p>3.0 Condizioni e lesioni infiammatorie e immunitarie</p>	<p>3.1 Reazioni di ipersensibilità</p> <ul style="list-style-type: none"> • Allergia da contatto • Gengivite plasmacellulare • Eritema multiforme <p>3.2 Malattie autoimmuni della pelle e delle mucose</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pemfigo volgare • pemfigoide • Lichen planus • Lupus eritematoso <p>3.3 Condizioni infiammatorie granulomatose (granulomatosi facciale)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Morbo di Crohn • sarcoidosi
<p>4.0 Processi reattivi</p>	<p>4.1 Epulide</p> <ul style="list-style-type: none"> • Epulide fibrosa • Granuloma fibroblastico calcificante • Granuloma piogenico (epulide vascolare)

	<ul style="list-style-type: none"> • Granuloma a cellule giganti periferico (o centrale)
5.0 Neoplasie	<p>5.1 Lesioni precancerose</p> <ul style="list-style-type: none"> • leucoplachia • Eritroplachia <p>5.2 Lesioni maligne</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma a cellule squamose • Leucemia • linfoma
6.0 Malattie endocrine, nutrizionali e metaboliche	<p>6.1 Carenze vitaminiche</p> <ul style="list-style-type: none"> • Carenza di vitamina C (scorbuto)
7.0 Lesioni traumatiche	<p>7.1 Insulti fisici/meccanici</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cheratosi da attrito • Ulcerazione gengivale indotta dallo spazzolino da denti • Lesione fittizia (autolesionismo) <p>7.2 Insulti chimici (tossici)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mordenzante

	<ul style="list-style-type: none"> • Clorexidina • Acido acetilsalicilico • Cocaina • Perossido di idrogeno • Detergenti per dentifrici • Paraformaldeide o idrossido di calcio <p>7.3 Insulti termici</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ustioni della mucosa
8.0 Pigmentazioni gengivali	<p>Pigmentazione gengivale/melanoplakia</p> <p>Melanosi del fumatore</p> <p>Pigmentazione indotta da farmaci</p> <p>Tatuaggio amalgama</p>

Tab 2.0: Malattie gengivali non placca correlate (Holmstrup et al. 2018)

5.0 Le Parodontiti

5.1 La parodontite: definizione della patologia

La Nuova Classificazione identifica tre categorie di parodontiti:

- Parodontiti Necrotizzanti;
- Parodontiti come manifestazione di malattie sistemiche;
- Parodontiti.

In questo capitolo, l'attenzione verrà focalizzata sulle parodontiti.

La parodontite è una malattia infiammatoria provocata da microorganismi e mediata dall'ospite che porta ad una perdita di attacco parodontale. La malattia viene intercettata attraverso la valutazione della perdita di attacco clinico attraverso una sonda parodontale. Il sanguinamento al sondaggio è un parametro secondario per l'intercettazione della parodontite (Tonetti et al. 2018).

5.1.1 La definizione del paziente parodontale

Un paziente viene definito parodontale quando presenta:

- perdita di attacco clinico interdentale in almeno due denti non adiacenti;
- perdita di attacco clinico vestibolare o buccale ≥ 3 mm con la presenza in almeno due denti di una profondità di sondaggio > 3 mm.

Questi parametri di CAL non devono essere attribuiti a:

- recessioni gengivali di origine traumatica;
- carie dentali estese al di sotto del margine gengivale;
- presenza di CAL nelle superfici distali dei secondi molari associata a malposizione o estrazione del terzo molare;
- lesione endo-perio;
- frattura radicolare verticale (Tonetti et al. 2018).

5.2 Il sistema di staging e grading della parodontite

La nuova classificazione comprende l'estensione e la complessità della malattia, cioè la sua severità. Considera, inoltre, la rapidità di progressione della malattia e i fattori di rischio (Tonetti et al. 2018).

Stadio della Parodontite		Stadio 1	Stadio 2	Stadio 3	Stadio 4
Severità	CAL interdentale (sito più grave)	Da 1 a 2 mm	Da 3 a 4mm	>= 5mm	>= 5mm
	Perdita di osso radiografica	Terzo coronale (<15%)	Terzo coronale (dal 15 al 33%)	Fino alla metà o nel terzo apicale radicolare	Fino alla metà o nel terzo apicale radicolare
	Denti persi	Nessun dente perso per parodontite		Numero denti persi per parodontite <= 4	Numero denti persi per parodontite >= 5
Complessità	Locale	Profondità massima di sonadaggio <=4mm. Riassorbimento osseo principalmente orizzontale	Profondità massima di sonadaggio <=5mm. Riassorbimento osseo principalmente orizzontale	Ciò che è descritto per lo stadio 2 + Sondaggio >= 6mm Perdita di osso verticale >= 3mm Coinvolgimento delle forcazioni di II e III classe Difetto di cresta moderato	Ciò che è descritto per lo stadio 3 + Necessità di riabilitazione a causa di disfunzioni masticatorie, trauma occlusale secondario, severi difetti di cresta, meno di 20 denti residui
Estensione e Distribuzione	Aggiungere come descrizione allo stadio	Per ogni stadio descrivere estensione (<30% dei denti presenti) e localizzazione (molari e/o incisivi)			

Fig 2.0: La stadiazione della Parodontite (Tonetti et al. 2018)

Grado della Parodontite		Grado A basso rischio di progressione	Grado B Rischio di progressione moderata	Grado C Rischio di rapida progressione	
Criteri principali	Evidenza diretta della progressione	Dati Longitudinali (RX, CAL precedenti)	Evidenza di nessuna perdita negli ultimi 5 anni	Perdita di attacco <2mm negli ultimi 5 anni	Perdita di attacco >= 2mm negli ultimi 5 anni
	Evidenza indiretta di progressione	% perdita di osso/età Fenotipo	<0,25 Presenza di depositi di placca anche molto consistenti con un minimo livello di distruzione	Da 0,25 a 1.0 Distruzione parodontale proporzionata alla presenza di biofilm	> 1.0 Eccessiva distruzione parodontale in presenza di scarsa quantità di placca. Distruzione localizzata soprattutto nei molari e negli incisivi; scarsa risposta al trattamento standard
Modificatori di grado	Fattori di rischio	Fumo	Non fumatore	Fumatore < 10 sigarette/die	Fumatore > 10 sigarette/die
		Diabete	Glicemia normale	HbA1c < 7,0% in pazienti con diabete	HbA1c >= 7.0% in pazienti con diabete
Rischio di un impatto sistemico sulla parodontite	Profilo infiammatorio	Alta sensibilità alla proteina C reattiva (CRP)	<1 mg/L	Da 1 a 3 mg/L	> 3 mg/L
Biomarkers	Indicatori di CAL/perdita di osso	Saliva, fluido crevicolare, siero	?	?	?

Fig 2.1: La definizione del grading nella parodontite (Tonetti et al. 2018)

5.2.1 La stadiazione: un focus sullo stadio 1

Lo stadio 1 segna il punto di passaggio tra la gengivite e la parodontite. È lo stadio iniziale di perdita di attacco clinico. Una intercettazione precoce permette di intervenire in maniera mirata e di eseguire un monitoraggio adeguato a prevenire un aumento della severità della malattia. L'utilizzo di biomarkers salivari o test genetici potrebbe facilitare l'intercettazione precoce di una eventuale patologia particolarmente aggressiva (Tonetti et al. 2018).

5.2.2 La stadiazione: un focus sullo stadio 2

Lo stadio 2 rappresenta una forma di parodontite oggettivamente individuabile ma con una necessità di trattamento ancora relativamente semplice. In questo caso è fondamentale osservare la risposta del paziente al trattamento standard. L'identificazione del grado e la risposta al trattamento saranno le basi della gestione personalizzata del caso (Tonetti et al. 2018).

5.3 La microbiologia della parodontite cronica

La flora subgengivale associata alla parodontite cronica è eterogenea e caratterizzata principalmente da *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *Eikenella Corrodens*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. micros*, *Treponema denticola* e *Eubacterium spp.* Gram-negativi anaerobi e capnofili sono dominanti; le spirochete possono essere presenti (Popova et al. 2013).

6.0 La Clorexidina

6.1 La Clorexidina: accenni di chimica

La Clorexidina (CHX) è un composto bis-biguanidico caratterizzato dalla presenza di quattro anelli clorofenilici e due gruppi biguanidi, uniti da un ponte centrale di esametilene.

Quest'ultimo possiede elevata basicità con livelli di pH superiori a 3,5 e con cariche positive in ambo i lati.

È disponibile in forma di digluconato, acetato e sali cloridati.

La proprietà fondamentale della Clorexidina è la sostantività, nonché la capacità di adsorbimento e di legame ai tessuti e fluidi orali, nonché alla saliva e alla pellicola acquisita, garantendo un effetto antiplacca (Thangavelu et al. 2020).

6.2 Formulazioni ed usi della Clorexidina

Per uso orale, la CHX è disponibile in diverse formulazioni:

- CHX 0,20%: tende ad essere raccomandato per il controllo intensivo della placca a breve termine;
- CHX 0,12%;
- CHX 0,06%: indicato per risciacquo giornaliero.

Il collutorio a base di CHX è una soluzione vicino alla neutralità, con pH da 5 a 7.

Per tutte le sue formulazioni, sarebbe necessario risciacquare usando 10 ml di collutorio, due volte al giorno per 30 secondi. È consigliato per uso a breve termine, dalle due alle quattro settimane.

Dopo un singolo sciacquo, il 30% di CHX può rimanere nella saliva fino a 5 ore e sulla mucosa fino a 12 ore.

Per uso orale, il digluconato CHX è disponibile anche in formulazioni gel come:

- CHX 1%;
- CHX 0,2%;
- CHX 0,5%.

CHX è anche presente in “chips” biodegradabili da inserire nelle tasche parodontali unitamente al debridment sottogengivale (Brookes et al. 2020).

6.3 L'attività antimicrobica della clorexidina

Il collutorio a base di CHX ha effetto su batteri, funghi e virus responsabili di una serie di diverse patologie orali. In vitro, CHX altera la permeabilità della membrana cellulare. A basse concentrazioni (0,02%-0,06%), CHX ha effetto batteriostatico, provocando lo spostamento di ioni Calcio e Magnesio e la perdita di ioni Potassio dalla parete cellulare. Ad alte concentrazioni (>0,1%) CHX ha effetto battericida, provocando la lisi e morte cellulare. CHX ha effetti antivirali a causa dell'alterata permeabilità della membrana cellulare. Ha elevata attività verso i virus con involucro, mentre poca attività verso i virus senza involucro, come HPV.

CHX previene la formazione di biofilm su superfici sia biologiche che non da parte di specie come la *Candida* (Brookes et al. 2020).

Ha la capacità di neutralizzare i patogeni parodontali, come *Streptococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. (Thangavelu et al. 2020)

6.4 Effetti collaterali, controindicazioni e reazioni allergiche della Clorexidina

La CHX non è né tossica, né associata ad azione cancerogena (Thangavelu et al. 2020).

Tra i più comuni effetti avversi all'uso di CHX si ha:

- xerostomia;
- ipogeusia;
- lingua patinata;
- formazione di calcoli di tartaro;
- colorazione estrinseca dei denti in caso di uso prolungato.

Tra i meno comuni effetti avversi all'uso di CHX si ha:

- glossodinia;
- desquamazione della mucosa orale;
- gonfiore della ghiandola parotidea;
- parestesia orale.

Le reazioni di ipersensibilità di tipo IV e di tipo I rappresentano gli effetti collaterali più gravi.

Un altro problema emergente con CHX è quello della resistenza antimicrobica, che si esplica attraverso la mutazione o l'aggiunta di materiale genetico, la mutazione della struttura nella membrana cellulare, l'aumento dell'espressione delle pompe di efflusso (Brookes et al. 2020).

6.5 Impiego della Clorexidina per il management della malattia orale.

La CHX è ampiamente utilizzata in odontoiatria:

- per la gestione dell'igiene orale, della placca dentale, della carie;
- per il management della gengivite, parodontite e malattie perimplantari;
- per irrigazioni durante la terapia canalare;
- per la gestione della chirurgia orale e delle complicanze associate;
- per la gestione della malattia della mucosa orale;
- come risciacquo per la riduzione dell'aerosol durante le procedure odontoiatriche
- per la riduzione dell'incidenza dell'osteonecrosi del mascellare;
- per la prevenzione dell'endocardite infettiva in soggetti a rischio;
- per la fissazione intermascellare e per il mantenimento dei dispositivi ortodontici;
- per la cura del paziente "speciale" (Brookes et al. 2020).

7.0 Verso nuove prospettive: l'alternativa del fitoterapico

Dopo venti anni di utilizzo nell'ambito odontoiatrico, la clorexidina viene considerata il gold standard rispetto cui vengono comparati gli altri agenti antiplacca e gengivite.

La clorexidina sembrerebbe avere un valore aggiuntivo in pazienti in cui è stata compromessa la capacità di eseguire corrette manovre di igiene orale, a concentrazione e posologia ottimali (Jones 1997; Teughels et al. 2009).

A causa degli effetti collaterali citati in precedenza, tende ad esser meno apprezzata e gradita ai pazienti. Momentaneamente la ricerca tende alla sostituzione di questa molecola con alternative fitoterapiche, erboristiche, con simil effetti antiinfiammatori.

7.1.4.1 L'alternativa del fitoterapico: alcuni esempi

In uno studio randomizzato in doppio cieco, alcuni studenti universitari sono stati suddivisi in tre gruppi ed hanno ricevuto casualmente uno dei seguenti collutori sottoelencati:

- collutorio alla *Terminalia chebula* (n=30);
- collutorio alla clorexidina 0,12% (n=30);
- acqua distillata (placebo) (n=30).

I pazienti hanno dovuto utilizzare 10 ml di collutorio per trenta secondi due volte al giorno, dopo le normali manovre di igiene domiciliare.

La valutazione è stata effettuata in base al punteggio di placca e al punteggio gengivale a 15 e 30 giorni.

Dall'analisi è risultato che il collutorio alla *Terminalia chebula* è efficace quanto la CHX nel ridurre la placca dentale e l'infiammazione gengivale in un periodo di 15, 30 giorni.

Dunque, il collutorio alla *Terminalia chebula* può esser utilizzato in alternativa alla CHX in quanto ha proprietà simili senza gli effetti collaterali di quest'ultimo (Gupta et al. 2015).

In un altro studio è stata valutata l'efficacia antimicrobica e antiossidante di un collutorio a base di estratto di foglie di *Guava* in pazienti con gengivite cronica generalizzata in aggiunta alla profilassi orale.

Sessanta soggetti sono stati assegnati in modo casuale a uno dei tre gruppi di studio:

- gruppo A- 0,15% collutorio alla *Guava*;
- gruppo B- 0,2% collutorio con clorexidina (CHX);
- gruppo C- Acqua distillata (placebo).

Tutti i partecipanti hanno prima ricevuto la profilassi orale professionale e sono stati dispensati con i collutori sperimentali e istruiti per l'uso per un periodo di 30 giorni.

I parametri clinici come il Gingival Index (GI), il Plaque Index (PI) e le Colony Forming Unit (CFU/mL) sono stati stimati al baseline e a intervalli di 30 e 90 giorni.

Tutti e tre i gruppi hanno mostrato una riduzione graduale di GI, PI e della conta microbica. Tuttavia, sono stati osservati notevoli cambiamenti tra clorexidina e collutorio alla *Guava* rispetto al gruppo placebo. Il collutorio alla *Guava*, dunque, può essere utilizzato come coadiuvante empirico della profilassi orale professionale grazie alle sue proprietà multifattoriali e all'accettazione favorevole. Tuttavia, è necessario condurre studi a lungo termine per convalidare il suo utilizzo per un lungo periodo di tempo (Nayak et al. 2019).

In uno studio condotto in Pakistan si è studiata la combinazione *allium-sativum* e *bakuchiol* per la neutralizzazione delle infezioni orali confrontata con la clorexidina.

Sono state allestite delle colture di *C. albicans* e streptococchi e trattate con i due collutori. Il test di kirby-Bauer, il test di sensibilità agli antimicotici, il conteggio delle CFU e la sinergia tra i farmaci sono stati effettuati sulle colture.

Per concludere, la combinazione *allium sativum* e *bakuchiol* ha mostrato effetti antimicrobici simili alla clorexidina. Dunque, potrebbe risultare un'alternativa naturale alla clorexidina per le pratiche odontoiatriche (Fahim et al 2020).

8.0 La sperimentazione

8.1 OBIETTIVO:

Lo scopo del seguente studio randomizzato di non inferiorità, è valutare l'efficacia clinica di due differenti collutori, nonché un fitoterapico e un collutorio contenente CITROX®, nei confronti di un collutorio a base di CHX 0,12%, in due contesti differenti:

- come trattamento aggiuntivo alle manovre di igiene orale meccanica domiciliare, su biofilm preesistente;
- come unico trattamento di igiene orale su biofilm formatosi “de novo” dopo trattamento parodontale non chirurgico.

In associazione allo studio clinico, è stata effettuata una tipizzazione e una conta microbiologica del cavo orale.

8.2 MATERIALI E METODI

8.2.1 Collutori

Di seguito si descrivono le componenti naturali e farmacologiche dei collutori in esame:

- Pural: è un collutorio contenente estratto di resina di Propoli (1:3), estratto di foglie di *Plantago lanceolata* (1:10), estratto di foglie di *Salvia officinalis* (1:1) e 1,75% di olio essenziale di *Salvia officinalis*. Inoltre, contiene germogli di *Syzygium aromaticum*, estratto di *Mentha piperita*, oleoresina di *Commiphora myrra* e *Pistacia lentiscus*;
- Curaprox PerioPlus + 0,09% di CHX e CITROX®: è un collutorio contenente una formulazione derivata dall'estratto di scorza di arancia amara;
- Clorexidina alla concentrazione di 0,12%, nonché Controllo attivo.

8.2.2 Pazienti

Inizialmente, è stato fornito ai pazienti un consenso informato da leggere e firmare in maniera da apprendere tutte le informazioni e modalità dello studio ed avere conferma

della loro partecipazione. Il seguente è uno studio clinico randomizzato di non inferiorità in doppio cieco.

Tutti gli indici/misurazioni sono stati condotti da un singolo operatore.

I pazienti inclusi nello studio hanno rispettato i seguenti criteri:

- FMBS \geq 20;
- età tra 18 e 75 anni;
- presenza di gengivite o parodontite di stadio I e II sia su parodonto intatto che ridotto (Trombelli et al. 2018; Tonetti et al. 2018);
- numero di denti \geq 20;
- salute sistemica;
- assenza di protesi/dispositivi ortodontici;

I criteri sottostanti, invece, hanno portato all'esclusione dei pazienti:

- presenza di patologie sistemiche;
- utilizzo di farmaci che alterano le condizioni del cavo orale (antipertensivi, antidepressivi, antiepilettici, ecc.)
- uso di antisettici orali nel mese precedente;
- uso di antimicrobici/antibiotici nel mese precedente;
- l'effettuazione di una seduta di igiene orale professionale nei tre mesi precedenti;
- gravidanza o allattamento in atto.

8.2.3 Disegno dello studio

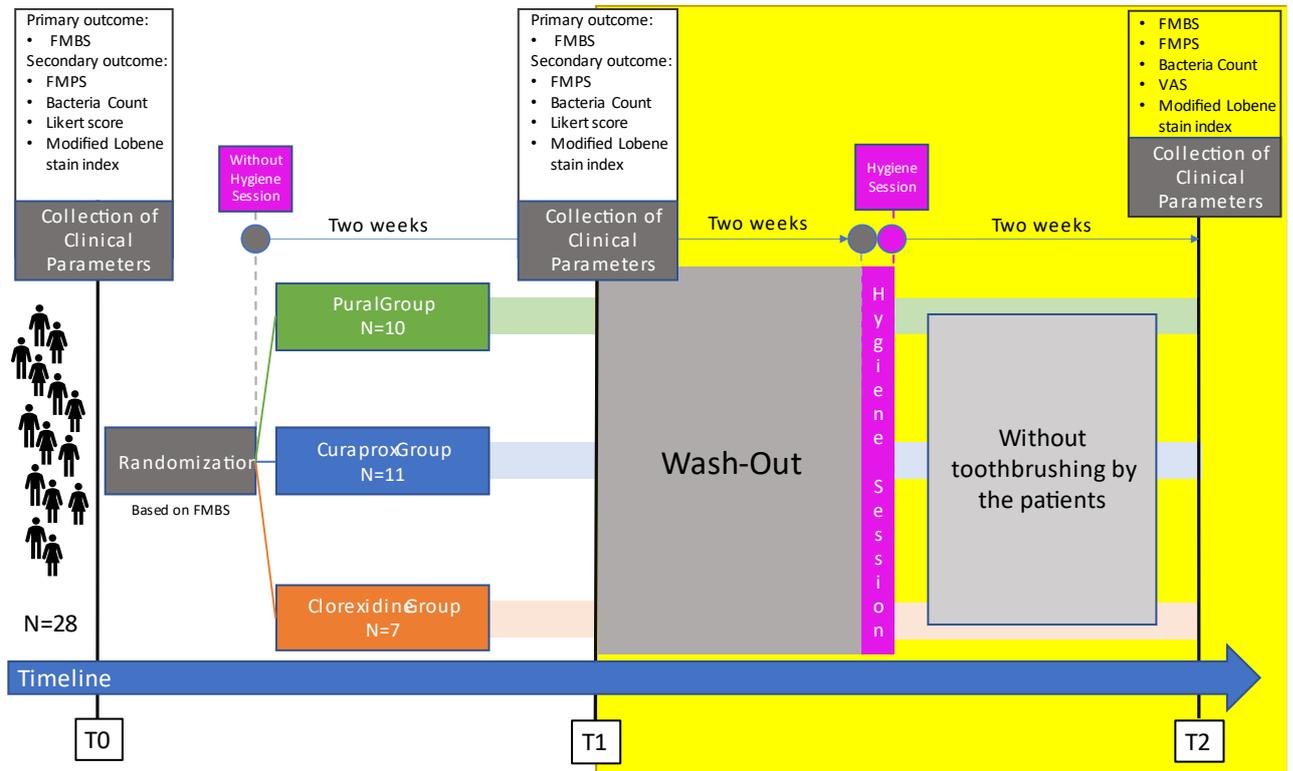


Fig. 3.0: Disegno schematico dello studio

I pazienti sono stati divisi nel seguente modo:

- Gruppo Pural (n=10);
- Gruppo Curaprox Perioplus Renegrate (n=11);
- Gruppo controllo, CHX 0,12% (n=7).

Lo studio è stato suddiviso in due fasi:

Nella prima fase, i partecipanti hanno dovuto assumere il collutorio assegnato per un periodo di 15 giorni due volte al giorno subito dopo la normale igiene domiciliare. Al baseline, t0, sono state fornite loro le informazioni scritte (cfr. allegato 1.0) dettagliate riguardo la tempistica e la posologia del collutorio ed una scheda di monitoraggio effetti che hanno consegnato alla seduta successiva.

Sia al t0 che al t1, sono stati raccolti i seguenti dati clinici:

- Full Mouth Bleeding Score (FMBS);
- Full Mouth Plaque Score (FMPS);
- Modified Lobene Stain Index (MLSI);

È stato, inoltre, eseguito un prelievo di placca subgengivale.

Al t1 è stato chiesto ai pazienti di esprimere un voto da 0 a 10 per l'apprezzamento del collutorio.

Per i successivi 15 giorni i pazienti hanno svolto l'igiene domiciliare con i soliti presidi ma senza collutorio.

Nella seconda fase, i pazienti, dopo esser stati sottoposti ad una seduta di igiene orale professionale, t₃, hanno sospeso qualsiasi manovra di igiene orale domiciliare meccanica, servendosi del solo collutorio. Al termine della sessione, t₂, sono stati valutati nuovamente tutti gli indici e raccolte le schede monitoraggio effetti e le valutazioni di apprezzamento.

8.2.4 Lo studio microbiologico

La conta microbiologica dei microorganismi aerobi ed anerobi è stata condotta presso il Dipartimento di Microbiologia dell'Università Politecnica delle Marche. Al t₀, t₁, t₃ e t₂ sono stati prelevati dei campioni di placca subgengivale con l'aiuto di una curette. Il materiale è stato poi immesso in sospensione in 10 ml di soluzione fisiologica. Sono state allestite delle colture solide in agar ed agar emoarricchito. I campioni sono stati incubati a 37° per 48 h da 5% a 15% di CO₂ di atmosfera. La conta è stata convertita in CFU/mL e i risultati numerici sono stati trasformati in una scala logaritmica base 10.

8.2.5 Esecuzione del Full Mouth Bleeding Score

È stata utilizzata una sonda CP UNC-15. È stato effettuato un sondaggio circonferenziale di tutti i denti, considerando per ognuno sei siti. La valutazione è stata dicotomica: positiva o negativa. È stato poi eseguito il calcolo in percentuale (O' Leary, 1967; Ainamo e Bay 1975).

8.2.6 Esecuzione del Full Mouth Plaque Score

È stato utilizzato un rilevatore di placca bitonale. Sono stati considerati sei siti per ogni dente. La valutazione è stata dicotomica: positiva o negativa. È stato poi eseguito il calcolo in percentuale (O' Leary, 1967; Ainamo e Bay 1975).

8.2.7 Il Modified Lobene Stain Index: applicazione ed uso nel nostro contesto

Il seguente indice tiene in considerazione il gruppo incisale superiore e inferiore. Nonché 1.1, 1.2, 2.1, 2.1, 3.1, 3.2, 4.1, 4.2. per ogni dente si è considerata la porzione cervicale, il corpo centrale, la porzione mesiale e la distale, sia a livello linguale che vestibolare. Sia per le zone vestibolari, che linguali è stata fatta la valutazione dell'intensità e dell'estensione delle colorazioni. (cfr. allegati 1.1, 1.2, 1.3)

È stata poi eseguita, ad ogni incontro, una media dei valori riportati per paziente. Poi è stata calcolata la differenza di questi valori nei vari timepoints.

8.3 ANALISI DEI DATI

Per quanto riguarda gli indici clinici di infiammazione e placca, i dati sono stati calcolati con Excel utilizzando la differenza di FMBS e FMPS iniziali e finali di ogni fase, che in questo caso nomineremo "T_f" e "T_i".

Se $T_f - T_i > 0$: i valori di T_f sono maggiori di T_i, per cui è avvenuto un peggioramento della condizione clinica.

Se $T_f - T_i < 0$: i valori di T_i sono maggiori di T_f, per cui è avvenuto un miglioramento della condizione clinica.

Per quanto riguarda la conta microbiologica, i dati sono stati calcolati con Excel utilizzando la media della differenza tra i diversi timepoints.

Per quanto riguarda il MLSI, i dati sono stati calcolati con Excel utilizzando la media della differenza tra i diversi timepoints.

Se $T_f - T_i > 0$: i valori di T_f sono maggiori di T_i, per cui l'estensione e l'intensità delle macchie estrinseche sono aumentate.

Se $T_f - T_i < 0$: i valori di T_i sono maggiori di T_f, per cui l'estensione e l'intensità delle macchie estrinseche sono diminuite.

Per la scala Vas, i dati sono stati calcolati con Excel usando la media dei valori tra i timepoints.

Inoltre, sempre con Excel, è stata realizzata una tabella che riporta gli effetti avversi registrati negli intervalli t1 e t2.

8.4 RISULTATI

8.4.1 Gli indici clinici

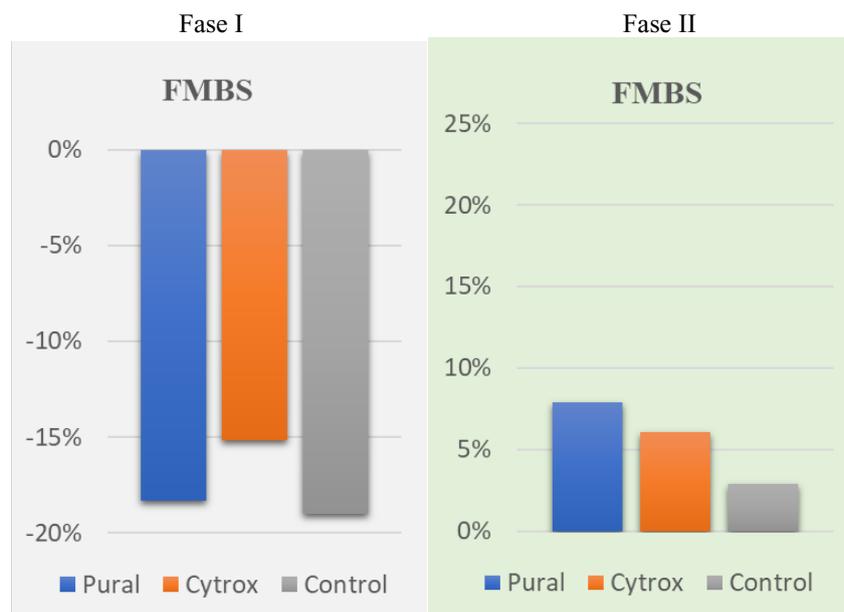


Fig. 3.1: La differenza del FMBS fra i collutori nelle due fasi

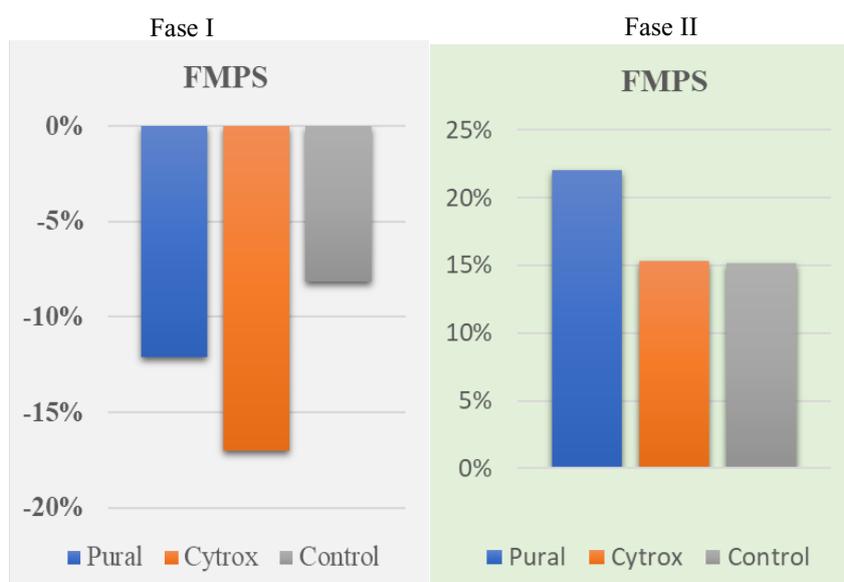


Fig. 3.2: La differenza del FMPS fra i collutori nelle due fasi

Nella fase I, il Controllo attivo e il Pural sembrano aver migliorato maggiormente i valori di FMBS. Il Curaprox con CITROX® sembra esser stato il migliore nella riduzione del FMPS.

Nella Fase II, a seguito dell'interruzione delle manovre di igiene orale meccanica, la situazione clinica peggiora in tutti i casi. Il Controllo attivo sembra mantenere livelli bassi di FMBS rispetto agli altri due colluttori. Il Curaprox e il Controllo attivo sembrano controllare meglio i livelli di FMPS rispetto al Pural.

8.4.2 La conta microbica

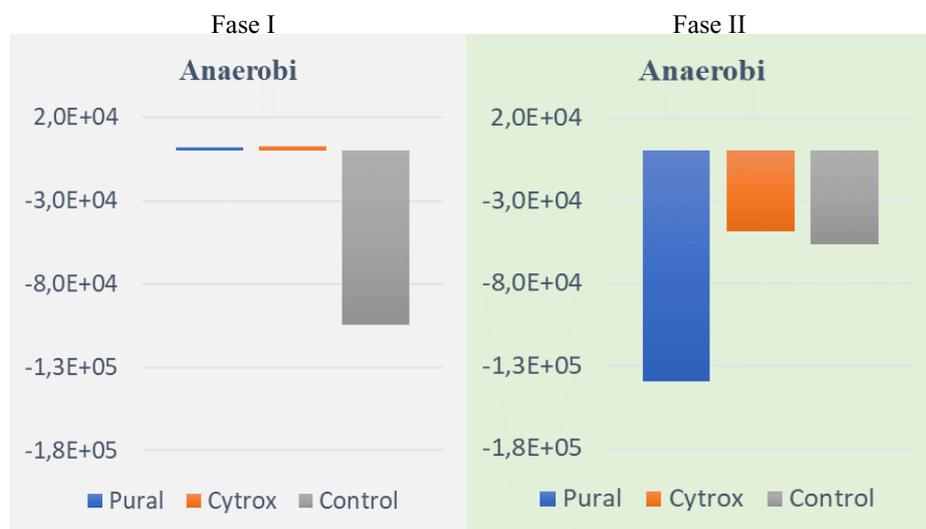


Fig. 3.3: L'andamento dei microorganismi anaerobi nelle due fasi

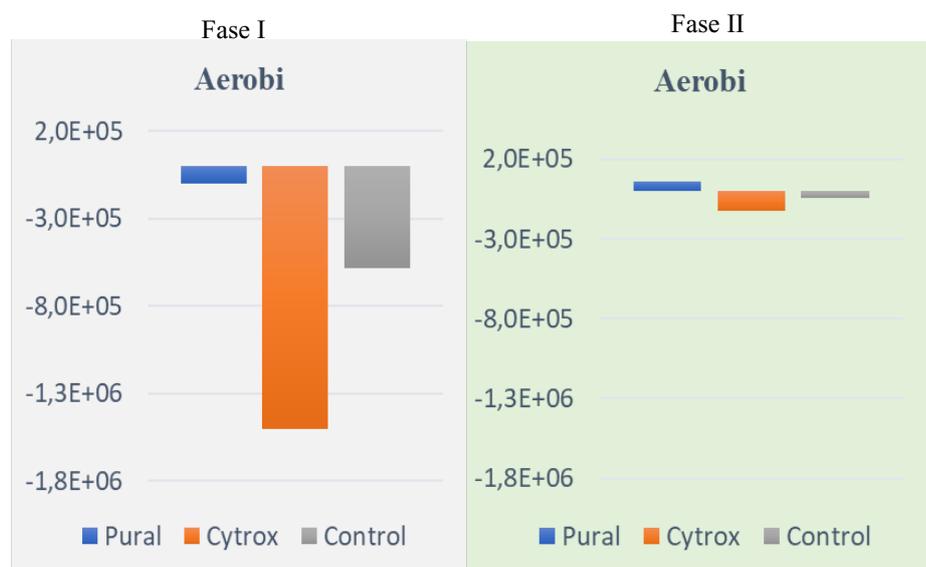


Fig. 3.4: L'andamento dei microorganismi aerobi nelle due fasi

Nella fase I, il Controllo attivo diminuisce notevolmente la conta degli anaerobi rispetto agli altri due gruppi. Il Curaprox diminuisce la conta degli aerobi.

Nella fase II, il Pural rispetto agli altri due gruppi, diminuisce di più gli anaerobi, ma aumenta il livello di aerobi, mentre gli altri due colluttori li diminuiscono.

8.4.3 Il Modified Lobene Stain Index (MLSI)

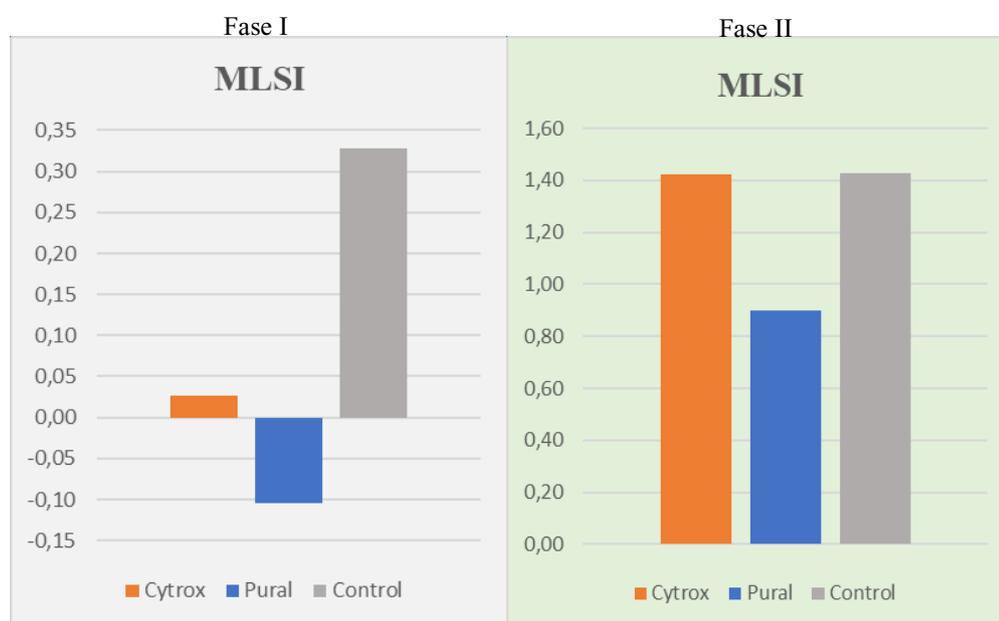


Fig. 3.5: I valori del MLSI nelle due fasi

Nella fase I, il Controllo attivo aumenta notevolmente il Modified Lobene Stain Index. Anche il Curaprox, seppur in misura minore contribuisce all'aumento dell'indice. Il Pural sembra invece diminuire il MLSI.

Nella fase II, c'è un peggioramento clinico della situazione in generale. Il Controllo attivo e il Curaprox sembrano aumentare quasi allo stesso modo il MLSI. Il Pural porta ad un aumento minore dell'indice rispetto agli altri due colluttori.

8.4.4 La scala VAS

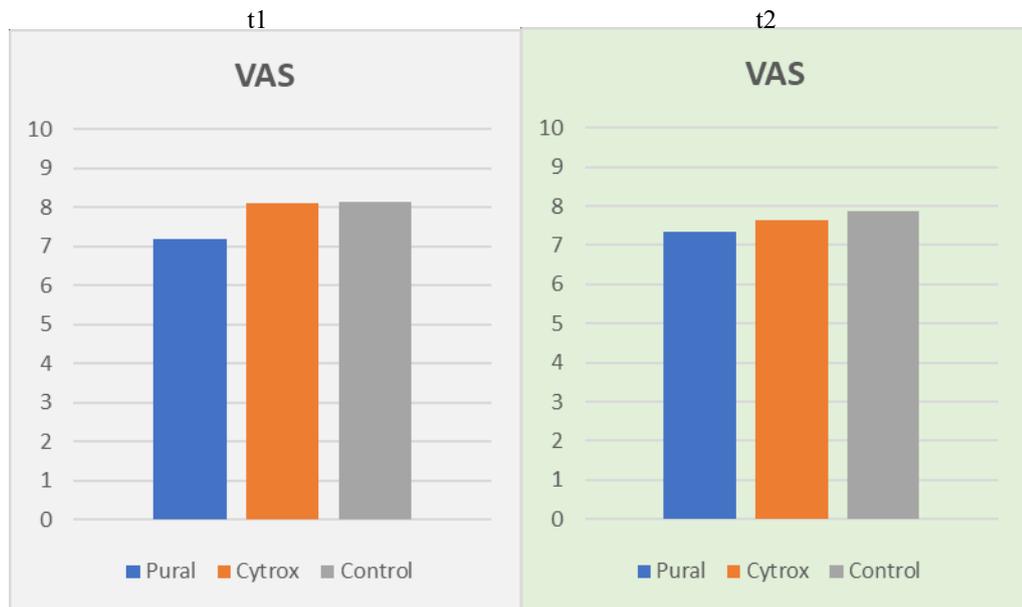


Fig. 3.6: I valori delle scale VAS nei due timepoints

Tutti i collutori sono stati ben apprezzati. Tuttavia, il controllo attivo e il Curaprox con CITROX® hanno registrato valutazioni maggiori, quasi similari, in ambo le fasi.

8.4.5 Gli effetti avversi

		Control		Cytos		Pural	
		t1	t2	t1	t2	t1	t2
Effetto collaterale	No	5	6	9	7	9	8
Bruciore gengive/guance/lingua	N/A						
	Poco	2	1	1	2		
	Abbastanza				1	1	1
	Molto						
Alitosi	No	5	6	8	9	7	9
	N/A						
	Poco	1	1	1		3	
	Abbastanza			1			
Sensibilità dentale	No	6	7	10	9	8	7
	N/A	1					
	Poco				1		2
	Abbastanza					2	
Nausea	No	6	7	10	9	8	8
	N/A	1				1	
	Poco				1	1	1
	Abbastanza						
Disegousia	No	6	7	6	6	9	9
	N/A	1				1	
	Poco			4	4		
	Abbastanza						
Xerostomia	No	5	6	7	8	9	9
	N/A	1				1	
	Poco	1	1	2	1		
	Abbastanza						
Lingua patinata/pigmentata	No	5	6	9	8	8	9
	N/A	1					
	Poco	1	1	1	2	1	
	Abbastanza					1	
	Molto						

Fig. 3.7: Tabella degli effetti avversi riportati nelle due fasi

In ambo le fasi, i pazienti sembrano non aver riportato effetti avversi in quantità e gravità rilevanti.

8.5 DISCUSSIONE

Dall'analisi dei risultati è emerso che, nella fase I, in cui il collutorio veniva usato unitamente alle normali ed usuali manovre meccaniche di igiene orale del paziente il Controllo attivo e il Pural hanno dimostrato un'efficacia nel ridurre il FMBS. Comunque, solo la clorexidina ha dimostrato una riduzione nella conta degli anaerobi. Questi ultimi, come mostrato in precedenza, sono i microrganismi più implicati nella malattia parodontale. Ciò, potrebbe, dunque, suggerire che la clorexidina risulti un valido aiuto

nel miglioramento della microflora del paziente parodontale. Inoltre, solo la clorexidina ha mostrato più degli altri un elevato MLSI, probabilmente dovuto alla sostantività della molecola (Thangavelu et al 2020; Brooks et al 2020). Essendo costituito da una molecola inodore (Brookes et al. 2020), il Controllo attivo è risultato il collutorio più apprezzato, mostrando un punteggio di gradimento leggermente più alto rispetto al Curaprox.

Il Curaprox con CITROX® è risultato il collutorio migliore nella riduzione del FMPS e dei microorganismi aerobi. Il CITROX® è un estratto della *Citrus aurantium* L. var. *amara* (CAVA), che contiene flavonoidi e alcaloidi, oli volatili, limonoidi e cumarine (Yu et al. 2020). In uno studio condotto da Hooper et al. nel 2011, CAVA è risultato avere un ampio spettro di attività contro i microorganismi orali ed efficacia nella regolazione della microflora orale. I microorganismi aerobi, infatti, seppur meno implicati nella malattia parodontale, essendo dei microorganismi pionieri, possono andare a modificare, attraverso la loro attività metabolica, l'ambiente orale favorendo la crescita di batteri anaerobi e parodontopatogeni (Lenartova et al. 2021). L'effetto antiplacca sembra, invece, esser dovuto alla presenza della combinazione polilisina (Panpisut et al. 2016), β -ciclodestrine (Carrouel et al. 2020) e dello xilitolo (Janakiram et al. 2017). Inoltre, in uno studio di Tsai et al. del 2016, il polifenolo estratto dagli agrumi si è rivelato un coadiuvante nel trattamento delle malattie parodontali e nella guarigione delle ferite orali, in quanto potrebbe aumentare la capacità migratoria dei fibroblasti.

Tuttavia, gli studi che correlano questa molecola all'odontoiatria, in letteratura, risultano ancora essere scarsi.

Nella fase II, in cui è avvenuta la sospensione delle manovre meccaniche di igiene orale, c'è stato un peggioramento generale della situazione clinica. Ciò a riprova dell'importanza della rimozione meccanica della placca nel trattamento dell'infiammazione gengivale. Tuttavia, ancora una volta il Controllo attivo si è dimostrato il migliore nella riduzione del FMBS. Inoltre, ha dimostrato la miglior capacità di riduzione di FMPS, pari al Curaprox con CITROX®. Entrambi questi collutori, essendo caratterizzati dalla presenza di clorexidina nelle rispettive concentrazioni di 0,12% e 0,09%, hanno portato ad un aumento simile del MLSI, rispetto al Pural. Il Curaprox con CITROX® ha riconfermato il primato nella riduzione dei microorganismi aerobi. Il Pural, invece, sebbene abbia portato ad un lieve aumento di microorganismi

aerobi, si è dimostrato il migliore nella riduzione degli anaerobi. Ciò, potrebbe esser la risultante dell'azione dei suoi costituenti. Nello studio del 2018 condotto da Abbasi et al., è stata confermata, infatti, l'azione della propoli contro *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella parvula*. Inoltre, nello studio di Cai e Wu del 1996, lo *Syzygium aromaticum* è risultato efficace verso i principali batteri parodontali Gram-negativi anaerobi. Questa significativa riduzione è sicuramente un fatto positivo: questo collutorio potrebbe garantire il buon mantenimento dell'omeostasi del microbiota orale, ovviando al problema della resistenza indotta dalla clorexidina. Si ricorda, però, che il microbiota è frutto di interazioni complesse (Popova et al. 2013) e che le evidenze scientifiche a riguardo sono insufficienti al fine di trarre conclusioni certe. Anche in questa fase il collutorio alla clorexidina è risultato il più apprezzato, subito seguito dal Curaprox e dal Pural.

C'è poi da aggiungere che, a causa dell'utilizzo nel breve termine e di una posologia giornaliera adeguata, per nessuno dei tre collutori sono stati registrati effetti collaterali significativi in entrambi i timepoints.

8.7 CONCLUSIONE

Nel seguente studio, l'uso di tutti e tre i collutori in aggiunta alle normali manovre di igiene orale meccanica, o utilizzati singolarmente, ha portato ad un miglioramento, seppur in percentuali diverse, della situazione clinica rispetto al baseline.

L'impiego della sola chimica, nonché dei soli collutori, senza le procedure di rimozione meccanica della placca, nel controllo degli indici di infiammazione gengivale, ad oggi risulta inefficace.

Tuttavia, in quanto ad infiammazione gengivale, la clorexidina si è rivelata ancora una volta il gold standard. Sebbene lo studio abbia dato dei risultati promettenti, risulta necessario aumentare la numerosità campionaria dei vari gruppi al fine di stabilire quanto possa esser significativa la differenza in termini di efficacia clinica tra i vari collutori.

Indagare l'efficacia dei colluttori in termini di composizione microbica orale risulta difficile, essendo il microbiota orale una variabile quantitativa e qualitativa interindividuale (Popova et al. 2013). Sarà necessario, quindi, condurre altri studi al fine di determinare alternative all'uso della clorexidina.

8.6 ALLEGATI

Nome del Gruppo	Trattamento	Brand	Dosaggio
Pural Group	Pural	Fitomedical snc	Un misurino (circa 10 ml) per 60 s due/die
Curaprox Group	Curaprox PerioPlus +CITROX®	Curaprox Italia S.r.l.	10 ml per 60 s due/die
Chlorhexidine Group	Dentosan 0.12%	Recordati S.p.A	10 ml per 60 s due/die

Allegato 1.0: Istruzioni all'uso dei collutori

I=intensità
0= nessuna macchia presente, colorazione naturale del dente
1= macchia chiara
2=macchia chiaramente visibile, dall'arancione al marrone
3= macchia scura, dal marrone intenso al nero

Allegato 1.1: Valori di intensità del MLS

E= estensione		
Codice	Superfici buccali/vestibolari	Superfici linguali/platali
1	Macchia limitata al gingival groove	Fino a 1/3 di area affetta
2	Macchia che si estende oltre il gingival groove, fino ad un 10% di area affetta	Tra 1/3 e 2/3 di area affetta
3	Macchia oltre il gingival groove, per più di un 10% di area affetta	Più di 2/3 di area affetta

Allegato 1.2: Valori di estensione del MLSI

		Vestibular zones		Lingual zones				Vestibular zones		Lingual zones	
		I	E	I	E			I	E	I	E
11	G					31	G				
	B						B				
	M						M				
	D						D				
12	G					32	G				
	B						B				
	M						M				
	D						D				
21	G					41	G				
	B						B				
	M						M				
	D						D				
22	G					42	G				
	B						B				
	M						M				
	D						D				

Allegato.1.3: Schema utilizzato per riportare i valori del MLSI

BIBLIOGRAFIA

Abbasi AJ, Mohammadi F, Bayat M, Gema SM, Ghadirian H, Seifi H, Bayat H, Bahrami N. Applications of Propolis in Dentistry: A Review. *Ethiop J Health Sci.* 2018;28(4):505-512.

Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J.* 1975;25(4):229-35.

Brex MC, Gautschi M, Gehr P, Lang NP. Variability of histologic criteria in clinically healthy human gingiva. *J Periodontal Res.* 1987;22(6):468-72.

Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent.* 2020; 103:103497.

Cai L, Wu CD. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *J Nat Prod.* 1996;59(10):987-90.

Carrouel F, Conte MP, Fisher J, Gonçalves LS, Dussart C, Llodra JC, Bourgeois D. COVID-19: A Recommendation to Examine the Effect of Mouthrinses with β -Cyclodextrin Combined with Citrox in Preventing Infection and Progression. *J Clin Med.* 2020;9(4):1126.

Dyke TEV. The Management of Inflammation in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology.* 2008;79(8S):1601–8.

Eick S, Goltz S, Nietzsche S, Jentsch H, Pfister W. Efficacy of chlorhexidine digluconate-containing formulations and other mouthrinses against periodontopathogenic microorganisms. *Quintessence Int.* 2011;42(8):687–700.

Escribano M, Figuero E, Martín C, Tobías A, Serrano J, Roldán S, et al. Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents: a systematic review and network meta-analyses

of the Turessky modification of the Quigley and Hein plaque index. *J Clin Periodontol*. 2016;43(12):1059–73.

Fahim A, Himratul-Aznita WH, Abdul-Rahman PS. Allium-sativum and bakuchiol combination: A natural alternative to Chlorhexidine for oral infections? *Pak J Med Sci*. 2020;36(2):271-275.

Ghorbani A, Esmailizadeh M. Pharmacological properties of Salvia officinalis and its components. *J Tradit Complement Med*. 2017;7(4):433-440.

Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc*. 2006;137(12):1649–57.

Gupta D, Gupta RK, Bhaskar DJ, Gupta V. Comparative evaluation of terminalia chebula extract mouthwash and chlorhexidine mouthwash on plaque and gingival inflammation - 4-week randomised control trial. *Oral Health Prev Dent*. 2015;13(1):5-12.

Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Clin Periodontol*. 2018;45(S20): S28-S43.

Hooper SJ, Lewis MA, Wilson MJ, Williams DW. Antimicrobial activity of Citrox bioflavonoid preparations against oral microorganisms. *Br Dent J*. 2011;210(1): E22.

Janakiram C, Deepan Kumar CV, Joseph J. Xylitol in preventing dental caries: A systematic review and meta-analyses. *J Nat Sci Biol Med*. 2017;8(1):16-21.

Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000*. 1997; 15:55-62.

Karayiannis A, Lang NP, Joss A, Nyman S. Bleeding on probing as it relates to probing pressure and gingival health in patients with a reduced but healthy periodontium. A clinical study. *J Clin Periodontol*. 1992;19(7):471-5.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1):1–14.

Lang N, Brex MC. Chlorhexidine digluconate—an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *Journal of Periodontal Research*. 1986;21(S16):74–89.

Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Periodontol*. 2018 ;89(S1): S9-S16.

Lang NP, Nyman S, Senn C, Joss A. Bleeding on probing as it relates to probing pressure and gingival health. *J Clin Periodontol*. 1991;18(4):257-61.

Lenartova M, Tesinska B, Janatova T, Hrebicek O, Mysak J, Janata J, Najmanova L. The Oral Microbiome in Periodontal Health. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11:629723.

Loe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand*. 1963; 21:533-551.

Loe H, Theilade E, Jensen SB. experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965; 36:177–87.

Marsh P.D. Role of the Oral Microflora in Health, *Microbial Ecology in Health and Disease*,2000; 12(3):130-137.

Murakami S, Mealey BL, Mariotti A, Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *J Periodontol*. 2018;89(S1): S17-S27.

Nayak N, Varghese J, Shetty S, Bhat V, Durgekar T, Lobo R, Nayak UY, U V. Evaluation of a mouthrinse containing guava leaf extract as part of comprehensive oral care regimen- a randomized placebo-controlled clinical trial. *BMC Complement Altern Med*. 2019;19(1):327.

O'Leary T. The periodontal screening examination. *J Periodontol*. 1967;38(6):617-24.

Page RC, Eke PI. Case Definitions for Use in Population-Based Surveillance of Periodontitis. *Journal of Periodontology*. 2007;78(S7):1387–99.

Panpisut P, Liaqat S, Zacharaki E, Xia W, Petridis H, Young AM. Dental Composites with Calcium / Strontium Phosphates and Polylysine. *PLoS One*. 2016;11(10): e0164653.

Popova C., Dosseva-Panova V., Panov V. Microbiology of Periodontal Diseases. A Review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2013; 27(3): 3754-3759.

Pretzl B, Sälzer S, Ehmke B, Schlagenhauf U, Dannewitz B, Dommisch H, et al. Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy—a consensus report. *Clin Oral Invest*. 2019;23(7):3073–85.

Sälzer S, Slot DE, Weijden FAV der, Dörfer CE. Efficacy of inter-dental mechanical plaque control in managing gingivitis – a meta-review. *Journal of Clinical Periodontology*. 2015;42(S16): S92–105.

Tatakis DN, Kumar PS. Etiology and Pathogenesis of Periodontal Diseases. *Dental Clinics*. 2005;49(3):491–516.

Teughels W, Dekeyser C, Van Essche M, Quirynen M. One-stage, full-mouth disinfection: fiction or reality? *Periodontol 2000*. 2009; 50:39-51.

Thangavelu A, Kaspar SS, Kathirvelu RP, Srinivasan B, Srinivasan S, Sundram R. Chlorhexidine: An Elixir for Periodontics. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020;12(S1): S57-S59.

Tonetti MS, Chapple ILC, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*. 2015;42(S16): S1–4.

Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 2018;89(S1): S159-S172.

Trombelli L, Farina R, Minenna L, Carrieri A, Scapoli C, Tatakis DN. Experimental gingivitis: reproducibility of plaque accumulation and gingival inflammation parameters in selected populations during a repeat trial. *J Clin Periodontol.* 2008;35(11):955-60.

Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018;89(S1): S46-S73.

Trombelli L, Scapoli C, Orlandini E, Tosi M, Bottega S, Tatakis DN. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. III. Response of "high responders" and "low responders" to therapy. *J Clin Periodontol.* 2004;31(4):253-9.

Tsai HC, Li YC, Young TH, Chen MH. Citrus polyphenol for oral wound healing in oral ulcers and periodontal diseases. *J Formos Med Assoc.* 2016;115(2):100-7.

Van der Weijden FA, Van der Sluijs E, Ciancio SG, Slot DE. Can Chemical Mouthwash Agents Achieve Plaque/Gingivitis Control? *Dent Clin North Am.* 2015;59(4):799-829.

Yu L, Chen M, Liu J, Huang X, He W, Qing Z, Zeng J. Systematic Detection and Identification of Bioactive Ingredients from *Citrus aurantium* L. var. *amara* Using HPLC-Q-TOF-MS Combined with a Screening Method. *Molecules.* 2020;25(2):357.