



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in IGIENE DENTALE
Presidente: Prof. A. Putignano

Probiotici e salute orale: stato dell'arte

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Scilla Sparabombe

Tesi di Laurea di:
Alessia Mazzoni

Anno Accademico 2019-2020

*I batteri non costruiscono città
e non hanno una vita sociale molto interessante;
ma quando il Sole esploderà, saranno ancora qui.
Questo è il loro pianeta,
e noi lo abitiamo solo perché loro ce lo consentono.
Bill Bryson*

INDICE

1. IL MICROBIOTA ORALE E INTESTINALE	6
1.1. Cenni storici	10
1.2. Funzioni	12
1.3. Analisi	14
1.4. Disbiosi	14
1.5. Disbiosi orale	18
1.5.1. HOMD.....	20
2. DISBIOSI E PATOLOGIE ORALI	22
2.1. Parodontite	22
2.1.1 Eziopatogenesi.....	22
2.1.2 Diagnosi e Classificazione.....	36
2.1.3 Prevenzione.....	41
2.1.4 Terapia.....	47
2.2 Candidosi	51
2.2.1 Struttura antigenica e tossine	51
2.2.2 Patogenesi	51
2.2.3 Manifestazioni cliniche	52
2.2.4 Epidemiologia e diagnosi	53
2.2.5 Terapia.....	55
2.3 La carie.....	59
2.3.1 Epidemiologia	60
2.3.2 Patogenesi	62
2.3.3 Classificazione della carie	66
2.3.4 Diagnosi.....	72
2.3.5 Terapia.....	75
2.3.6 Prevenzione.....	75
3. SALUTE ORALE: APPLICAZIONE DEI PROBIOTICI	78
3.1. Definizione.....	78
3.2. Meccanismi d'azione	81
3.3. Probiotici: prevenzione e terapia in patologie orali	84
3.3.1. Probiotici e Parodontite	85
3.3.2. Probiotici e Candidosi	89
3.3.3. Probiotici e Carie	94
4. CONCLUSIONI.....	101
5. BIBLIOGRAFIA	103

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni è emersa chiaramente l'associazione tra disbiosi microbica e patologie sistemiche. La bocca è la porta dell'intestino. La sua ecologia microbica rappresenta un possibile marker se non un fattore di rischio per la malattia. I recenti progressi nella diagnostica dei biomarcatori salivari e nelle analisi del microbiota orale hanno ampliato la scoperta di patogeni microbici associati a malattie orali e sistemiche (per esempio carie dentale, malattia parodontale, malattie autoimmuni, diabete e tumori). Sebbene sia stata prestata maggiore attenzione all'associazione tra microbiota intestinale e salute generale, il microbiota orale ha mostrato la sua rilevanza e possibilità di essere surrogato del microbiota intestinale, che potrebbe fornire un potere diagnostico equivalente con una migliore gestione. Il microbiota intestinale influenza direttamente la salute in tantissimi modi ma una sua analisi risulta essere complessa, costosa e con un'elevata preparazione da parte del professionista mentre un'analisi del microbiota orale, mediante l'utilizzo di biomarcatori salivari, risulta essere un esame meno invasivo e più accettabile da parte del paziente nonché di più facile esecuzione per il professionista. In sintesi, il futuro utilizzo del microbioma orale per far progredire la salute umana dipenderà da un'ulteriore convalida dei biomarcatori microbici specifici della malattia e dalla loro incorporazione in programmi diagnostici e preventivi sensibili e specifici, rapidi nella consegna dei risultati e convenienti per un'ampia

implementazione. Con il complementare di genomica umana, proteomica, trascrittomica, metabolomica, il microbioma orale dei bambini può essere al centro della futura medicina di precisione e medicina personalizzata. ¹

Un valido sostegno a mantenere l'equilibrio microbico nell'organismo, la cui disbiosi è elemento predisponente l'insorgenza di molteplici patologie, è dato dalla somministrazione di probiotici.

Recenti studi hanno evidenziato l'efficacia dei probiotici nel trattamento di patologie del cavo orale come carie, gengiviti, parodontiti e candidosi; l'obiettivo principale dei probiotici è quello di sostituirsi alle specie patogene prevalenti e ristabilire l'equilibrio della flora microbica orale.

L'obiettivo di questa tesi è di fornire una descrizione quanto più accurata di ciò che la ricerca scientifica ad oggi ha fornito sull'utilizzo dei probiotici in ambito odontoiatrico, della loro azione e del loro possibile utilizzo futuro.

1. IL MICROBIOTA ORALE E INTESTINALE

Il termine “microbiota” si riferisce a tutti gli organismi viventi che colonizzano uno specifico habitat corporeo in un determinato periodo.

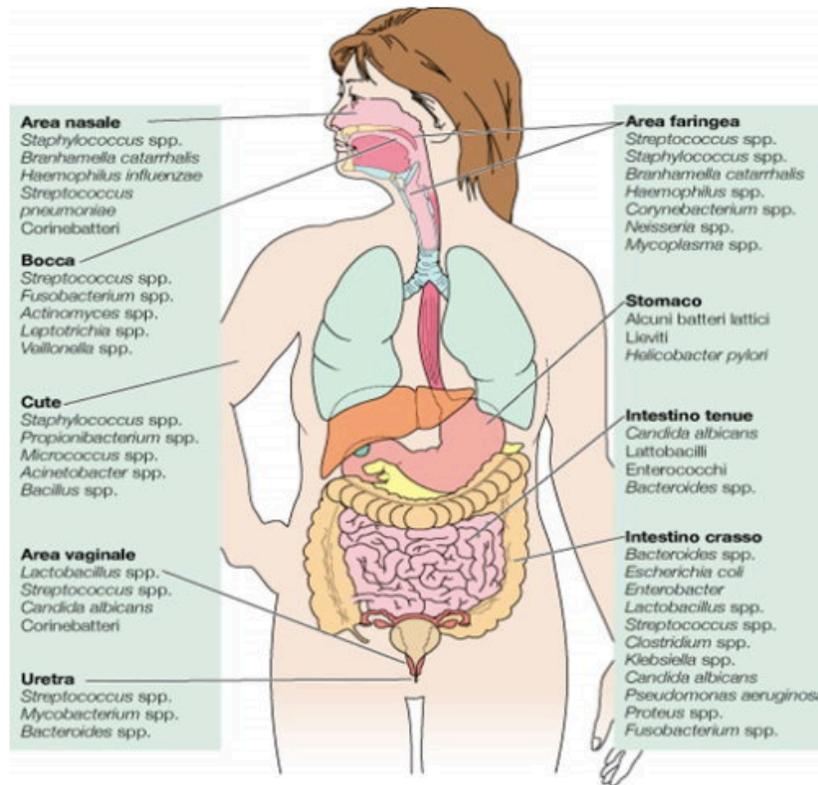
Le popolazioni microbiche residenti negli animali svolgono una serie di azioni utili che risultano evidenti negli animali germ-free come, già nel 1897, Pasteur aveva intuito dal momento che, per meglio studiare la patogenicità di *Pasteurella multocida*, cercò di allevare, senza successo, polli privi di germi o “germ-free”. Gli animali germ-free non sono normali anatomicamente e fisiologicamente, presentano infatti un tessuto linfatico poco sviluppato, la parete intestinale sottile e priva di motilità, l’intestino cieco ingrossato, scarsi livelli anticorpali, basso rendimento cardiaco, necessità di grandi quantità di vitamina K e del complesso B. La flora microbica svolge funzioni che l’ospite ha imparato ad utilizzare in un lungo processo di adattamento selettivo per il quale la componente microbica è diventata *fisiologica o normale*.²

Il microbiota è un ecosistema complesso di microrganismi costituito da batteri, virus, protozoi e funghi, che vivono in diversi distretti del corpo umano, come il tubo gastroenterico, la pelle, la bocca, il sistema respiratorio e la vagina. Il microbiota, di cui i batteri costituiscono il gruppo tassonomico predominante, pesa circa 1,5 chilogrammi e si ritiene che sia composto da oltre 100 trilioni di

microrganismi, un numero che supera di dieci volte quello delle cellule ospiti.³

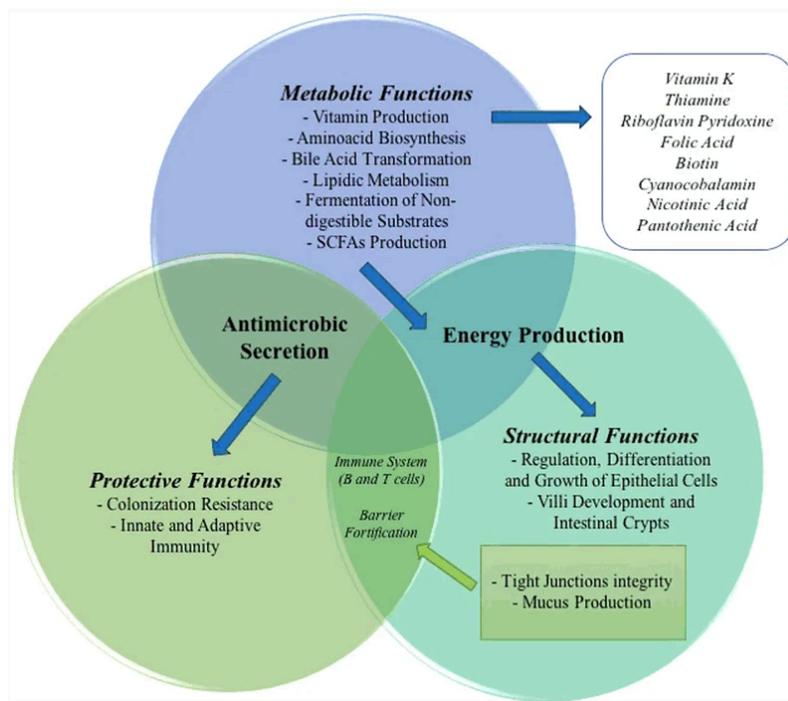
Il neonato nasce sterile perché è stato protetto dagli annessi fetali durante la gravidanza, ma, sin dal momento della nascita, la superficie cutanea e le mucose della cavità in contatto con l'esterno sono esposte all'ambiente e subiscono una progressiva colonizzazione da parte di batteri, alcuni miceti lievitriformi e pochi protozoi che andranno a costituire la flora commensale. Lo sviluppo del microbiota avviene quindi immediatamente dopo la nascita e la sua composizione originale è fortemente influenzata da fattori genetici e ambientali, dal tipo di nascita, naturale o cesareo, nonché dall'alimentazione della prima infanzia, naturale o artificiale.⁴

Ha una specifica localizzazione tissutale, cioè determinate specie sono sempre presenti in certe aree e mai in altre, mostrando un *tropismo* per il tessuto dove l'ospite rende disponibile un particolare nutriente o fattore di crescita e dove sono presenti recettori per componenti superficiali del microrganismo.



Ogni singolo microrganismo che compone il microbiota ha un preciso background genetico, e a questo proposito il termine "microbioma", coniato per la prima volta da Joshua Lederberg, si riferisce alle informazioni genetiche (genoma) del microbiota nel suo insieme. Il microbioma conta un numero di geni che è 250-800 volte superiore a quello umano e produce diverse sostanze importanti che il nostro corpo non sarebbe altrimenti in grado di produrre. Il microbiota infatti può fornire i nutrienti essenziali, sintetizzare la vitamina K e molte altre vitamine, principalmente quelle appartenenti al complesso B, contribuire alla digestione della cellulosa, favorire l'angiogenesi e le funzioni del nervo enterico. Si ritiene che il microbiota sia responsabile di oltre il 98% dell'attività genetica dell'organismo, come se fosse un "secondo genoma" per il corpo umano. Pertanto, si è anche ipotizzato che il microbiota possa

rappresentare un sistema endocrino aggiuntivo per l'essere umano, in quanto può produrre una ricchezza di sostanze necessarie per l'attività e il corretto funzionamento di organi e sistemi. Inoltre, la flora batterica intestinale svolge un ruolo essenziale nella protezione della salute dell'ospite, poiché ricopre funzioni metaboliche, strutturali e protettive. ⁵ L'analisi molecolare ha dimostrato che i batteri commensali modulano l'espressione dei geni coinvolti in diverse importanti funzioni intestinali ed extra intestinali, tra cui il metabolismo xenobiotico, la maturazione intestinale postnatale, l'assorbimento dei nutrienti e il rafforzamento della barriera mucosa.



Inoltre, il microbiota intestinale ha un forte impatto sul metabolismo dei farmaci con conseguenti effetti sulla farmacocinetica dei farmaci.

1.1. Cenni storici

Le prime descrizioni del microbiota umano risalgono al 1670-1680, quando Antoine van Leeuwenhoek iniziò a utilizzare i suoi microscopi artigianali di nuova concezione. In una lettera scritta alla Royal Society di Londra nel 1683, descrisse e illustrò cinque diversi tipi di batteri (sebbene all'epoca li chiamasse “animaletti”) presenti nella sua bocca e in quella di altri, e successivamente confrontò anche i suoi batteri orali e fecali, constatando che ci sono differenze tra i siti del corpo così come tra salute e malattia.

Avanzando di un paio di secoli, nel 1853, Joseph Leidy pubblicò un libro intitolato “A Flora and Fauna within Living Animals”, che alcuni considerano l'origine della ricerca sul microbiota. Successivamente, il lavoro di Pasteur, Metchnikoff, Koch, Escherich, Kendall e pochi altri, ha gettato le basi per la comprensione delle interazioni ospite-microrganismo.

Metchnikoff riteneva che la composizione del microbiota e le sue interazioni con l'ospite fossero essenziali per la salute; ed Escherich era convinto che la comprensione della flora endogena fosse essenziale per comprendere la fisiologia della digestione e la patologia e terapia delle malattie intestinali. ⁷

Nel 1890 Koch pubblicò i suoi famosi postulati, quattro criteri progettati per stabilire una relazione causale tra un microrganismo e una malattia, e durante la prima metà del XX secolo la microbiologia si concentrò maggiormente sull'identificazione di agenti eziologici della malattia. Ciò era probabilmente anche dovuto al fatto che la

maggior parte dei patogeni batterici può crescere in presenza di ossigeno, mentre la maggior parte dei membri del microbiota intestinale non può e quindi non poteva essere studiata in quel dato periodo storico.

Nonostante queste prime intuizioni, il campo è decollato sul serio solo una volta scoperti i metodi per la coltura di organismi anaerobici negli anni Quaranta e Cinquanta, quando i membri del microbiota venivano coltivati e studiati in laboratorio.

I primi studi in vivo effettuati confrontando animali privi di germi e animali colonizzati, negli anni '60, hanno portato a osservazioni che hanno predetto molto di ciò che è stato scoperto da allora utilizzando metodologie che consentono analisi più approfondite. Nonostante i progressi nella coltivazione di microrganismi, divenne presto evidente che c'erano grosse discrepanze tra il numero di cellule esistenti e quante potevano crescere in laboratorio. Questa osservazione chiave ha motivato lo sviluppo di approcci basati sul sequenziamento per identificare i microrganismi non coltivabili, che sono stati sperimentati da Woese, Pace, Fox e altri per studiare i microrganismi ambientali e successivamente adattati all'analisi delle comunità associate all'uomo, fornendo una visione senza precedenti della loro composizione. Un passo fondamentale nella divulgazione della ricerca sul microbiota, ciò che è entrato nelle notizie principali e lo ha reso un concetto familiare, è stata la scoperta del gruppo Gordon, nel 2006, che la ricostituzione dei topi con le comunità microbiche associate a uno stato di malattia umano potrebbe

trapiantare il fenotipo agli animali. Ciò ha aperto la porta alla ricerca che cerca di stabilire relazioni causali tra comunità microbiche alterate e malattie, che sono diventate una pietra angolare del campo.

8

1.2. Funzioni

Il microbiota intestinale conferisce caratteristiche extrafunzionali che svolgono un ruolo critico nei processi biologici, favorendo una vasta gamma di funzioni dell'ospite tra cui:

- sviluppo e regolazione del sistema immunitario;
- proliferazione e differenziazione delle cellule intestinali;
- protezione contro i patogeni;
- omeostasi energetica e metabolica;
- sintesi di nutrienti e vitamine.^{9 10 11 12 13}

I batteri intestinali contribuiscono allo sviluppo e alla regolazione del sistema immunitario ospite, così come il sistema immunitario influisce sulla composizione del microbioma intestinale. In particolare, il sistema immunitario ospite garantisce una composizione di microbiota benefica in grado di controllare la crescita eccessiva di batteri specifici, ma anche di reagire a batteri patogeni o molecole interagenti con la barriera intestinale.

L'omeostasi intestinale viene raggiunta e mantenuta quando il sistema immunitario stabilisce un adeguato equilibrio fra tolleranza ai batteri commensali (non dannosi), mutualistici (benefici) e opportunistici (patogeni) (Barko et al., 2018; Hiippala et al., 2018; La Fata et al., 2018; Rizzetto et al. 2018¹⁴). Questo equilibrio si

consolida solo quando il sistema immunitario è in grado di comunicare con il microbiota intestinale. Il riconoscimento microbico coinvolge due principali tipologie di recettori appartenenti al sistema PRR (*Pattern Recognition Receptors*): i recettori Toll-like (TLR) e i recettori NOD-like (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*). Questi sono ampiamente espressi nelle e sulle cellule dendritiche nell'intestino. ¹⁵

Agiscono riconoscendo schemi molecolari, detti "pattern molecolari associati a microbi" (MAMP), su agenti patogeni e commensali. Una volta che un microbo è stato riconosciuto, interiorizzato o ha invaso lo strato epiteliale, inizia una risposta immunologica appropriata a esso. I microbi, infatti, possono esercitare effetti sia patogeni sia protettivi a seconda della specifica segnalazione microbica attraverso PRR e MAMP e della successiva risposta immunitaria. Gli effetti protettivi sono mediati dalla sottoregolazione delle citochine proinfiammatorie (IL-8, IL-12, IL-23) e dalla sovraregolazione delle citochine antinfiammatorie come l'IL-10, propagando la tolleranza sistemica e locale (Barko et al., 2018; de Oliveira et al., 2017 ¹⁶).

Oltre a questi effetti, gli organismi commensali riducono anche la migrazione dei fagociti – che trasferiscono antigeni microbici ai tessuti linfoidi locali e promuovono l'attivazione delle cellule B e T – e stimolano la differenziazione delle cellule a calice favorendo la produzione dello strato protettivo di muco. ¹⁷ Al contrario, i batteri patogeni causano la secrezione di citochine proinfiammatorie con la susseguente attivazione delle cellule B e T.

1.3. Analisi

Le attuali tecniche necessarie per l'analisi del microbiota sono specifiche, complesse e costose. Richiedono operatori con un buon livello di esperienza, strumentazioni appropriate e specialisti del settore per l'interpretazione dei risultati.

La composizione del microbiota può essere studiata attraverso diverse metodologie, distinguendo tra:

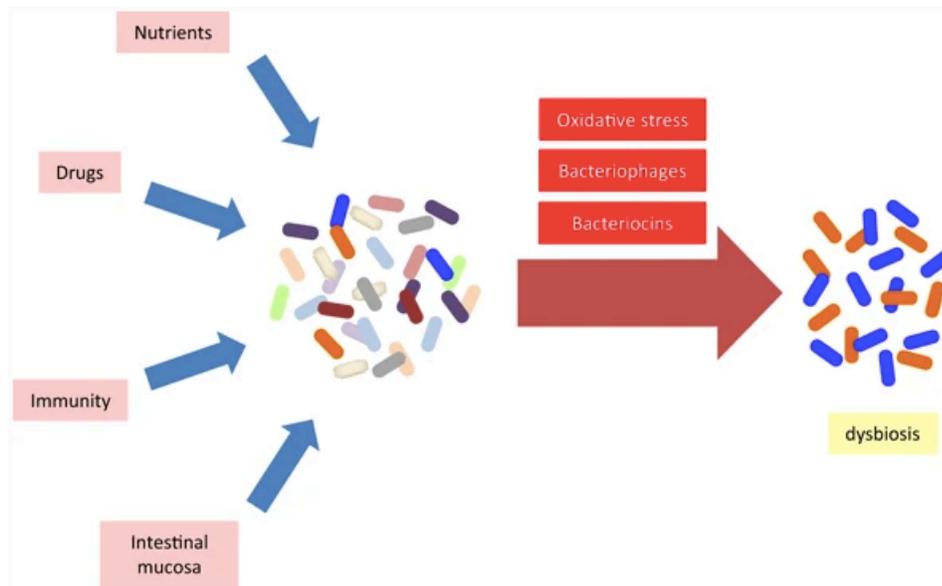
metodi coltura-dipendenti: approccio comunemente usato nei laboratori clinici per isolare, propagare e valutare i microrganismi per caratteristiche morfologiche, fabbisogno di nutrienti, suscettibilità agli antibiotici e produzione/consumo di metaboliti clinici. Tale metodologia consente una quantificazione ragionevolmente accurata degli organismi coltivabili; tuttavia, la maggior parte dei microbi associati all'intestino umano non può essere coltivata secondo i protocolli standard dei laboratori clinici;

metodi coltura-indipendenti: le nuove tecnologie di sequenziamento genico hanno permesso la rapida crescita della ricerca in questo settore e aperto la strada all'approccio metagenomico, che analizza direttamente il genoma microbico totale contenuto in un campione consentendone l'identificazione tassonomica.¹⁸

1.4. Disbiosi

Quando il microbiota produce effetti dannosi per la salute dell'ospite si parla di "disbiosi". Il dismicrobismo è un'alterazione quantitativa e/o qualitativa della composizione della flora batterica.

Nell'immagine che segue si possono osservare dei fattori predisponenti la disbiosi.



I trilioni di microbi che colonizzano il tratto gastrointestinale influenzano processi locali e sistemici come la trasformazione dei nutrienti, l'apporto di vitamine, la maturazione dell'immunità della mucosa, la comunicazione intestino-cervello e persino la progressione del tumore. Come altri organi, il corretto funzionamento del microbiota intestinale si basa su una composizione cellulare stabile, che nel caso del microbiota umano è costituito principalmente da batteri dei phyla *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e, in misura minore, *Proteobacteria* ¹⁹. Grandi cambiamenti nel rapporto tra questi phyla o l'espansione di nuovi gruppi batterici portano a uno squilibrio che funge da innesco di malattie. Un numero crescente di malattie è associato alla disbiosi intestinale, che in alcuni casi contribuisce allo sviluppo o alla gravità della malattia. La disbiosi è un segno distintivo delle malattie infiammatorie intestinali (IBD) come la colite ulcerosa e il morbo di

Crohn, ma anche disturbi metabolici, malattie autoimmuni e disturbi neurologici. La disbiosi può scatenare la malattia nelle prime settimane di vita come osservato nell'enterocolite necrotizzante, durante l'età adulta attraverso la promozione del cancro del colon-retto, o negli anziani come esemplificato dalla diarrea associata a *Clostridium difficile*.

A differenza dei microbi infettivi, la patogenicità di specifici batteri intestinali non può essere stabilita attraverso l'applicazione dei postulati di Koch, dato che una parte importante del microbiota non può essere isolata come coltura pura. Pertanto, l'implicazione patogena di microbi specifici in una malattia si basa principalmente sull'identificazione di popolazioni batteriche spostate sulla base del sequenziamento del DNA ad alto rendimento di geni rRNA 16S conservati ²⁰. La replicazione di una malattia attraverso il trapianto del microbiota intestinale da un animale malato a uno sano viene spesso utilizzata in una seconda fase per confermare il contributo della disbiosi intestinale alla malattia. Il trapianto di microbiota ha dimostrato il contributo dei microbi intestinali, tra gli altri, all'obesità ²¹ e all'aterosclerosi ²² nei topi. Una maggiore liberazione dei nutrienti può favorire la crescita parallela di batteri innocui e nocivi. Inoltre, il confine tra il bene e il male è spesso sfocato dato che alcuni batteri simbiotici possono diventare patogeni quando sono presenti in numero maggiore nell'intestino. Tali batteri, denominati patobionti ²³, possono essere difficili da riconoscere quando la loro espansione avviene simultaneamente ad altri cambiamenti nella composizione

microbica intestinale. Al di là dell'attribuzione della colpa per associazione, la scoperta dei meccanismi alla base dei cambiamenti dei gruppi microbici è strumentale per comprendere i processi che portano alla disbiosi. Di conseguenza, l'identificazione dei fattori che causano forti cambiamenti nel microbiota intestinale è fondamentale per elaborare strategie volte a prevenire la disbiosi intestinale.

Mentre una comunità intestinale disbiotica è un segno distintivo di diverse malattie infiammatorie, la disbiosi a sua volta innesca anche meccanismi che squilibrano l'omeostasi intestinale e causano infiammazione. La traslocazione dei batteri attraverso l'epitelio intestinale aumenta nella disbiosi. Un numero elevato di batteri invasori provocano una sovraespressione di citochine pro-infiammatorie che danneggiano l'epitelio intestinale e portano a infiammazione intestinale cronica. L'infiammazione cronica è associata a diversi disturbi metabolici come il diabete autoimmune. Un microbiota disturbato influisce anche sulla maturazione del sistema immunitario innato poiché i batteri intestinali di per sé sono una forza trainante in quel processo. Senza microbiota, la funzione dei neutrofili è compromessa, mostrando una ridotta uccisione di agenti patogeni e una ridotta secrezione di interferoni di tipo I (IFN- γ) e IL-15. Già lo sviluppo delle cellule mieloidi nel midollo osseo è ritardato in assenza di microbiota. Questo ritardo ostacola la clearance di infezioni sistemiche e aumenta la suscettibilità alle allergie. I disturbi nella comunità microbica possono avere un effetto dannoso simile. I topi trattati con antibiotici durante le prime fasi

dello sviluppo hanno una maggiore produzione di IL-4 e un numero inferiore di cellule Treg, e più tardi nella vita, sono più suscettibili alla colite e all'iper-reattività delle vie aeree ²⁴. Le alterazioni persistenti causate dal trattamento antibiotico nelle prime fasi della vita umana sono correlate con IBD, asma e dermatite atopica in età avanzata. Lo stato di omeostasi non infiammatoria nell'intestino può essere scosso sia dal sistema immunitario dell'ospite che dal microbiota intestinale.

Il microbiota intestinale è una componente intrinseca della fisiologia animale che reagisce ai cambiamenti interni e ambientali, mentre svolge ruoli importanti nella regolazione di molteplici funzioni dell'ospite. Il contributo della disbiosi alle malattie è indiscusso. Il recente sviluppo di tecniche di sequenziamento ad alto rendimento legate alla creazione di database affidabili di sequenze di 16S rRNA microbici ha prodotto un'esplosione di rapporti che documentano l'importanza del microbiota intestinale nella regolazione della salute e della malattia. L'apprezzamento completo dell'ecologia intestinale consentirà un migliore controllo della disbiosi intestinale e quindi porterà a un significativo miglioramento della salute in una vasta gamma di condizioni infiammatorie e metaboliche che affliggono la nostra società moderna. ²⁵

1.5. Disbiosi orale

Il microbiota orale è altamente diversificato, costituito da oltre 700 microrganismi, inclusi batteri, funghi e virus. Man mano che la nostra comprensione della relazione tra il microbiota orale e la salute umana

si è evoluta, abbiamo identificato una vasta gamma di malattie orali e sistemiche associate a questa comunità microbica, incluse ma non limitate a carie, malattie parodontali, cancro orale, cancro del colon-retto, cancro del pancreas e sindrome infiammatoria intestinale. La potenziale relazione predittiva tra il microbiota e questo suggerisce che la cavità orale è un sito ideale per la diagnosi di malattia. La cavità orale è facilmente accessibile con una raccolta non invasiva di campioni biologici. Possiamo immaginare un futuro in cui gli strumenti diagnostici salivari della prima infanzia verranno utilizzati per prevedere e prevenire malattie future attraverso l'analisi e la formazione del microbioma orale del bambino. Microrganismi orali patogeni come *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, sono stati trovati in placche ateromatose umane in vari siti, con implicita associazione con malattie vascolari. I recenti progressi nella diagnostica dei biomarcatori salivari e nelle analisi del microbioma orale hanno ampliato la scoperta di patogeni microbici associati a malattie orali e sistemiche (ad esempio: carie dentale, malattia parodontale, malattie autoimmuni, diabete e tumori). Sebbene sia stata prestata maggiore attenzione all'associazione tra microbiota intestinale e salute generale, il microbiota orale ha mostrato la sua rilevanza e possibilità di essere surrogato del microbiota intestinale, che potrebbe fornire un potere diagnostico equivalente con una migliore manipolazione. Rispetto al campionamento del microbioma intestinale, il campionamento orale è psicologicamente più

accettabile e più facilmente accessibile dai pazienti, così come di più semplice esecuzione da parte del professionista sanitario. Il futuro utilizzo del microbioma orale per far progredire la salute umana dipenderà da un'ulteriore convalida dei biomarcatori microbici specifici della malattia e dalla loro incorporazione in programmi diagnostici e preventivi sensibili e specifici, rapidi nella consegna dei risultati ed economici per un'ampia implementazione. Con il complementare di genomica umana, proteomica, trascrittomica, metabolomica, il microbioma orale dei bambini potrebbe essere al centro della futura medicina di precisione e della medicina personalizzata. ¹

1.5.1. HOMD

Il database espanso del microbioma orale umano (eHOMD) che è stato aggiornato l'ultima volta il 22 novembre 2017, contiene le informazioni di circa 772 specie procariotiche, di cui il 70% è coltivabile e il 30% appartiene alla classe dei microrganismi incoltivabili. Sul 70% delle specie coltivabili, il 57% è già stato assegnato ai loro nomi. Il profilo 16S rDNA della cavità orale sana ha classificato i batteri residenti in sei ampi phyla, vale a dire: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e *Spirochaetes* costituendo il 96% dei batteri orali totali. Questi micro-abitanti orali nascosti mostrano un'influenza diretta sulla salute umana, dal metabolismo dell'ospite alle risposte immunitarie. Una microflora orale alterata è stata osservata in diverse malattie come diabete, batteriemia, endocardite, cancro,

malattie autoimmuni e nascite pretermine. Pertanto, diventa cruciale comprendere la diversità microbica orale e come fluttua in condizioni malate / perturbate. I progressi nella metagenomica e nelle tecniche di sequenziamento di nuova generazione generano sequenze rapide e forniscono ampie informazioni sui microrganismi residenti in una nicchia. Pertanto, le informazioni recuperate possono essere utilizzate per lo sviluppo di biomarcatori basati sul microbioma per il loro utilizzo nella diagnosi precoce delle malattie orali e associate.

26

2. DISBIOSI E PATOLOGIE ORALI

2.1. Parodontite

La parodontite è una malattia infiammatoria cronica ad eziologia multifattoriale associata a disbiosi microbica e caratterizzata dalla progressiva distruzione dell'apparato di supporto del dente. Le sue caratteristiche principali includono la perdita del supporto del tessuto parodontale, manifestata attraverso la perdita di attacco clinico (CAL) e la perdita di osso alveolare valutata radiograficamente, la presenza di tasche parodontali e sanguinamento gengivale. La parodontite è un grave problema di salute pubblica a causa della sua elevata prevalenza, nonché perché può portare alla perdita dei denti e alla disabilità, influire negativamente sulla funzione masticatoria e sull'estetica, essere fonte di disuguaglianza sociale e compromettere la qualità della vita. La parodontite rappresenta una percentuale sostanziale di edentulia e disfunzione masticatoria, si traduce in costi significativi per le cure odontoiatriche e ha un plausibile impatto negativo sulla salute generale.²⁷

2.1.1 Eziopatogenesi

Le malattie parodontali sono la manifestazione patologica della risposta dell'ospite contro il biofilm presente nell'interfaccia dente / gengiva.

La gengivite indotta dalla placca è una risposta infiammatoria cronica all'accumulo di biofilm sopragengivale.

La parodontite è una malattia infiammatoria cronica che deriva da una complessa infezione polimicrobica, che porta alla distruzione dei tessuti come conseguenza della perturbazione dell'omeostasi tra il microbiota subgingivale e le difese dell'ospite in individui sensibili. Si può ritenere che questa malattia causata da batteri differisca da una definizione accettata di infezione, ovvero un'invasione e moltiplicazione di microrganismi patogeni in una parte del corpo o in un tessuto che può produrre lesioni tissutali successive e far progredire la malattia attraverso una varietà di meccanismi cellulari o tossici. ²⁸

La patogenesi della parodontite umana è stata posta su una base razionale per la prima volta da Page e Schroeder nel 1976. Sebbene molti dettagli manchino ancora, sta ora emergendo un quadro molto più completo e convincente della patogenesi. In effetti, è possibile avvicinarsi alla patogenesi non solo dal punto di vista cellulare, come è stato fatto nel 1976, ma estendere la storia a livello molecolare e in una certa misura a livello genetico. Gli esperti concordano sul fatto che la parodontite umana si instaura e si mantiene partendo da un piccolo gruppo di batteri prevalentemente gram-negativi, anaerobi o microaerofili che colonizzano l'area sottogingivale. In effetti, al World Workshop on Clinical Periodontics del 1996, il gruppo di lavoro pertinente (2) ha concluso che la maggior parte della parodontite umana è causata da *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Durante gli anni '70 e '80 furono compiuti grandi passi avanti nel

chiarire la natura infettiva della parodontite umana; negli anni '90 ci siamo resi conto che, sebbene i batteri siano essenziali, non sono sufficienti per la malattia. Fattori dell'ospite come l'ereditarietà, il fumo di tabacco e vari altri fattori di rischio possono persino superare i batteri come determinanti del verificarsi della malattia e della gravità del risultato clinico.

Queste osservazioni hanno portato a grandi cambiamenti nelle idee e nei concetti su patogenesi, prevenzione e trattamento.

Negli ultimi due decenni, sono state ottenute nuove informazioni sostanziali su come questi batteri causino la formazione di tasche parodontali, la conversione dell'epitelio giunzionale in epitelio tascabile e la distruzione dell'osso alveolare e dei tessuti connettivi della gengiva e del legamento parodontale. I batteri per lo più causano indirettamente la distruzione dei tessuti osservata, e lo fanno attivando vari componenti dei sistemi di difesa dell'ospite in modo tale che ne consegue la distruzione. È enigmatico che gli stessi sistemi che forniscono protezione e difesa all'organismo siano i medesimi responsabili della distruzione tissutale. La capacità di guarigione e rigenerazione dei mammiferi, tuttavia, è talmente grande che la distruzione è generalmente superata e può verificarsi il recupero e il ritorno allo stato normale. La parodontite umana è un esempio di una condizione in cui spesso ciò non si verifica e la distruzione dei tessuti che si manifesta dinamicamente come una malattia continua o ricorrente si perpetua al punto che può verificarsi la formazione di ascessi e la perdita di denti come risultato finale.

I motivi per cui la progressione della parodontite non viene più comunemente arrestata sono descritti ampiamente dalla ricerca che negli ultimi anni ha visto fondersi alcuni concetti coerenti con la severa manifestazione di tale patologia. Questi concetti suggeriscono che la malattia può essere più distruttiva se aspetti specifici dei meccanismi di difesa dell'ospite all'interno del tessuto locale sono più esuberanti.

Ciò sembra accadere, almeno in parte, a causa di fattori iperreattivi dell'ospite, sia intrinseci (genetici) che indotti (come può essere il fumo), o per una maggiore disbiosi batterica all'interno dei tessuti come risultato di meccanismi di controllo batterico compromessi a livello del solco gengivale. Gran parte della nuova prospettiva sulla patogenesi della parodontite coinvolge i meccanismi molecolari e cellulari dettagliati che coinvolgono la regolazione:

Dell'intensità e del bilanciamento della risposta dell'ospite all'interno dei tessuti;

Della qualità dell'attività dei neutrofili e degli anticorpi che raggiunge il solco gengivale.

Antigeni e vari altri fattori di virulenza, e in alcuni casi l'invasione batterica, costituiscono il cambiamento microbico e l'ospite risponde con una risposta infiammatoria e immunitaria immediata che influenza il cambiamento. La risposta dell'ospite si traduce nella produzione di citochine, eicosanoidi, altri mediatori dell'infiammazione come le chinine, i prodotti di attivazione del complemento e le metalloproteinasi della matrice, che perpetuano la

risposta e mediano il tessuto connettivo e la distruzione ossea.

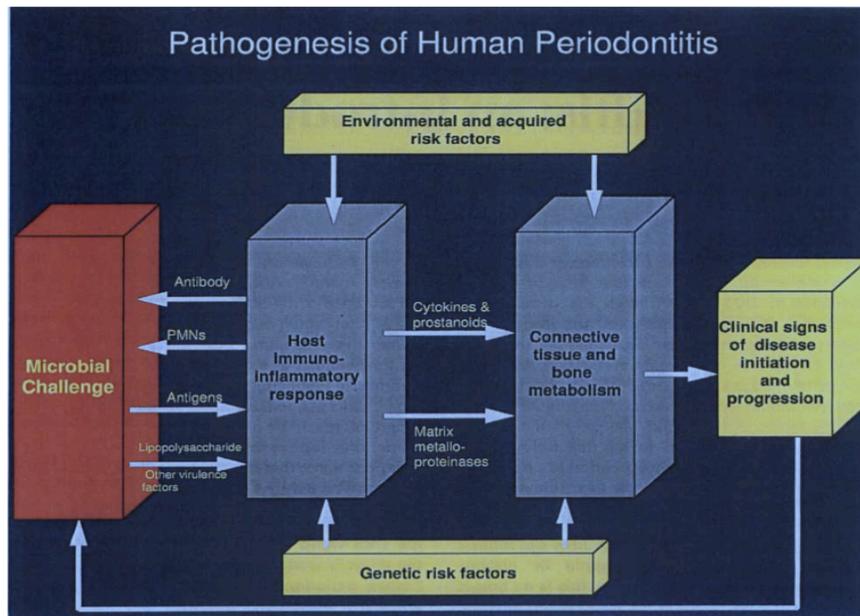


Fig. 1. The pathogenesis of human periodontitis. PMNs: polymorphonuclear lymphocytes

Tutti questi eventi sono influenzati da modificatori della malattia, sia genetici che ambientali o acquisiti. Il quadro clinico osservato è il risultato della somma di questi eventi, come rappresentato in Fig. 1. La gravità e la velocità di progressione della malattia influenzano la natura e l'aumento della disbiosi microbica, ad esempio influenzando il pH e la disponibilità di ossigeno e di vari nutrienti nella tasca parodontale.²⁹

Quindi diversamente dalla gengivite, la parodontite è una condizione che si verifica mediante l'interazione tra i meccanismi di difesa dell'ospite con i complessi batterici contenuti nel biofilm e, in associazione a fattori ambientali o di suscettibilità innata del soggetto, comporta una progressiva ed irreversibile perdita del tessuto connettivo, dell'osso e ad una migrazione locale dell'epitelio giunzionale con sviluppo di parodontite.

Analizzando campioni di placca sottogengivale prelevati dalla superficie mesiale di ciascun dente in 185 soggetti (età media 51 ± 16 anni) con ($n = 160$) o senza ($n = 25$) parodontite, Socransky et al. hanno individuato la presenza e i livelli di 40 taxa sottogengivali in 13.261 campioni di placca utilizzando sonde di DNA genomico intero e ibridazione DNA-DNA a scacchiera. Il complesso uno era costituito da: *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*; strettamente correlato alle misurazioni cliniche della malattia parodontale, in particolare alla profondità delle tasche e al sanguinamento al sondaggio.³⁰

Anche *A. actinomycetemcomitans* è stato altamente riscontrato sia nella popolazione sana sia in quella malata. Questo microrganismo è presente in almeno il 10% dei bambini sani parodontalmente con dentatura primaria. Un'autorevole pubblicazione ha rilevato tassi di portatori del 20% per i giovani normali, del 36% per gli adulti normali, del 50% per i pazienti adulti con parodontite e del 90% per i giovani pazienti con parodontite. I primi studi non sono riusciti a coltivare la specie da neonati edentuli, ma studi molecolari utilizzando la PCR su campioni di saliva non stimolata hanno messo in dubbio questa associazione: 37 dei 59 neonati completamente edentuli erano positivi per *A. actinomycetemcomitans*, raggiungendo il 100% a 12 mesi di età. La trasmissione verticale è comune. Può verificarsi la trasmissione orizzontale di *A. actinomycetemcomitans* e sono stati stimati tassi di trasmissione tra il 14% e il 60% tra i coniugi. Tuttavia, i membri della maggior parte

delle famiglie con parodontite aggressiva (classificata così secondo il precedente sistema di classificazione di Armitage) ospitano anche altri tipi clonali di *A. actinomycetemcomitans*.

Una volta colonizzato, *A. actinomycetemcomitans* rimane rilevabile nei pazienti con parodontite. Indipendentemente dal trattamento parodontale, la colonizzazione da parte dello stesso ceppo è notevolmente stabile nei soggetti per periodi da 5 a 12 anni. La stabilità genomica durante le infezioni orali persistenti è stata dimostrata dal sequenziamento del genoma di ceppi coltivati dallo stesso individuo 10 anni dopo.

L'habitat naturale di *A. actinomycetemcomitans* è la cavità orale, ma può essere isolato da una varietà di malattie infettive orali e non, tra cui artrite, batteriemia, endocardite, osteomielite, infezioni della pelle, infezioni del tratto urinario e vari tipi di ascessi. La caratterizzazione di 52 ceppi non orali ha mostrato somiglianza con i ceppi orali e la porta d'ingresso per le infezioni sistemiche è solitamente la cavità orale. La complessità del microbiota parodontale e la varietà dei sintomi clinici hanno ritardato l'identificazione di specifici agenti eziologici microbici. Nel 1996, *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* sono stati ufficialmente designati come agenti eziologici della parodontite. *A. actinomycetemcomitans* è stato preso di mira sulla base di studi di prevalenza in salute e malattia, livelli sierici di anticorpi e presenza di determinanti di virulenza. Più di recente, l'attenzione è stata rivolta alla complessa interazione tra altri batteri

coltivabili e altri batteri non coltivabili nel microbiota orale, nonché all'interazione con l'ospite. In effetti, è stato suggerito che *A. actinomycetemcomitans* conduce la propria attività nascondendosi dal controllo del sistema immunitario dell'ospite, o addirittura essendo un attivista della comunità che sopprime le risposte dell'ospite per consentire la crescita eccessiva dei suoi collaboratori. *A. actinomycetemcomitans* fa parte del microbiota umano. Può essere coltivato da un terzo degli adulti sani, mentre i metodi basati sulla PCR suggeriscono una presenza più onnipresente. Il carattere tenace e aggregativo del batterio è determinante per la notevole stabilità del genotipo negli ospiti colonizzati e per la progressione verso infezioni persistenti. Le fessure gengivali cronicamente infiammate possono innescare l'ingresso ripetuto e intermittente nel flusso sanguigno. La sua partecipazione al processo patologico della parodontite è al di là di ogni ragionevole dubbio; le caratteristiche di adesione e leucotossiche sono ben descritte, ma l'interazione con altri membri del microbiota orale è più difficile da chiarire, così come la posizione intercambiabile di suscitare la risposta degli anticorpi e di "rimanere sotto il radar".³¹

Nonostante queste osservazioni, è stato mostrato che esiste un alto grado di variabilità riguardo la presenza e/o l'assenza di questi microrganismi nel tempo, così che appare che tali microrganismi siano più diffusi nella popolazione di quanto precedentemente pensato. Inoltre, è ora riconosciuto che molte persone presentano il microrganismo senza manifestare una progressione della patologia

(Cullinan et al. 2003). In questo contesto, è chiaro che molte persone sono in equilibrio con i loro *biofilm* per la maggior parte del tempo ed è solo quando questo equilibrio viene disturbato che la patologia si può esprimere. Questi disequilibri possono accadere come la conseguenza di influenze ambientali che possono condurre a un incremento opportunistico del numero di organismi, a una depressione dei meccanismi di difesa dell'organismo o a entrambe le situazioni.³² Esistono diversi fattori di modificazione della salute parodontale; il diabete e il fumo di sigaretta sono stati recentemente inseriti nella nuova classificazione della malattia parodontale proprio per la loro forte implicazione in tale patologia.

La malattia parodontale e il diabete mellito sono strettamente correlate e sono malattie croniche molto diffuse con molte somiglianze nella patobiologia. Le condizioni antecedenti correlate, tra cui l'obesità e la resistenza all'insulina, possono svolgere un ruolo importante in questa relazione. L'infiammazione è un attore critico dell'associazione e la sua importanza sta venendo alla luce solo ora. Il diabete aumenta chiaramente il rischio di malattie parodontali e i meccanismi biologicamente plausibili sono stati dimostrati in abbondanza. Meno chiaro è l'impatto delle malattie parodontali sul controllo glicemico del diabete e sui meccanismi attraverso i quali ciò avviene. È possibile che le malattie parodontali possano fungere da iniziatori o propagatori della resistenza all'insulina in un modo simile all'obesità, aggravando così il controllo glicemico.³³

Il fumo è un altro elemento fortemente implicato nella malattia parodontale e per questo motivo recentemente inserito all'interno della nuova classificazione: i fumatori hanno da due a otto volte maggior probabilità di avere la parodontite rispetto ai non fumatori e anche il fallimento di impianti è doppio nei fumatori rispetto ai non fumatori.

Il fumo in combinazione con altri fattori di rischio aumenta ulteriormente il rischio di distruzione parodontale. È stato condotto uno studio nella popolazione della contea di Erie, soggetti con diabete avevano circa il doppio delle probabilità di presentare una perdita di attacco parodontale rispetto ai non diabetici. Diabetici, forti fumatori di età compresa tra 45 anni o anziani che ospitavano alcuni agenti patogeni parodontali aveva un odds ratio di 30 volte per la perdita di attacco rispetto a una persona priva di questi fattori di rischio. In un altro studio, i fumatori diabetici insulino-dipendenti avevano un rischio relativo di perdita di attacco 4,4 volte maggiore di quello dei soggetti diabetici non fumatori. Scarso controllo del diabete nei fumatori ha aumentato questo rischio di 12,3 volte. In sintesi, è emerso che la combinazione dei due fattori di rischio è sinergico per la perdita di attacco. L'interazione tra fumo e fattori genetici può essere importante nella patogenesi della malattia parodontale nei fumatori. È stato notato inoltre un effetto sinergico tra polimorfismo genetico dell'interleuchina-1 e fumo. Collettivamente, questi studi suggeriscono che il fumo interagisce e combina gli effetti di varie condizioni sistemiche, con conseguente

maggiore gravità della malattia. In sintesi, il fumo come fattore di rischio per la parodontite è forte. Come recensito da Gelskey, il fumo soddisfa la maggior parte dei criteri di causalità proposto da Hill (Table1).

Table 1. Evidence for smoking as an etiological factor in periodontitis (93)	
Criterion*	Evidence
Strength of association	Cross sectional and case-control studies demonstrate a moderate to strong association between smoking and periodontitis (20, 22, 35, 60, 67, 68, 122, 193, 201, 204, 205).
Consistency	Multiple studies of various designs (cross-sectional, case-control and longitudinal) and in various populations have shown an association between smoking and periodontal attachment loss (24, 93, 101, 170, 171).
Specificity	Disease progression slows in patients who quit smoking compared to those who continue to smoke (26, 90, 201, 204).
Temporality	Longitudinal studies show that smokers do not respond as well to periodontal therapy (82, 107).
Biological gradient	There is a dose-response effect in that heavy smokers have increased disease severity compared to light smokers (22, 35, 60, 67, 68, 122, 193, 201).
Biological plausibility	The biological plausibility of the explanation of the relationship between smoking and periodontitis is supported by tobacco's adverse impact on microbial and host response parameters (17, 144, 174).
Analogy	Periodontal effects of smoking are analogous to other adverse smoking-related general health effects (212).
Experiment	Evidence not currently available.

*Based on Sir Bradford Hill's criteria for causation (86) as reviewed by Gelskey (59). This table is copyrighted and reproduced with permission from the American Academy of Periodontology.

Questo è basato su coerenza e forza di associazione tra il fumo e la gravità della malattia parodontale dimostrata da più studi trasversali e longitudinali. Ulteriori prove sono fornite dall'effetto della dose del fumo sulla gravità della malattia parodontale e un rallentamento della progressione della malattia nei pazienti che smettono di fumare.³⁴

Anche lo stress psicologico è stato dimostrato partecipare alla progressione della parodontite. Grazie ai progressi nel campo della biologia e il rapido sviluppo della psiconeuroimmunologia è stato dimostrato che lo stress psicologico partecipa direttamente alla patogenesi dei processi infettivi, inducendo alterazioni nella difesa dell'ospite e/o nella virulenza microbica. Lo stress agisce mediante tre principali vie: attivazione del CNS (tossicità dell'ossigeno sul SNC); attivazione dei sistemi biologici diretti e comportamentali

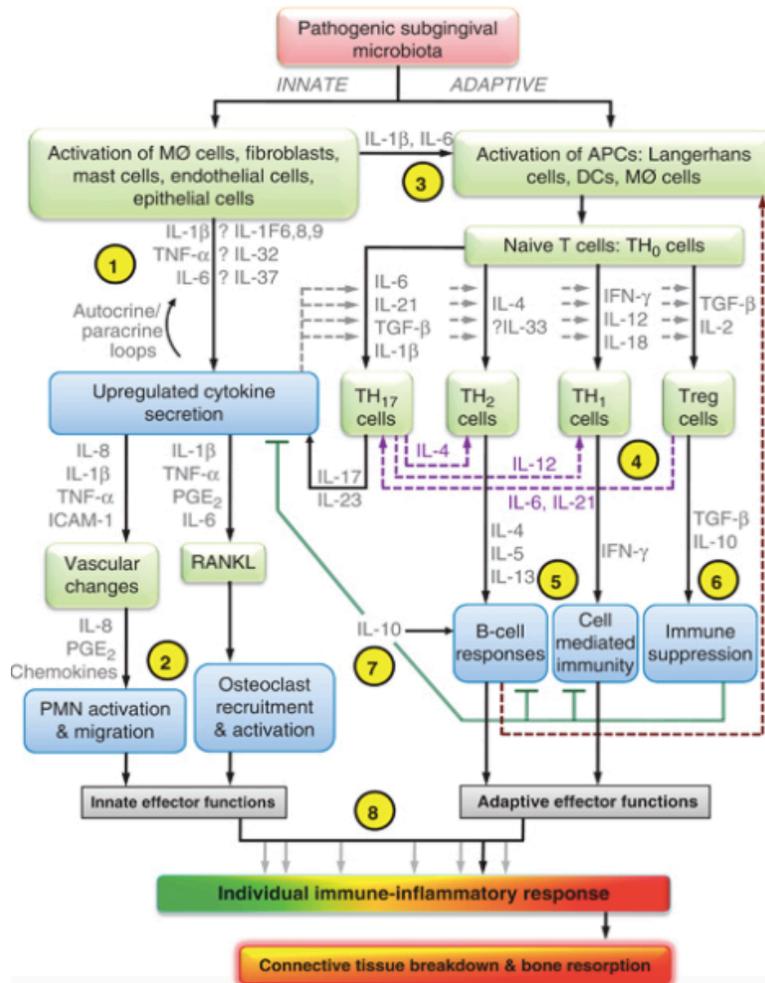
indiretti e alterazione dell'immunocompetenza o delle barriere anatomico-funzionali dell'ospite o nella virulenza microbica.³⁵

Da un punto di vista anatomico all'interno del parodonto vi è una percentuale costante di PMN (neutrofilo polimorfonucleato), necessaria a mantenere uno stato di salute parodontale. I PMN migrano dalla circolazione sanguigna e diventano evidenti nel fluido orale.³⁶ Sebbene il ruolo dei PMN sia protettivo, i PMN possono rilasciare un'ampia varietà di fattori che danneggeranno i tessuti dell'ospite, comprese le specie reattive dell'ossigeno, le collagenasi e altre proteasi. Chiaramente il numero di PMN nell'infiltrato infiammatorio suggerirebbe che hanno importanza nella distruzione dei tessuti. Sebbene i dati provenienti da esperimenti in vitro e su animali supportino un ruolo importante dei PMN nella distruzione dei tessuti, è difficile determinare la rilevanza di ogni singolo tipo di cellula per la storia naturale della malattia. L'attività anti-apoptotica (per via mitocondriale e citoplasmatica) nei PMN può incoraggiare la persistenza dei PMN e contribuire ulteriormente al danno del tessuto parodontale. Ulteriori prove a sostegno di questa ipotesi provengono da esperimenti su molecole che guidano la risoluzione dell'infiammazione limitando l'attività del PMN e promuovendo l'apoptosi. I PMN, in comune con altre cellule nell'infiltrato, esprimono molecole comprese le citochine e l'attivatore del recettore dell' $\text{NF}\kappa\text{B}$ ligando (RANKL) implicati nel riassorbimento osseo.

Esistono prove in vitro che i componenti del biofilm orale, tra cui *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leucotossina (che può

uccidere i PMN), proteasi e altre molecole di derivazione microbica come LPS e prodotti di scarto, possono modificare le funzioni PMN come la migrazione o l'apoptosi.³⁷ Le reti di citochine coinvolte nella parodontite non sono completamente comprese.

La conoscenza attuale è schematicamente riassunta nella Figura che segue.



Sono presenti numerose citochine che giocano un ruolo chiave nella fisiopatologia della parodontite. La prova più forte del funzionamento delle citochine nelle reti esiste per l'interleuchina-1 β , il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α), IL - 6 e RANKL. Dati più recenti evidenziano un ruolo pro - infiammatorio per IL - 10 nella

parodontite, oltre alla sua funzione antinfiammatoria. Nella Fig. sono state incluse speculativamente nuove citochine come IL-32, -33, -37, che non sono ancora state esplorate nella fisiopatologia della parodontite, ma necessitano di un'ulteriore caratterizzazione all'interno del processo patologico. È probabile che le reti di citochine controllino lo sviluppo e la plasticità delle cellule T nelle lesioni parodontali (Ford et al. 2010). Le variazioni in queste reti possono avere un impatto importante sul fenotipo delle cellule T e sull'espressione della malattia (Fig.), e quindi giustificare ulteriori indagini. L'attività delle citochine sovraregolate porta a cambiamenti vascolari, attivazione e migrazione di PMN e, in definitiva, osteoclastogenesi e attivazione degli osteoclasti. Le citochine prodotte nelle risposte innate contribuiscono all'attivazione degli APC. Questi presentano antigeni specifici per l'ingenuo CD4+Cellule T (cellule Th0), che si differenziano in cellule T effettrici CD4+ (ad es. Th1, Th2, Th17, cellule Treg) in base all'ambiente delle citochine locali. Le cellule Th1 e Th2 hanno un fenotipo relativamente stabile, ma altri sottoinsiemi di cellule T possono mostrare plasticità funzionale sotto l'influenza di diversi ambienti di citochine. Diversi sottogruppi di cellule T sono associati a vari profili di secrezione di citochine che regolano diversi aspetti delle risposte immunitarie e contribuiscono all'attività delle citochine sovraregolate. Le cellule Treg secernono TGF- β e IL-10 che hanno funzioni immunosoppressive. Ad esempio, IL - 10 sopprime le risposte Th1 e Th2, sopprime la funzione M ϕ e DC e riduce la

produzione di citochine in varie cellule (cellule Th1, cellule Th2, PMN, cellule NK). IL - 10 funge da mediatore normativo, ma può anche esibire altre attività come l'attivazione dei linfociti B. I diversi aspetti della biologia di IL - 10 (immunosoppressivo versus immunostimolante) probabilmente dipendono dall'ambiente locale delle citochine. La somma totale delle funzioni effettive innate e adattive si traduce in una risposta immuno-infiammatoria, la cui natura precisa varierà da persona a persona (come indicato dalle molteplici frecce grigie, con alcuni pazienti più suscettibili alla malattia di altri) e nel tempo all'interno di un individuo. In questo caso, la freccia nera indica un individuo che ha una risposta pro-infiammatoria che porta alla rottura del tessuto connettivo e al riassorbimento osseo.³⁸

2.1.2 Diagnosi e Classificazione

La diagnosi è il riconoscimento della presenza di una malattia. La diagnosi clinica della malattia parodontale è fatta dal riconoscimento di vari segni e sintomi nei tessuti parodontali che annunciano un allontanamento dalla salute. La diagnosi della malattia parodontale richiede una conoscenza approfondita di ciò che costituisce la salute parodontale. Sono sorti nel tempo sistemi di classificazione delle malattie per consentire ai medici di sviluppare una struttura che può essere utilizzata per identificare le malattie in relazione all'eziologia, alla patogenesi e al trattamento. I sistemi di classificazione della malattia parodontale più comunemente accettati sono stati quelli proposti dell'American Academy of Periodontology (AAP).

Nonostante gli intensi sforzi di ricerca per sviluppare nuove tecnologie per migliorare la capacità diagnostica, le procedure diagnostiche tradizionali basate sui segni clinici di infiammazione, profondità di sondaggio e perdita di attacco clinico costituiscono ancora la base su cui viene fatta la diagnosi parodontale. La diagnosi di malattia parodontale può essere supportata da evidenze radiografiche. La diagnosi della malattia implica anche la classificazione; i sistemi di classificazione sono in continua evoluzione.³⁹

Nel 2017 è stato sviluppato un nuovo quadro di classificazione per la parodontite. Negli ultimi 30 anni, la classificazione della parodontite è stata più volte modificata nel tentativo di allinearla alle prove scientifiche emergenti. Il workshop ha convenuto che, coerentemente con le attuali conoscenze sulla fisiopatologia, si possono identificare tre forme di parodontite: parodontite necrotizzante, parodontite come manifestazione di malattia sistemica, e le forme della malattia precedentemente riconosciute come "croniche" o "aggressive", ora raggruppate in un'unica categoria: "parodontite". Nel rivedere la classificazione, il workshop ha concordato un quadro di classificazione per la parodontite ulteriormente caratterizzato sulla base di un sistema di classificazione multidimensionale che potrebbe essere adattato nel tempo man mano che emergono nuove prove. La classificazione si basa su un sistema di stadiazione, che dipende in gran parte dalla gravità della malattia al momento della presentazione e dalla complessità della gestione della malattia, e su un grado, che

fornisce informazioni supplementari sulle caratteristiche biologiche della malattia, inclusa un'analisi basata sulla storia del tasso di progressione della malattia, valutazione del rischio di ulteriore progressione, esiti negativi previsti del trattamento e valutazione del rischio che la malattia o il suo trattamento possano influire negativamente sulla salute generale del paziente. La stadiazione coinvolge quattro categorie (fasi da 1 a 4) ed è determinata dopo aver considerato diverse variabili tra cui perdita di attacco clinico, quantità e percentuale di perdita ossea, profondità di sondaggio, presenza ed estensione di difetti ossei angolari e coinvolgimento delle forcazioni, mobilità dei denti e perdita dei denti dovuta alla parodontite. La classificazione per gradi comprende tre livelli (grado A - basso rischio, grado B - rischio moderato, grado C - alto rischio di progressione) e comprende, oltre agli aspetti relativi alla progressione della parodontite, lo stato di salute generale e altre esposizioni come il fumo o il livello di controllo metabolico nel diabete. Pertanto, la classificazione consente al medico di incorporare i fattori individuali del paziente nella diagnosi, che sono cruciali per la gestione completa del caso.

Framework for staging

Periodontitis stage		Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV
Severity	Interdental CAL at site of greatest loss	1-2mm	3-4mm	≥ 5mm	
	Radiographic bone loss	Coronal third (< 15%)	Coronal third (15-33%)	Extending to the middle third of the root or beyond	
	Periodontitis-associated tooth loss	No tooth loss from periodontitis		Tooth loss from periodontitis of ≤ 4 teeth	Tooth loss from periodontitis of ≥ 5 teeth
Complexity	Local	Maximum probing depth: ≤ 4mm Mostly horizontal bone loss	Maximum probing depth: ≤ 5 mm Mostly horizontal bone loss	In addition to Stage II complexity: • Probing depth: ≥ 6mm • Vertical bone loss: ≥ 3mm • Furcation involvement (Class II or III) • Moderate ridge defect	In addition to Stage III complexity: • Need for complex rehabilitation because of masticatory dysfunction • Secondary occlusal trauma, bite collapse, tooth drifting and/or flaring • Severe ridge defect
		Extent & distribution: Add to stage as descriptor. For each stage, describe extent as (1) localised (<30% of teeth involved), (2) generalised, or (3) molar-incisor pattern.			

Framework for grading

		Grade A	Grade B	Grade C	
Primary criteria	Direct evidence of progression	Evidence of no loss over 5 years	< 2mm over 5 years	≥ 2mm over 5 years	
	Indirect evidence of progression	Longitudinal data (radiographic bone loss or attachment loss) Percent bone loss/age	< 0.25	0.25 - 1.0	> 1.0
		Case phenotype	Heavy biofilm deposits with low levels of destruction	Destruction commensurate with biofilm deposits	Destruction disproportionate to biofilm deposits Evidence of periods of rapid progression and/or early-onset disease Expected poor response to therapy
Grade modifiers	Risk Factors	Smoking Diabetes	Non-smoker Normoglycaemic with or without prior diagnosis of diabetes	Smoker < 10 cigarettes/day HbA1c < 7.0% in diabetes patient	

Il workshop ha anche caratterizzato la salute parodontale (concetto mai discusso nelle classificazioni precedenti) e l'infiammazione gengivale in un parodonto ridotto dopo il completamento del trattamento con successo di un paziente con parodontite. Definizioni specifiche sono state concordate per quanto riguarda i casi di salute o infiammazione gengivale dopo il completamento del trattamento della parodontite basato sul sanguinamento al sondaggio e sulla profondità del solco / tasca residua. Questa distinzione è stata fatta per sottolineare la necessità di un più completo mantenimento e sorveglianza del paziente trattato con successo con parodontite. È stato accettato che un paziente con gengivite possa tornare a uno stato

di salute, ma un paziente con parodontite rimane un paziente con parodontite per tutta la vita, anche dopo una terapia di successo, e richiede cure di supporto per tutta la vita per prevenire il ripetersi della malattia.

Il workshop ha sviluppato una nuova classificazione per la salute perimplantare, mucosite perimplantare e peri-implantite. È stato fatto uno sforzo per rivedere tutti gli aspetti della salute perimplantare, delle malattie e degli aspetti rilevanti delle condizioni e delle deformità del sito implantare per ottenere un consenso per questa classificazione che potrebbe essere accettata in tutto il mondo. Le definizioni dei casi sono state sviluppate per l'uso da parte dei medici per la gestione dei casi individuali e anche per gli studi sulla popolazione. Le nuove definizioni dei casi relative al trattamento della recessione gengivale si basano sulla perdita interprossimale dell'attacco clinico e incorporano anche la valutazione della radice esposta e della giunzione amelo-cementizia. Il consensus report presenta una nuova classificazione della recessione gengivale che combina parametri clinici tra cui il fenotipo gengivale e le caratteristiche della superficie radicolare esposta. Nel consensus report il termine biotipo parodontale è stato sostituito da fenotipo parodontale.⁴⁰

La classificazione parodontale del paziente e la corretta diagnosi di ogni singolo dente dovrebbero costituire le basi per una prognosi preterapeutica e per la pianificazione del trattamento del singolo paziente.⁴¹

2.1.3 Prevenzione

La salute parodontale è favorita da comportamenti adeguati, come controllare regolarmente e in autonomia la placca, evitare il consumo di tabacco e controllare la glicemia in caso di diabete. D'altro canto, a un'igiene orale inadeguata, al consumo di tabacco e a livelli di glucosio non regolati viene attribuito un effetto distruttivo a carico dei tessuti parodontali. I dati provenienti dagli studi epidemiologici rivelano uniformemente una prevalenza della patologia parodontale maggiore al 50% nella popolazione adulta (Albandar et al. 1999; Albandar 2002).^{42 43}

Oltre al rapporto causale con i biofilm dentali, è stata ben documentata anche un'associazione positiva tra la patologia parodontale e il consumo di tabacco (Bergstrom 1989; Haber et al. 1993; Tomar e Asma 2000), il quale contribuisce al carico globale che grava sulla sanità pubblica. Infatti, quasi un terzo della popolazione adulta consuma tabacco nelle sue varie forme e il numero annuo di decessi per patologie connesse al suo consumo è in costante crescita.^{44 45 46}

Vari studi hanno dimostrato che la cessazione del fumo riduce il rischio di insorgenza e progressione della parodontite e migliora i risultati della terapia parodontale non chirurgica.

I risultati hanno dimostrato che il rischio di parodontite diventa paragonabile a quello dei non fumatori e che i risultati del trattamento parodontale non chirurgico migliorano dopo aver smesso di fumare.

Ne consegue che sembra ragionevole, coerentemente ai principi clinici del trattamento parodontale, includere le valutazioni comportamentali del paziente e, se necessario, applicare metodi di consulenza efficaci volti alla modifica dei comportamenti.⁴⁸

La rimozione meccanica della placca mediante l'igiene orale domiciliare è importante per il mantenimento della salute orale poiché rimuove la placca batterica, prevenendone l'accumulo e l'adesione a denti e gengive. Loe, mediante uno studio di gengivite sperimentale nell'uomo, ha dimostrato nel 1965 che la sospensione di tutte le misure di igiene orale in dodici persone sane con gengive clinicamente normali conduceva all'accumulo di detriti molli e sviluppo di gengiviti marginali in tutti i soggetti. Il tempo necessario per lo sviluppo della gengivite variava da dieci a ventuno giorni.

Esami batteriologici concomitanti hanno mostrato che il numero di microrganismi nell'area gengivale era aumentato e vi era un cambiamento nella composizione della flora. Ai risultati, il ripristino dell'igiene orale permetteva di riacquisire la salute gengivale e ristabilire la flora batterica originaria.⁴⁹

La placca può essere sopragengivale o subgengivale, aderire o non aderire al dente o al tessuto. Inoltre, la composizione microbica della placca varia da individuo a individuo e da sito a sito nella bocca dello stesso individuo (Thomas 2004). Il mantenimento di un efficace controllo della placca è il fondamento di ogni tentativo di prevenire e controllare la malattia parodontale. Infatti, senza la continua

collaborazione dei pazienti, il trattamento parodontale ha poco successo e i risultati ottenuti non durano molto.⁵⁰

La prevenzione della carie dentale e delle malattie parodontali è mirata al controllo della placca dentale. Gli agenti chimici possono rappresentare un prezioso complemento al controllo meccanico della placca. Gli agenti attivi dovrebbero prevenire la formazione del biofilm senza alterare l'equilibrio biologico all'interno del cavo orale. Nella prevenzione primaria possono essere utilizzati agenti anti-placca con proprietà diverse dall'attività battericida o batteriostatica. In questo approccio, un modesto effetto anti-placca può essere sufficiente o addirittura desiderabile, poiché diminuisce gli effetti collaterali dell'agente attivo. Gli agenti antimicrobici sono indicati al meglio nella prevenzione secondaria e terziaria, poiché gli obiettivi sono il ripristino della salute e la prevenzione della recidiva della malattia. L'obiettivo è prevenire o ritardare la ricolonizzazione sottogengivale da parte di microrganismi patogeni. Lo sviluppo di modelli di biofilm orale in vitro rappresenta certamente un progresso importante per lo studio di agenti anti-placca orali negli ultimi anni. I risultati di questi studi hanno dimostrato che clorexidina, esetidina, delmopinolo, fluoruro amminico / fluoruro stannoso, triclosan, composti fenolici, tra gli altri, possono inibire lo sviluppo e la maturazione del biofilm, nonché influenzare il metabolismo batterico. Agenti progettati per interferire con l'adesione batterica e prevenire la formazione del biofilm o l'interruzione dei biofilm esistenti può essere efficace nella prevenzione primaria. D'altra parte,

agenti antimicrobici possono essere indicati nella prevenzione secondaria o terziaria. È necessario sviluppare agenti attivi che aiutino il paziente a mantenere un ambiente biologico compatibile con la salute orale. Modelli di studio di biofilm che imitano la placca dentale possono rivelarsi uno strumento utile nella ricerca di nuove formulazioni antiplacca.⁵¹

Il microbioma orale comprende un microbiota altamente diversificato, costituito da oltre 700 microrganismi, inclusi batteri, funghi e virus. Man mano che la comprensione della relazione tra il microbioma orale e la salute umana si è evoluta, sono state identificate una vasta gamma di malattie orali e sistemiche associate a questa comunità microbica, inclusi ma non limitati a carie, malattie parodontali, cancro orale, cancro del colon-retto, cancro al pancreas e sindrome infiammatoria intestinale. L'ecologia microbica orale rappresenta un possibile marker se non un fattore di rischio per le malattie. I recenti progressi nella diagnostica dei biomarcatori salivari e nelle analisi del microbioma orale hanno ampliato la scoperta di patogeni microbici associati a malattie orali e sistemiche (per Es. carie dentale, malattia parodontale, malattie autoimmuni, diabete e tumori).

Stanno emergendo prove che il microbiota orale residente offre benefici all'ospite.

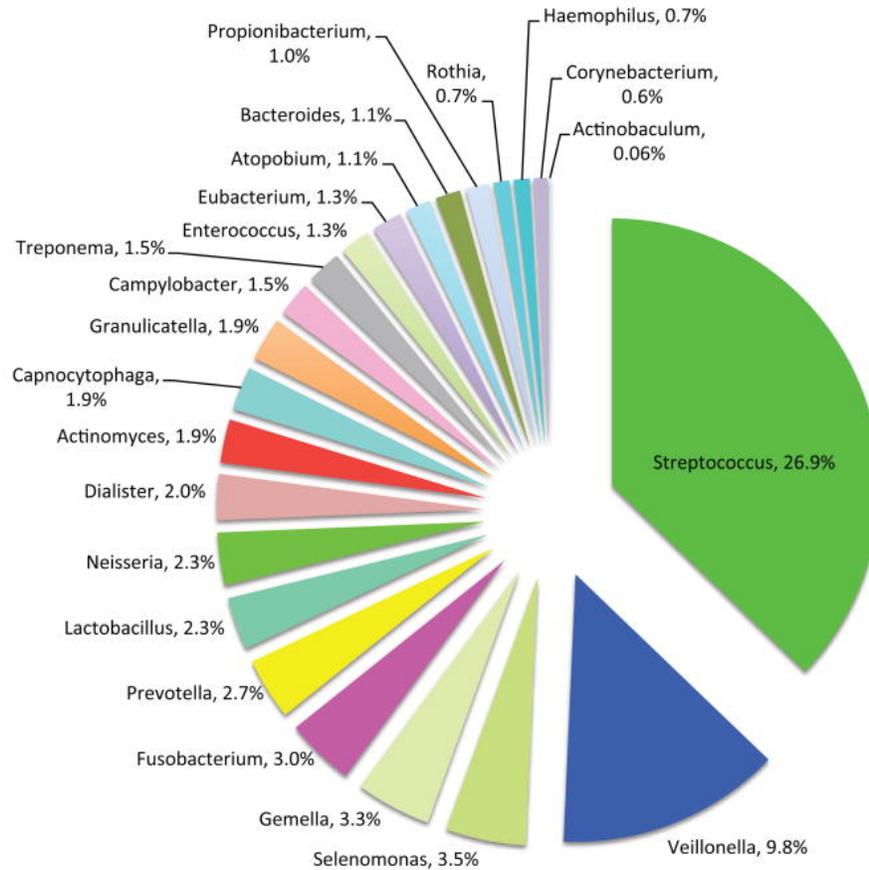
È deducibile che lo studio del biofilm orale associato alla salute parodontale permetterà di comprendere i potenziali meccanismi protettivi e definire strategie preventive. Gli studi microbiologici che

valutano una descrizione completa della composizione e della funzione del microbiota orale possono permettere l'identificazione di firme batteriche di rilevanza per gli approcci diagnostici microbici e gli obiettivi terapeutici.

La bocca è un serbatoio di microrganismi con il potenziale di causare malattie in altri siti del corpo. La conoscenza approfondita delle caratteristiche e dei fattori di virulenza di questi potenziali patogeni aiuterà la comprensione della patogenesi e la gestione di queste infezioni. Il futuro utilizzo del microbioma orale per far progredire la salute umana dipenderà da un'ulteriore convalida dei biomarcatori microbici specifici della malattia e dalla loro incorporazione in programmi diagnostici e preventivi sensibili e specifici, rapidi nella consegna dei risultati ed economici per un'ampia implementazione. Con il complementare di genomica umana, proteomica, trascrittomica, metabolomica, il microbioma orale dei bambini potrebbe essere al centro della futura medicina di precisione e della medicina personalizzata.¹

La cavità orale umana ospita il secondo microbiota più abbondante dopo il tratto gastrointestinale. Il database espanso del microbioma orale umano (eHOMD, rappresentato di seguito) che è stato aggiornato l'ultima volta il 22 novembre 2017, contiene le informazioni di circa 772 specie procariotiche, di cui il 70% è coltivabile e il 30% appartiene alla classe dei microrganismi incoltivabili. Sul 70% delle specie coltivabili, il 57% è già stato assegnato ai loro nomi. Il profilo 16S rDNA della cavità orale sana

ha classificato i batteri residenti in sei ampi phyla, vale a dire: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes* e *Spirochaetes* costituendo il 96% dei batteri orali totali.



52

Questi micro-abitanti orali nascosti mostrano un'influenza diretta sulla salute umana, dal metabolismo dell'ospite alle risposte immunitarie. Una microflora orale alterata è stata osservata in diverse malattie come diabete, batteriemia, endocardite, cancro, malattie autoimmuni e nascite pretermine. Pertanto, diventa cruciale comprendere la diversità microbica orale e come fluttua in condizioni malate / perturbate. I progressi nella metagenomica e nelle tecniche di sequenziamento di nuova generazione generano sequenze rapide e

forniscono ampie informazioni sui microrganismi residenti in una nicchia. Pertanto, le informazioni recuperate possono essere utilizzate per lo sviluppo di biomarcatori basati sul microbioma per il loro utilizzo nella diagnosi precoce delle malattie orali e associate.

26

2.1.4 Terapia

Nella maggior parte dei casi di parodontite la diversità della flora aumenta. Si ritiene che la maggior parte dei batteri incriminati danneggiano i tessuti in modo significativo solo se presenti in numero elevato per periodi di tempo prolungati. Studi clinici hanno ripetutamente dimostrato che il ridimensionamento e la levigatura delle radici, una procedura che mira a rimuovere i depositi di batteri sottogengivali raschiando la superficie del dente all'interno della tasca parodontale, è efficace. Allo stato attuale, per la terapia di qualsiasi forma di malattia parodontale, non esiste un protocollo di comprovata superiorità, in termini di efficienza o efficacia, oltre il ridimensionamento e la levigatura delle radici più amoxicillina e metronidazolo sistemici. Alcuni esponenti sostengono il razionamento di questi farmaci per i pazienti con uno specifico profilo microbico. Tuttavia, l'evidenza di qualsiasi beneficio dei protocolli clinici assistiti da batteriologia non è soddisfacente. I siti trattati sono soggetti a ricolonizzazione con un microbiota simile a quello presente prima della terapia. Il grado e la velocità della ricolonizzazione dipendono dal protocollo di trattamento, dai modelli di distribuzione dei microrganismi parodontali in altre parti del cavo

orale e dalla qualità dell'igiene orale del paziente. Per limitare l'uso di antibiotici ed evitare l'accumulo di effetti dannosi con la terapia ripetuta, è necessario compiere ulteriori sforzi per ottimizzare le procedure che affrontano la colonizzazione microbica e la ricolonizzazione della tasca parodontale. L'importanza della rimozione della placca sopragengivale per la risoluzione della gengivite è indiscussa e nessuna terapia per la malattia parodontale ha dimostrato un'efficacia continua senza un controllo aggiuntivo della placca sopragengivale. Si ritiene generalmente che il solo controllo della placca sopragengivale abbia scarso effetto sulla microflora sottogengivale delle tasche parodontali profonde. Tuttavia, per tasche moderatamente profonde (4-5 mm), che possono rappresentare uno stato patologico tra gengivite e parodontite marginale, l'igiene professionale dei denti, tre volte a settimana per 12 settimane, ha portato a cambiamenti significativi nella composizione del microbiota sottogengivale. Gli antibiotici sistemici aggiuntivi possono ulteriormente "eliminare o sopprimere in modo marcato microrganismi specifici con il potenziale di causare la rottura dell'attacco parodontale in pazienti suscettibili". L'efficacia clinica degli antimicrobici, in particolare della somministrazione combinata di amoxicillina e metronidazolo, è ben documentata. I miglioramenti clinici spesso sorprendenti e quasi immediati, in particolare la scomparsa della suppurazione in lesioni precedentemente "refrattarie", suggeriscono che ci possa essere un'azione benefica oltre a quella di uccidere i batteri. Non ci sono

attualmente prove concrete da studi clinici adeguatamente progettati per dimostrare che in alcune forme specifiche di parodontite microbiologicamente distinte, il trattamento con un regime antibiotico sistemico diverso da amoxicillina e metronidazolo sia superiore. La somministrazione orale è la forma più comune di applicazione degli antibiotici. La terapia locale può consentire l'applicazione di un agente antimicrobico a una concentrazione che non può essere ragionevolmente raggiunta per via sistemica e può consentire l'uso di sostanze (es. Antisettici) che sarebbero nocive in altre aree del corpo. Tuttavia, per limitare l'uso e il potenziale abuso di antibiotici, la ricerca di alternative deve continuare e devono essere compiuti ulteriori sforzi per trovare protocolli di trattamento ottimali per tutte le possibili condizioni cliniche. La prescrizione di routine di antibiotici per la parodontite da lieve a moderata non è raccomandata poiché queste condizioni in generale rispondono sufficientemente bene al solo ridimensionamento e levigatura radicolare. La ricerca clinica dovrebbe studiare nuove procedure che siano efficienti nel rimuovere i batteri senza indurre traumi o altri danni, anche dopo un uso ripetuto in sacche residue.⁵³

Il trattamento parodontale non chirurgico può avvenire applicando metodi diversi, tra cui l'uso di strumenti manuali, ablatori sonici e a ultrasuoni e dispositivi ablativi a laser. Sono state pubblicate numerose revisioni sistematiche riguardanti l'efficacia della terapia parodontale meccanica non chirurgica (Tunkel et al. 2002; van der Weijden e Timmerman 2002; Hallmon e Rees 2003; Suvan 2005;

Eberhard et al. 2008; Lang et al. 2008). Esiste un consenso tra queste revisioni che la strumentazione della tasca / radice associata ad adeguate misure di controllo della placca sopragengivale sia una modalità di trattamento efficace nel ridurre la profondità di tasca al sondaggio (PPD) e nel migliorare i livelli di attacco clinico (CAL) e che non ci sia una grande differenza nell'efficacia della strumentazione della tasca / radice utilizzando strumenti manuali o motorizzati (sonici / a ultrasuoni).

Tutti gli approcci di trattamento non chirurgico per il controllo dell'infezione parodontale – SRP convenzionale del quadrante, la strumentazione totale della bocca e la disinfezione totale della bocca⁵⁴ - determinano miglioramenti marcati delle condizioni cliniche e la decisione di selezionare un approccio rispetto a un altro deve richiedere anche considerazioni diverse dai soli esiti clinici. Bisogna infine riconoscere l'importanza della qualità della strumentazione nella rimozione dei detriti nella tasca / radice e l'obiettivo finale è la riduzione della carica batterica a livello di tutti i siti dentali al di sotto del livello soglia rispetto al quale il singolo ospite può far fronte all'infezione residua.⁵⁵

La terapia di accesso chirurgica deve essere considerata come sussidio a una terapia di tipo causale. Le varie tecniche chirurgiche devono quindi essere valutate rispetto alla possibilità da esse presentata di facilitare la rimozione dei depositi sottogengivali e il controllo dell'infezione eseguito dal paziente, favorendo in questo modo la conservazione del parodonto per un lungo periodo.⁵⁶

2.2 Candidosi

Negli ultimi decenni le specie di *Candida* sono diventate importanti e frequenti patogeni umani, in grado di causare diverse malattie sia superficiali che profonde. Mentre le malattie superficiali, generalmente, si acquisiscono in comunità da individui immunocompetenti, quelle profonde, invasive e sistemiche interessano principalmente individui immunocompromessi. *C. albicans* rappresenta la specie maggiormente associata con le infezioni nell'uomo.

2.2.1 Struttura antigenica e tossine

I due maggiori aspetti dell'interazione tra patogeno ed ospite sono l'adesione delle cellule di *C. albicans* con le cellule ed i tessuti dell'ospite e l'immunomodulazione della risposta immunitaria dell'ospite. *C. albicans* produce una serie di enzimi extracellulari che facilitano l'adesione e / o la penetrazione nei tessuti. Fosfolipasi A, B e C e lipofosfolipasi possono danneggiare la membrana cellulare della cellula ospite e facilitare l'invasione, come la proteinasi acida che è in grado di aiutare l'adesione e svolgere un ruolo importante nel degradare le immunoglobuline (IgG e IgA). L'attività della proteinasi acida è ottimale a pH basso. L'adesione è un prerequisito essenziale per la colonizzazione ed una tappa fondamentale per stabilire l'infezione da parte di *C. albicans*.

2.2.2 Patogenesi

Le cellule di lievito sono in grado di diffondere più facilmente, mentre le ife promuovono l'invasione del tessuto epiteliale ed

endoteliale ed aiutano ad eludere la fagocitosi da parte dei macrofagi. La prima fase dell'infezione da *Candida* è la colonizzazione epiteliale che, a sua volta è dipendente dall'adesione del microrganismo alle cellule epiteliali e alle proteine.

C. albicans fa parte della normale flora gastrointestinale e determina un'infezione quando le difese dell'ospite sono compromesse o a seguito di un'alterata funzionalità dell'organismo. Tuttavia, le infezioni della cute e delle membrane mucose possono anche verificarsi in pazienti immunocompetenti; al contrario, la candidosi sistemica si verifica soltanto in individui con un elevato grado di immunocompromissione.

2.2.3 Manifestazioni cliniche

Tra le manifestazioni cliniche la candidosi orofaringea (OPC) o candidosi pseudomembranosa (mughetto) è caratterizzata dalla presenza nel cavo orale di placche bianche che, se rimosse, mettono in evidenza una superficie sanguinante. Oltre ad interessare i pazienti affetti da AIDS, la candidosi pseudomembranosa è stata descritta nei neonati, negli anziani, nei pazienti affetti da cancro e / o sottoposti a chemioterapia, in quelli con carenze nutrizionali, con deficit dell'immunità cellulo-mediata o disfunzioni dei fagociti o dopo trattamento con antibiotici ad ampio spettro o farmaci steroidei. Altre manifestazioni di OPC comprendono la candidosi eritematosa, la candidosi cronica iperplastica e la cheilite angolare. Quasi tutti i casi di OPC sono causati da *C. albicans*, anche se altre specie come *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, e *C. dubliniensis*

sono state associate a OPC ed esofagite. La candidosi esofagea, caratterizzata da disfagia, dolore retro-sternale e comparsa di ulcere ed erosioni sull'esofago, si presenta in pazienti con malattie croniche, la maggior parte dei quali è stata trattata in precedenza con antibiotici, steroidi ed omeprazolo ed è particolarmente diffusa tra gli individui con AIDS.⁵⁷

2.2.4 Epidemiologia e diagnosi

Si stima che circa il 30–60% degli adulti sani sia portatore di specie di *Candida* nella cavità orale. La stragrande maggioranza di questi microrganismi esiste come colonizzazione commensale piuttosto che come processo patologico. La maggior parte di questi studi epidemiologici sono stati eseguiti mediante colture per gli organismi e molti di coloro che hanno partecipato non hanno mostrato segni clinici o sintomi di infezione da *Candida*. A causa del tasso di trasporto commensale di fondo tra la popolazione in generale, è probabile che la coltura delle specie *Candida* come procedura diagnostica produca molti falsi positivi. È importante riconoscere la differenza tra le specie di *Candida* come organismi commensali all'interno del microbioma del cavo orale rispetto alla *Candida* che agisce come entità patologica. Nella valutazione del paziente e nelle scelte terapeutiche, il clinico deve sempre considerare la differenza tra commensalismo e patogenesi. La colonizzazione patologica delle specie *Candida* è correlata a una serie di fattori inclusi, ma non limitati a: età estrema, malnutrizione, malattia metabolica, infezioni concomitanti, terapia antibatterica, condizioni

immunocompromesse, radioterapia, pazienti trapiantati, ipofunzione delle ghiandole salivari e a lungo termine terapia steroidea. Un grave coinvolgimento sistemico di specie *Candida* può causare morbilità e mortalità significative, in particolare negli ospiti immunocompromessi. Le candidemie associate a *Candida albicans* hanno tassi di mortalità che possono superare il 30% in alcune popolazioni. I pazienti gravemente neutropenici, i pazienti in terapia intensiva e i pazienti in terapia intensiva neonatale tendono ad ospitare generi patologici meno comuni di *Candida*. La scelta dell'agente antifungino ad ampio spettro corretto per la profilassi in questi pazienti è letteralmente una decisione salvavita. Quando le difese dell'ospite si abbassano, la natura dimorfica della *C. albicans* consente all'organismo di passare da uno stato commensale a uno patogeno soprattutto attraverso la formazione di biofilm. Questi biofilm, in virtù della loro struttura tridimensionale, sono molto resistenti anche a concentrazioni elevate di farmaci antifungini. I microrganismi incorporati sulle superfici dell'ospite o abiotiche (cateteri, impianti a permanenza, ecc.) spesso si staccano ed entrano nella circolazione sistemica. In pazienti gravemente immunocompromessi, le infezioni della mucosa orale possono anche causare candidemia, che è anche associata ad un alto tasso di mortalità. Nella diagnosi i preparati citologici sono semplici, non invasivi e convenienti, ma a causa della mancanza di esposizione dei medici alla tecnica, sono spesso sottoutilizzate. Sebbene inappropriati per molti esami diagnostici, nel contesto clinico

corretto, possono servire come utile complemento per ottenere una diagnosi. Come già citato la presentazione classica della candidosi è quella della candidosi pseudomembranosa, comunemente nota come mugugno. Il tordo è un termine colloquiale derivato da una famiglia di uccelli con caratteristiche macchie bianche sul petto. Altre forme di candidosi, come la forma eritematosa cronica, possono rappresentare una sfida diagnostica per i medici, specialmente in assenza di una protesi dentale. La determinazione dell'origine dell'eritema come processo patologico indotto da eccessiva crescita di *Candida* contro *Candida* come un organismo commensale può richiedere un processo terapeutico di un agente antifungino. Le varie forme di candidosi orale sono straordinariamente comuni. A volte il regime terapeutico è la semplice interruzione dell'agente predisponente. Sfortunatamente, i cofattori predisponenti come l'ipofunzione delle ghiandole salivari, protesi dentarie, farmaci, ecc. sono intrinsecamente a lungo termine e immutabili.⁵⁸

2.2.5 Terapia

Nel 2009, la Infectious Diseases Society of America ha aggiornato le sue linee guida di pratica clinica per la gestione della candidosi. La sospensione di nistatina a una concentrazione di 100.000 U / mL e un dosaggio di 4-6 mL qid, o da una a due pastiglie di nistatina (200.000 U ciascuna) somministrate qid per 7-14 giorni, è raccomandata per la candidosi orofaringea lieve. Inoltre, l'Organizzazione mondiale della sanità ha raccomandato che la terapia topica con sospensione o pastiglie di nistatina possa essere un'alternativa al fluconazolo orale

per il trattamento della candidosi orofaringea nei bambini e negli adulti HIV positivi. Mediante vari studi la pastiglia di nistatina è stata significativamente superiore al placebo nel trattamento della stomatite da dentiera, mentre la sospensione di nistatina non era superiore al fluconazolo nel trattamento della candidosi orale nei neonati, nei bambini o nei pazienti affetti da HIV / AIDS. Prove indirette da uno studio descrittivo hanno dimostrato che la somministrazione di pastiglia di nistatina da sola o pastiglia e sospensione in combinazione è più efficace di quella della sola sospensione; la durata del trattamento prolungata fino a 4 settimane può aumentare l'efficacia della nistatina. Sono necessari studi di controllo randomizzati più ben progettati e di alta qualità per confermare questi risultati. ⁵⁹

La somministrazione endovenosa di amfotericina è un'opzione per forme gravi di infezione sistemica da candida potenzialmente letali, ma è associata a significativi effetti collaterali e tossicità. Fino all'avvento degli azoli, i polieni erano l'unica opzione pratica per il trattamento di tutte le forme di candidosi orale. L'efficacia dei polieni topici in bocca è limitata a causa della difficoltà nel mantenere livelli sufficienti dell'agente antifungino nell'ambiente della candida. Ciò è ulteriormente complicato dal sapore sgradevole dei polieni, che stimola il flusso salivare, diluendo così i livelli salivari del farmaco al di sotto dei livelli terapeutici. Le aziende farmaceutiche hanno ora smesso di produrre forme topiche di amfotericina e tutti i formati tranne uno (sospensione) di nistatina. Nonostante l'uso diffuso negli

ultimi sei decenni, l'incidenza della resistenza ai polieni da parte della candida è rara, ma a volte può insorgere attraverso una riduzione del contenuto di ergosterolo delle membrane cellulari.

Gli antimicotici azolici sono diventati disponibili per l'uso clinico negli anni '80. Questi farmaci sono fungistatici e agiscono attraverso l'interferenza con un enzima fungino, lanosterolo demetilasi, che è fondamentale per la biosintesi del componente ergosterolo della membrana cellulare. Il miconazolo è disponibile in formato crema o unguento e in combinazione con un antinfiammatorio steroideo. Tutti questi formati di miconazolo possono essere utilizzati solo per via topica. Al contrario, altri azoli, inclusi ketoconazolo, fluconazolo e itraconazolo, sono ben assorbiti attraverso l'intestino e sono stati i primi antimicotici che potevano essere somministrati per via sistemica tramite somministrazione orale. Tuttavia, il ketoconazolo è associato a una tossicità significativa, che ne limita l'uso clinico. Itraconazolo e fluconazolo sono relativamente sicuri e raramente associati a reazioni avverse. Tuttavia, esiste un'importante interazione farmacologica tra warfarin e agenti antifungini azolici, incluso il miconazolo, anche se somministrato per via topica. Il warfarin è potenziato e l'uso concomitante può provocare gravi emorragie e persino la morte. È possibile utilizzare la sospensione topica di nistatina in pazienti che assumono warfarin ma, come descritto sopra, l'efficacia clinica di questo preparato antifungino è scarsa. Si può prendere in considerazione l'idea di rivolgersi al personale medico che prescrive il warfarin per vedere se al paziente

può essere fornito il più recente farmaco anticoagulante orale alternativo, dabigatran, poiché non interagisce con il fluconazolo. Tuttavia, l'uso di dabigatran al posto del warfarin potrebbe non essere appropriato o possibile, il che crea un dilemma quando si cerca di gestire una significativa infezione orale da candidosi in un paziente che assume warfarin. Un'altra potenziale interazione farmacologica comunemente riscontrata che coinvolge gli antimicotici azolici è con le statine. Un paziente a cui è stato prescritto il fluconazolo deve essere istruito ad astenersi dall'assumere la statina per la durata della terapia antifungina, di solito solo sette giorni. Il fluconazolo è particolarmente indicato per l'uso nel trattamento della candidosi orale poiché viene secreto nella saliva a livelli equivalenti a quelli raggiunti nel sangue. Il fluconazolo è prescritto di routine per i pazienti ambulatoriali in forma di capsule, ma è anche disponibile come sospensione se questo formato di consegna è richiesto. Inoltre, il fluconazolo può essere somministrato per via endovenosa. Sfortunatamente, negli ultimi anni è emersa una resistenza acquisita agli antimicotici azolici e anche alcune specie di *Candida* sono intrinsecamente resistenti a questi agenti.⁶⁰ La somministrazione di farmaci antifungini, quindi, è generalmente la terapia di prima linea della candidosi. Tuttavia, l'emergere di ceppi resistenti ai farmaci e la frequente ricorrenza della malattia negli individui affetti stanno aumentando le sfide nella corretta ricerca terapeutica.⁶¹

2.3 La carie

In ambito cariologico, vi è unanime consenso riguardo al fatto che “carie” (o “carie dentale”) non sia un concetto intercambiabile con quello di “lesione cariosa”. In sostanza, la “carie” non può essere rimossa, ma curata, mentre la “lesione cariosa” può essere rimossa o trattata per mezzo di procedure non invasive, minimamente invasive o invasive.⁶² La lesione cariosa, fra l’altro, non è certo l’unico esito ascrivibile alla carie; escludendo gli esiti a livello orale più ampio (es. difficoltà masticatorie), generale (es. difficoltà digestive) e psicologico (disagio estetico e sociale) è possibile ravvisare a livello dentale per azione diretta o indiretta della carie (non necessariamente in ordine temporale):

- Demineralizzazione superficiale, lesione cariosa non cavitata (NCCL), white spot (WS).
- Brown spot, conseguente all’incorporazione di cromogeni nella WS.
- Iperemia pulpare.
- Lesione cariosa cavitata (CCL).
- Atresia pulpare.
- Pulpite.
- Perdita di vitalità pulpare.
- Frattura coronale parziale o totale.
- Perdita dell’elemento (solitamente estratto).

La carie o “patologia cariosa” può essere definita quindi come un “processo patologico infettivo e trasmissibile, dove un biofilm

cariogenico, in presenza di condizioni orali più patologiche che protettive, provoca la demineralizzazione dei tessuti duri del dente”. Per condizioni orali protettive vengono intese quelle in grado di favorire la creazione di un ambiente orale “remineralizzante”, ossia più favorevole all’attacco di molecole al dente piuttosto che al loro distacco (demineralizzazione). La preponderanza di condizioni patologiche renderà determinate superfici dentali (quelle sulle quali il biofilm cariogeno ha modo di prosperare indisturbato) più propense alla demineralizzazione che alla remineralizzazione.⁶³

In riferimento alla letteratura internazionale ed alle linee guida dell’W.H.O., la patologia cariosa è definita una malattia a eziologia multifattoriale, localizzata, cronico-degenerativa, post-eruttiva, che interessa il tessuto duro dentale, determinandone la distruzione con formazione di una cavità (Brown JP, 2015; Wu A, 2014; Hayes M, 2015; Ito A, 2012; Söderström U, 2014).⁶⁴

Eziologicamente la carie è una malattia infettiva, quindi determinata da un fattore microbico che è l’agente causale scatenante. È caratterizzata da una progressiva distruzione dei tessuti duri che comprende sia una decalcificazione della componente minerale sia una proteolisi della componente organica, con conseguente cavitazione.⁶⁵

2.3.1 Epidemiologia

La carie o “patologia cariosa” è di gran lunga la malattia più diffusa al mondo:

- oltre il 40% della popolazione mondiale presenta, infatti, almeno una lesione cariosa non trattata nella propria bocca; ⁶⁶
- oltre il 90% degli esseri umani avrà almeno una volta esperienza di carie nel corso della propria vita. ⁶⁷

La carie dentale è considerata la singola malattia cronica infantile più comune e si ritiene che la sua prevalenza sia aumentata di recente nei bambini di età compresa tra 2 e 5 anni in tutto il mondo, rendendo questo gruppo di età un'area di azione prioritaria globale. I dati del censimento del 2007 hanno riportato che, per i bambini degli Stati Uniti di età compresa tra 2 e 5 anni, la prevalenza della carie nei denti primari ha mostrato un aumento, dal 24% circa al 28% tra il 1988-1994 e il 1999-2004, con tassi di carie più elevati nei bambini che vivono in famiglie povere o appartenenti a minoranze etniche.

Tradizionalmente, è stata osservata una bassa prevalenza di carie nei paesi in via di sviluppo, mentre la prevalenza è maggiore nei paesi sviluppati. Questa situazione geografica è diventata più complessa a causa della rapidità dello sviluppo economico e dei rapidi cambiamenti nelle abitudini e nella dieta in molti paesi. Sebbene possano esserci differenze di sesso o etniche, sono minori rispetto a fattori come il consumo di zucchero, lo stile di vita e le differenze economiche.

L'indice globale tradizionale utilizzato per misurare la carie negli studi epidemiologici è l'indice DMF (Decayed, Missing and Filled): il conteggio di DMFT per un individuo o un gruppo registra la loro esperienza di carie (cioè il totale delle carie attuali e passate).

La carie non trattata nei denti permanenti è la condizione più prevalente valutata in tutte le condizioni mediche, con una prevalenza globale del 35% per tutte le età combinate, con 2,4 miliardi di persone colpite. La carie non trattata nei denti primari nei bambini si è classificata al 10° posto in prevalenza, colpendo 621 milioni di bambini in tutto il mondo. ⁶⁸

2.3.2 Patogenesi

La carie è una patologia mediata da biofilm caratterizzata da periodi prolungati di pH basso che conduce a una perdita minerale netta. ⁶⁹

I fattori determinanti o causali della carie sono rappresentati da (Diagramma di Keyes, 1960):

terreno recettivo (l'ospite);

carboidrati della dieta che fungono da substrato;

microrganismi. ⁶⁵

La carie si verifica in presenza di un biofilm dentale cariogeno (cioè patogeno) e di una frequente esposizione a carboidrati alimentari, principalmente zuccheri liberi, e quindi deve essere considerata una malattia dietetico-microbica. ⁷⁰

Storicamente, il modello di malattia per la carie dentale era costituito da *Streptococchi mutans* e specie di *Lactobacillus* e la professione odontoiatrica si concentrava sul ripristino delle lesioni / danni dalla malattia utilizzando un modello chirurgico. Più recenti evidenze scientifiche evidenziano che questa malattia è più complessa di come viene descritta in tale modello. Mediante il sequenziamento di DNA sono state riscontrate oltre 40 specie batteriche che hanno un ruolo

nella patogenesi della carie, e tale lista è in continua crescita. In recenti studi indipendenti sono state riscontrate ulteriori specie come *Bifidobacterium species*, *Scardovia wiggisiae*, *Slackia exigua* e *Propionibacterium acidifaciens*, implicate nell'insorgenza di carie.⁷¹

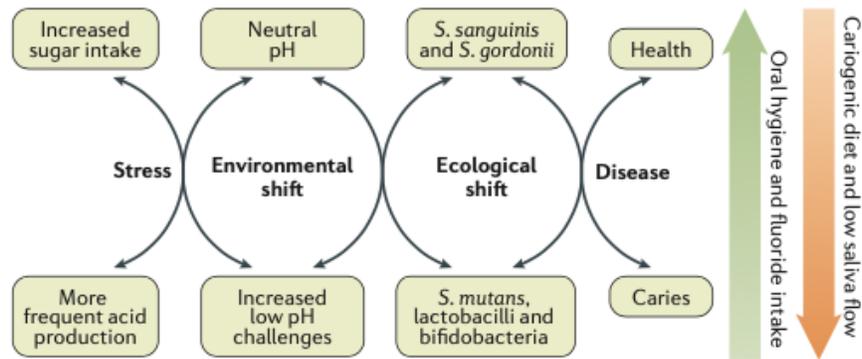
⁷² La carie dentale ha anche potenziali effetti sistemici. Studi da campioni di placca coronarica raccolti casualmente durante l'intervento chirurgico indicano che i batteri del cavo orale, come *Streptococcus mutans*, possono essere ritrovati in altri distretti.

La carie dentale ha anche apparenti caratteristiche ereditarie e associazioni genetiche. I primi studi hanno scoperto che gli individui con il polimorfismo G20A per la beta-defensina-1, un enzima batteriolitico salivare, ha punteggi cinque volte maggiori di denti cariati, mancanti e otturati (DMFT) osservati in soggetti con altre variazioni di questo gene. Associazioni ereditarie con il gene delle papille gustative TAS2R38 aumenta il rischio per la carie dentale. Un recente studio sull'associazione a livello di genoma ha indicato più associazioni di siti genetici con un rischio per la carie, il più forte dei quali era LY-L2 (lysozyme-like 2), che codifica per un altro enzima batteriolitico. I dati di questo studio hanno anche indicato 5 modelli distinti di malattia localizzati in vari siti della bocca, con il gene LY-L2 associato a lesioni cariose solo negli incisivi mandibolari. Ulteriori associazioni genetiche sono state attribuite a una mutazione nella matrice metalloproteinasi 13 (MMP13) e all'allele antigene HLA-DQ2.

Indipendentemente dalla complessità del modello di malattia del biofilm, tuttavia, la carie dentale è ancora dovuta a periodi prolungati di basso pH, con conseguente perdita netta di minerali. Con il continuo sviluppo delle tecnologie di sequenziamento di prossima generazione, sarà possibile esaminare il biofilm e il suo comportamento metabolico in modo diverso. Nyvad et al hanno esplorato la nuova idea di vedere il biofilm come un singolo organismo, come proposto per la prima volta da Buchen. Il Biofilm è una collezione di organismi distinti e separati, ma si comporta collettivamente come un superorganismo.^{73 74} Come tale, è meno importante identificare quali specie batteriche specifiche siano presenti ma, come gli autori hanno proposto, effettuare uno studio metagenomico per identificare in totale quali geni siano presenti nel biofilm. I geni attivi producono le proteine con conseguente produzione metabolica dal biofilm. Nel caso della carie dentale, la preoccupazione è che la produzione di acido crei periodi prolungati di basso pH. La futura ricerca sui biofilm delle carie dentali, quindi, non dovrebbe essere focalizzata su batteri specifici, ma sulla funzione e la produzione di biofilm.⁷⁵

Nella carie dentale, si verifica un cambiamento ecologico all'interno dell'ambiente del biofilm dentale, guidato dal frequente accesso a carboidrati dietetici fermentabili. Ciò porta a un passaggio da una popolazione equilibrata di microrganismi a bassa cariogenicità ad un consorzio ad alta cariogenicità e ad una maggiore produzione - e correlata tolleranza - di acidi organici che promuovono la perdita di

minerali dei tessuti duri del dente. Ecco perché chiamiamo questo consorzio acidogenico e acidofilo (sinonimo acidurico).



Oltre alla presenza di carboidrati dietetici fermentabili e alla selezione di specie batteriche acidogenico-acidofile, la suscettibilità dell'ospite, che è un termine piuttosto semplificato per la complessità multifattoriale di medesima patologia è il terzo attore principale.

Lo *Streptococcus mutans* è riconosciuto come microrganismo principale coinvolto nei processi cariogeni, tuttavia, nel tempo, il suo ruolo è cambiato da quello di vero patogeno a quello di potenziatore e indicatore di un processo cariogeno innescato dalla dieta. Lo *S. mutans*, infatti, viene rilevato in alcuni soggetti privi di carie e trovato assente in diversi individui con carie, compromettendo il suo ruolo di iniziatore della carie. Inoltre, come già citato, sono state riscontrate specie più rilevanti come parenti di *Streptococchi*, come *S. sobrinus*; *Bifidobatteri*, inclusi *Bifidobacterium dentium* e altri *Bifidobacterium spp.*; ma anche specie più lontane come *Scardovia wiggsiae*, e *Lattobacilli*, in particolare quelli con elevato potenziale di adesione alla pellicola acquisita. Numerosi studi epidemiologici e in vitro hanno suggerito che *S. sobrinus* - in circostanze ancora da determinare - potrebbe essere anche più cariogeno di *S. mutans*.^{76 77}

L'intera rete di organismi microbici coinvolti, che sono non solo batteri ma anche lieviti saccarolitici (ad esempio *Candida albicans*), Archaea (potenziatore dei processi di fermentazione dal consumo di prodotti finali come CO₂ e H₂), o batteriofagi (potenziatori del trasferimento genico laterale e quindi dell'evoluzione), sono estremamente complessi e diversificati. Nonostante la ricerca debba ancora produrre diversi risultati, nella patologia cariosa si riscontrano dei principi universali, quali:

- presenza di microrganismi acidogenico-acidurici e la loro capacità di aderire alla superficie del dente, sia direttamente (pionieri come *S. mutans*) che indirettamente (beneficiari come *bifidobatteri e lattobacilli*)
- condizioni ambientali favorevoli alla moltiplicazione e al metabolismo di tali specie: accesso a zuccheri a basso peso molecolare, in particolare saccarosio, e basso potenziale redox allo stesso tempo. Alto contenuto di zucchero e basso contenuto di ossigeno portano a una rapida fermentazione e produzione di acido.⁷⁸

2.3.3 Classificazione della carie

In letteratura sono diversi i tipi di classificazione che permettono di descrivere il processo carioso. Tra questi si possono annoverare: anatomo-patologica, topografica, sintomatologica, clinica, radiografica. Da un punto di vista prettamente operativo le classificazioni più importanti sono quella clinica e quella radiografica.

Classificazione anatomo-patologica

Da un punto di vista anatomo-patologico la *carie dello smalto* si presenta *macroscopicamente* a livello delle superfici lisce come una chiazza biancastra, opaca, che può evolvere in cavitazione oppure pigmentarsi. A livello di solchi e fossette lo smalto interessato presenta un aspetto di colore bruno (aree scure), spesso difficilmente valutabile clinicamente per quanto riguarda l'evoluzione verso la formazione di cavità, con eventuale coinvolgimento della dentina sottostante. La valutazione microscopica delle lesioni cariose interessanti le superfici lisce dello smalto mostra un andamento di forma triangolare (sezione di cono) con apice rivolto verso la dentina. A livello dei solchi, invece, la lesione stessa presenta la forma di un triangolo, ma l'apice in questo caso è orientato esternamente mentre la base della demineralizzazione si localizza verso il substrato dentinale. In entrambe le situazioni, e soprattutto nel caso di lesioni iniziali, la superficie esterna risulta essere apparentemente intatta, rendendo difficile per l'operatore una precisa valutazione del reale approfondimento verso i tessuti sottostanti.

Microscopicamente la carie della dentina presenta una peculiare forma conica con l'apice della zona d'invasione rivolto in direzione pulpare. Alcuni autori suddividono in tre fasi distinte il processo di progressione della carie:

- fase I: demineralizzazione
- fase II: cambiamento di colore
- fase III: invasione batterica.

Lo schema di Carlier del 1954 descrive schematicamente le cinque zone caratteristiche della carie dentinale, distinguendo, in direzione corono-apicale, una porzione più esterna “disorganizzata”, una sottostante costituita da dentina “rammollita”, un livello di “invasione batterica” e, ancora più in profondità, una zona “trasparente” con iniziale obliterazione dei tubuli dentinali che precede l’ultima porzione, quella “dura”, indice di reazione pulpare. La lesione cariosa dentinale viene quindi considerata un processo patologico vitale nel quale si alternano fasi di alterazioni regressive e fenomeni reattivi.

Classificazione topografica

Esistono due tipi di classificazioni topografiche relative alle lesioni cariose. La prima e più conosciuta è quella di Black. All’interno della classificazione di Black si trova una prima distinzione tra carie coronale e carie radicolare. La carie coronale viene poi ulteriormente suddivisa in 5 gruppi:

- *Classe I:* Depressioni anatomiche, solchi e fossette dei denti posteriori. Solchi e forami ciechi dei denti anteriori
- *Classe II:* Cavità prossimali di molari e premolari
- *Classe III:* Cavità prossimali di incisivi e canini senza coinvolgimento dell’angolo incisivo
- *Classe IV:* Cavità prossimali di incisivi e canini con interessamento di un angolo incisivo
- *Classe V:* Cavità interessanti il terzo gengivale vestibolare o linguale di tutti i denti

A completamento delle classiche cinque classi è stata inoltre aggiunta successivamente anche una *Classe VI* che contempla le cavità sulla sommità delle cuspidi dei posteriori e sul margine incisivo dei denti anteriori.

La seconda classificazione topografica è quella più recentemente proposta da Mount e Hume nel 1998; le lesioni vengono classificate in base alla localizzazione e alle dimensioni. In base alla loro localizzazione le lesioni cariose vengono distinte in:

posizione 1: solchi occlusali degli elementi posteriori e superfici lisce degli anteriori

posizione 2: superfici interprossimali, punti di contatto

posizione 3: terzo cervicale e radici esposte.

Abbinata alla posizione si considera anche la dimensione:

- size 1: piccole dimensioni, minimo coinvolgimento della dentina
- size 2: medie dimensioni, coinvolgimento moderato della dentina
- size 3: grandi dimensioni, interessamento importante della dentina
- size 4: lesioni molto estese, con perdita massiva di struttura dentaria.

Classificazione sintomatologica

La carie iniziale dello smalto si presenta:

- asintomatica
- con aree scure pigmentate nei solchi

- con zone biancastre lattescenti sulle superfici lisce, soprattutto interprossimali.

Nelle lesioni interprossimali può essere riferito fastidio dovuto a sensazione da corpo estraneo, ristagno o irritazione del parodonto (possibile sanguinamento della papilla gengivale).

La carie conclamata della dentina presenta una sintomatologia più evidente che orienta nella diagnosi per le caratteristiche del dolore dentinale:

- provocato da stimoli esogeni;
- localizzato (il paziente riesce a riferire con una certa precisione la zona in cui ha fastidio);
- immediato (cessa rapidamente dopo stimolazione);
- non varia con il variare del tipo di stimolazione;
- non classificabile secondo una scala di intensità;
- in risposta a:
 - stimolazione meccanica (come masticazione o spazzolamento);
 - stimolazione chimica (classicamente cibi dolci o acidi – presenza di dolore con “eco” di apparente maggiore durata dopo l’applicazione dello stimolo);
 - stimolazione termica.

Classificazione clinica

La classificazione clinica secondo i professori Baume e Holtz della scuola di Medicina Dentale dell’Università di Ginevra è basata sul grado di penetrazione della carie e distingue cinque livelli.

- *Carie iniziale*: Senza cavità, interessa solo lo smalto, con aspetto di macchia biancastra, ruvida e gessosa; è l'unica reversibile con la fluorazione.
- *Carie superficiale*: Supera la giunzione smalto-dentinale, quindi inizia ad invadere la dentina.
- *Carie profonda*: Si estende in profondità interessando il corpo dentinale.
- *Carie penetrante*: Determina una reazione da parte dell'organo pulpo-dentinale con formazione di dentina terziaria.
- *Carie perforante*: Comporta esposizione pulpare.

Classificazione radiografica

La diagnosi radiografica permette di convalidare quella clinica obiettiva. In base al quadro radiografico ottenuto con radiografie interprossimali (o bite-wing) si possono classificare le lesioni cariose, secondo Marthaler e Lutz, in:

- D0: assenza di radiotrasparenza
- D1: radiotrasparenza che interessa la metà esterna dello smalto
- D2: radiotrasparenza che interessa metà esterna ed interna dello smalto
- D3: radiotrasparenza che interessa la metà esterna della dentina
- D4: radiotrasparenza che interessa la metà interna della dentina.

Dal punto di vista clinico-operativo è da sottolineare come l'immagine radiografica tenda a sottostimare la reale estensione del processo carioso in atto. Secondo alcuni autori la valutazione diagnostica delle lesioni D0 e D4 sarebbe la più affidabile, mentre le D1, D2 e D3 presenterebbero una minore coincidenza (5-10%) tra profondità radiologica e clinica. ⁶⁵

2.3.4 Diagnosi

La diagnosi di carie può essere suddivisa in diagnosi di presenza, diagnosi di attività e diagnosi di rischio carie.

Diagnosi di presenza

La diagnosi di presenza si basa fundamentalmente sull'esame obiettivo e strumentale.

L'esame obiettivo classico prevede l'osservazione diretta delle superfici accessibili previa corretta pulizia, asciugatura e illuminazione delle stesse. Una corretta separazione tramite cuneo interdentale può favorire l'ispezione della zona interprossimale di contatto tra due denti adiacenti. Scopo dell'esame obiettivo sarà quello di valutare la colorazione dello smalto e di individuare la presenza di cavità aperte con interessamento dentinale.

L'esame strumentale moderno contempla differenti metodiche diagnostiche; alla tradizionale esplorazione con specillo ed esame radiografico si possono affiancare tecniche più sofisticate ed evolute quali la transilluminazione ⁷⁹, la conduttanza elettrica e la fluorescenza-laser.

L'*obiettivo* è quello di valutare la presenza di carie interprossimali ed eventualmente delle carie nascoste occlusali (*hidden caries*) nelle quali la presenza di smalto occlusale macroscopicamente intatto nasconde un già marcato interessamento della dentina sottostante. Tali insidiose lesioni cariose sarebbero presenti, secondo alcuni autori, nel 10-50% degli adolescenti.

L'*esame radiografico* tradizionale o digitale risulta fondamentale per una corretta diagnosi, soprattutto per le lesioni interprossimali. Alcuni autori asseriscono che l'assenza di un esame radiografico ben eseguito può comportare la mancata diagnosi dell'80% delle lesioni presenti. Le radiografie hanno un ruolo fondamentale sia per la diagnosi che per la valutazione decisionale circa la necessità di intervento: la presenza di una lesione dentinale evidente radiograficamente impone la necessità di intervento, mentre in caso di mancata individuazione della stessa potrebbe essere più indicato un trattamento di prevenzione in attesa di una successiva rivalutazione a distanza. Da un attento esame di una radiografia interprossimale si possono ricavare molteplici informazioni, tra cui:

- presenza di carie interprossimali e occlusali
- valutazione dei rapporti tra carie e tessuto pulpare
- quantità di dentina residua
- volume della camera pulpare (potere dentinogenetico)
- adattamento marginale dei restauri, presenza di debordamenti
- recidiva cariosa
- tartaro.

Diagnosi di attività

La valutazione dell'attività della lesione cariosa può essere effettuata prevalentemente in base all'analisi del colore e della consistenza del tessuto:

a livello di smalto si possono osservare macchie biancastre, demineralizzate, che sembrerebbero rappresentare delle lesioni attive; oppure zone più scure e brunastre in caso di lesione quiescente o arrestata

a livello di dentina la presenza di un tessuto chiaro, molle e sensibile indicherebbe una lesione attiva, mentre una colorazione più scura e una maggiore durezza accompagnata da insensibilità starebbero ad indicare una lesione a progressione ridotta o arrestata. Nella porzione radicolare avrebbe, secondo alcuni autori, minore importanza la colorazione della dentina, mentre la presenza di tessuto rammollito sarebbe indice certo di lesione attiva.

Tale distinzione in carie attiva o arrestata sembra ancora una volta avere un'importanza relativa dal punto di vista clinico-operativo e non modifica l'approccio rigoroso di completa eliminazione del tessuto patologico.

Diagnosi di rischio carie

I fattori principali del rischio di carie possono essere riassunti nei seguenti tre punti:

- predisposizione dell'ospite (igiene, saliva, fluoro, familiarità)
- presenza di batteri acidogeni
- tipo di alimentazione (carboidrati)

I parametri principali della valutazione del rischio di carie sono:

- DMF (denti cariati, persi e otturati) score
- età e stato di salute orale
- test microbiologici
- flusso salivare e potere tampone
- livelli di fluorazione
- igiene orale
- dieta e abitudini alimentari

La valutazione del rischio di carie può essere suddivisa in tre fasi principali: anamnesi, esame clinico e test microbiologici salivari. ⁶⁵

2.3.5 Terapia

La carie dentale è una patologia trasmissibile ad origine batterica ed eliminare fisicamente una lesione per sostituirla con un restauro non elimina i batteri né blocca la progressione cariosa nel resto della bocca e ai margini del restauro appena eseguito. ⁸⁰

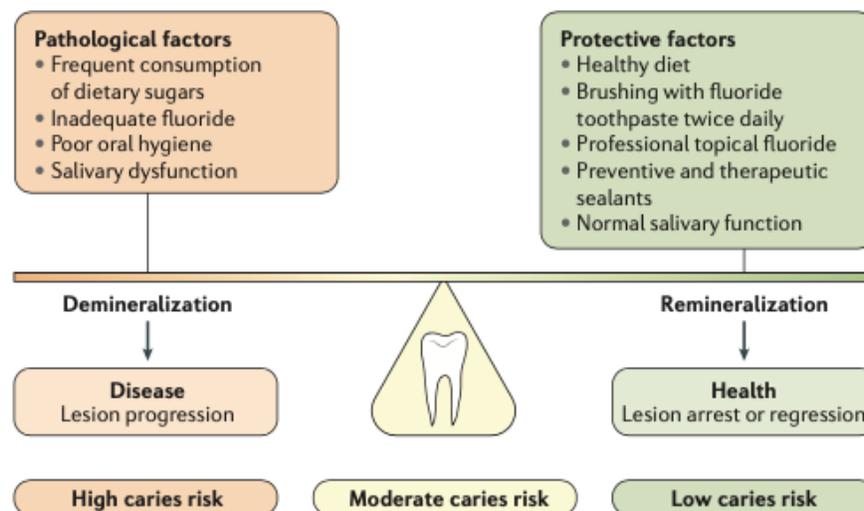
L'attuale raccomandazione è di implementare un modello medico basato sulla valutazione del rischio chiamato CAMBRA (gestione della carie mediante valutazione del rischio) per diagnosticare e trattare la carie dentale che consta di tre principali step: valutazione, diagnosi e prescrizione. ⁸¹

2.3.6 Prevenzione

La carie è ad oggi anche intesa come una “patologia comportamentale a partecipazione batterica”, identificando nel comportamento dell’ospite il *primum movens* responsabile della creazione di un ambiente ideale all’insediamento del biofilm

cariogeno. La trasmissione dei ceppi batterici cariogeni (tipicamente ad opera dei genitori o di altri bambini) trova la sua massima significatività nei primi mesi-anni di vita del paziente: l'oggetto principe della prevenzione della carie dovrebbe infatti risiedere nell'evitare, rendere poco probabile o rimandare il più possibile tale evento, in un contesto di acquisita educazione comportamentale ed alimentare da parte dei genitori.

Sono state descritte anche delle condizioni note come “determinanti a monte” che, pur non essendo direttamente connesse all'ambiente orale, hanno dimostrato di essere correlate ad un'aumentata probabilità di incorrere nella patologia cariosa. Tali condizioni sono: il basso status socio-economico, il basso livello culturale, la presenza di condizioni o malattie debilitanti o influenti a livello orale, la necessità di utilizzo di determinati farmaci, la difficile raggiungibilità dei luoghi di cura.⁸² Come rappresentato in Figura bisogna promuovere comportamenti che favoriscano la remineralizzazione ed un cambio di direzione da lesione dinamicamente attiva ad arresto della lesione e salute.



Il fallimento di tale programma – ossia di un’attenta igiene orale domiciliare del paziente, una corretta istruzione e motivazione dal professionista al paziente, un corretto stile di vita (in particolare alimentare) e approcci terapeutici (come la sigillatura dei solchi nei bambini) – costituisce l’innescò di fattori patologici che promuoveranno la demineralizzazione e un cambio direzionale da equilibrio e salute a iniziazione e progressione della malattia.

3. SALUTE ORALE: APPLICAZIONE DEI PROBIOTICI

3.1. Definizione

Padre degli studi sui probiotici fu il premio nobel Metchnikoff che già all'inizio del XX secolo, mediante studi effettuati su microrganismi responsabili del processo di fermentazione, correlava la composizione e le interazioni microbiota-ospite e salute generale. La definizione di “probiotico” (dal latino *pro* e dal greco *bios*, che significa letteralmente “per la vita”) più recente ed utilizzata risale al 2001 ed è stata elaborata dalla Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e dalla World Health Organization (WHO) secondo le quali i probiotici sono “microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio per la salute dell'ospite” (FAO/WHO, 2006; Hill et al., 2014).⁸³ È stato dimostrato che questi microrganismi sono in grado, grazie a una grande varietà di meccanismi ben documentati, di bloccare dei siti di adesione dei patogeni, stabilizzare la flora microbica e regolare il sistema immunitario.⁸⁴ Alfred Nissle, un medico tedesco, isolò un ceppo di *Escherichia coli* nel 1917, che rimane un probiotico comunemente usato; durante la prima guerra mondiale, quando furono descritti anche i primi microrganismi eucarioti intestinali e batteriofagi, Nissle notò che un soldato non soccombette alla dissenteria e pensò di avere un microrganismo protettivo per lo intestino. Dopo aver isolato il ceppo dimostrò che questi

antagonizzava altri patogeni, stabilendo il concetto di resistenza alla colonizzazione, in base al quale i microrganismi associati all'uomo impediscono l'insediamento di agenti patogeni nella stessa nicchia.⁸

Secondo le *Linee guida su probiotici e prebiotici* (revisione marzo 2018) del Ministero della Salute, il termine probiotico è riservato a quei microrganismi che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità, di esercitare funzioni benefiche per l'organismo. Inoltre, la revisione indica i requisiti che devono essere soddisfatti affinché specifici microrganismi possano essere impiegati negli alimenti e negli integratori alimentari:

- a) essere usati tradizionalmente per integrare la microflora (microbiota) intestinale dell'uomo;
- b) essere considerati sicuri per l'impiego nell'uomo (un utile riferimento a tal fine è rappresentato dai criteri definiti dall'EFSA sullo status di "QPS" ("Presunzione Qualificata di Sicurezza")).
I microrganismi utilizzati per la produzione di alimenti non devono essere portatori di antibiotico-resistenza acquisita e/o trasmissibile;
- c) essere attivi a livello intestinale in quantità che consenta di moltiplicarsi in tale sede.

Ad ogni ceppo corrisponde una quantità precisa di assunzione, motivo per il quale la quantità delle cellule vive presenti nel prodotto deve essere riportata in etichetta per ogni ceppo e deve essere garantita, con le modalità di conservazione suggerite, fino al termine della shelf-life.

Le linee guida, in accordo con quanto stabilito dall'EFSA ⁸⁵, rimarcano anche l'importanza sia dell'accertamento tassonomico dei probiotici, necessario per garantirne la sicurezza, sia della loro deposizione presso collezioni internazionali. Ogni ceppo probiotico è identificato dal genere, dalla specie, dalla sottospecie (se applicabile) e da una designazione alfanumerica che individua un ceppo specifico.

Le *Linee guida su probiotici e prebiotici* del Ministero della Salute (revisione marzo 2018) fanno riferimento al documento FAO Technical meeting on prebiotics (Pineiro et al., 2008 ⁸⁶) dove il termine “prebiotico” è definito come segue: *“Un prebiotico è un costituente degli alimenti non vitale che conferisce un beneficio alla salute mediante una modulazione del microbiota”*.

La definizione di prebiotico è riservata, quindi, alle sostanze non digeribili di origine alimentare che, assunte in quantità adeguata, favoriscono selettivamente la crescita e l'attività di uno o più batteri già presenti nel tratto intestinale o assunti insieme al prebiotico stesso. Inoltre, le sostanze impiegate come prebiotici devono soddisfare i seguenti requisiti:

- essere sicure per l'uomo sulla base di un uso tradizionale;
- essere presenti nell'assunzione giornaliera in quantità plausibili per svolgere un effetto “prebiotico” secondo le evidenze scientifiche disponibili.

Tra i costituenti impiegabili come prebiotici la revisione riporta, per esempio, l'inulina, i frutto-oligosaccaridi (FOS) e i galatto-

oligosaccaridi (GOS), che hanno mostrato attività bifidogenica. Da un punto di vista scientifico tale definizione, adottata dal Ministero della Salute, è stata criticata perché considerata troppo generica. Gibson e colleghi (2010) hanno definito la categoria più ristretta di “prebiotico dietetico” come *“un ingrediente fermentato selettivamente che provoca cambiamenti specifici nella composizione e/o nell’attività del microbiota gastrointestinale, conferendo benefici alla salute dell’ospite* (definizione accettata dalla World Gastroenterology Organisation).⁸⁷ La definizione è stata poi ulteriormente aggiornata (Gibson et al., 2017) come *“substrato utilizzato selettivamente dai microrganismi dell’ospite, conferendo un beneficio per la salute”*.⁸⁸

3.2. Meccanismi d’azione

Sin dalle scoperte di Metchnikoff, vari studi hanno confermato l’impatto positivo di diversi ceppi probiotici sullo stato di salute dell’ospite.^{9, 89, 12.}

I probiotici, infatti, possono:

- modulare la risposta immunitaria prevenendo la crescita eccessiva di batteri patogeni e aumentando la resistenza dell’intestino alla loro invasione;
- migliorare i processi patologici inducendo la secrezione di fattori solubili o la produzione di SCFA.

Ad oggi, il meccanismo attraverso il quale i probiotici esercitano le loro azioni benefiche nell’uomo è noto solo parzialmente e i meccanismi molecolari esatti rimangono in gran parte oscuri.

La corretta identificazione dei ceppi probiotici è importante in quanto alcuni di questi manifestano proprietà uniche ed effetti ceppo-specifici. Un campo di studio emergente nell'ambito dei probiotici riguarda i meccanismi d'azione che sono diffusi e condivisi tra diversi ceppi, specie o persino generi.⁹⁰

Tra i meccanismi d'azione:

- *più diffusi* vi sono l'esclusione competitiva di agenti patogeni, la normalizzazione del microbiota alterato, la produzione di SCFA, la regolazione del transito intestinale;
- *più frequenti* vi sono la sintesi vitaminica, il metabolismo dei sali biliari, il potenziamento della barriera intestinale;
- *ceppo-specifici* vi sono la produzione di specifiche sostanze bioattive ed effetti a livello endocrinologico e neurologico.

Considerando i probiotici più comunemente utilizzati, i Bifidobatteri e i Lattobacilli, alcuni meccanismi d'azione fondamentali affinché questi possano svolgere le loro più comuni funzioni si basano su vie metaboliche condivise e aspetti strutturali tipici dei batteri gram-positivi. Da un punto di vista metabolico il genere *Bifidobacterium* condivide un pathway centrale noto come *Bifidobacterium shunt*, mentre il genere *Lactobacillus* condivide la capacità di trarre energia prevalentemente attraverso la fermentazione lattica degli zuccheri.⁹¹

⁹² ⁹³

Il pathway *Bifidobacterium shunt*, oltre a produrre una maggiore quantità di energia rispetto ad altre vie metaboliche più classiche, genera SCFA come prodotti finali, in particolare lattato e acetato che

possono esercitare una vasta gamma di effetti positivi sul tratto gastrointestinale umano, direttamente o mediante conversione in butirrato da parte di altri membri del microbiota (O' Callaghan et al., 2016).

Considerando il ruolo svolto dai probiotici nella modulazione della risposta immunitaria, questa può avvenire non solo attraverso il sistema immunitario innato e adattivo ma anche attraverso:

- la regolazione della permeabilità dell'epitelio intestinale;
- la stimolazione della secrezione di muco;
- la competizione all'interno dell'ecosistema batterico mediante la secrezione di composti antimicrobici.

Quindi, i probiotici possono modulare la risposta immunitaria prevenendo la crescita eccessiva di batteri patogeni e aumentando la resistenza dell'intestino alla loro invasione, e migliorare i processi patologici inducendo la secrezione di fattori solubili o la produzione di acidi grassi a catena corta.

I prebiotici, invece, non sono le uniche sostanze che possono influenzare il microambiente intestinale, ma è proprio il loro utilizzo selettivo e ottimale per stimolare la crescita della microflora benefica che li differenzia da altri ingredienti e composti alimentari non digeriti, come antibiotici, minerali e vitamine. Tra le caratteristiche chiave di un prebiotico vi sono la non digeribilità dell'ospite e la capacità di rappresentare un substrato fermentabile per il microbiota intestinale in modo da portare a benefici luminari o sistemici per la

salute dell'individuo attraverso un'influenza positiva sui microbi benefici.

In generale, tutti i prebiotici appartengono alla categoria delle fibre dietetiche, ma non tutte le fibre sono prebiotiche. I prebiotici sono sostanze dietetiche (principalmente costituite da polisaccaridi non amidacei e oligosaccaridi) per la maggior parte utilizzate come ingredienti alimentari.⁸⁴

La ricerca nel campo del microbiota intestinale e dei probiotici è progredita considerevolmente negli ultimi due decenni, con sviluppi significativi nella selezione e caratterizzazione sia di specifiche colture probiotiche sia dei sostanziali benefici per la salute connessi al loro consumo. I batteri con proprietà probiotiche dichiarate sono disponibili sotto forma di alimenti, capsule, gocce e polveri e come prodotti mono- o multiceppo. I ceppi più comuni presenti in commercio appartengono alle specie *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

3.3. Probiotici: prevenzione e terapia in patologie orali

Alcune nuove strategie per prevenire le malattie orali si basano sulla manipolazione del microbiota orale, fornito dai probiotici.

Attività probiotica e modalità di azione sui patogeni orali totalmente o parzialmente comprovate sono riassunte nella tabella a pagina successiva:

Probiotico	Attività
<i>S. salivarius</i> K12	Antagonismo
<i>L. reuteri</i>	Coaggregazione
<i>S. salivarius</i> K12, M18	Interazione con l'epitelio
<i>L. acidophilus</i> LA-5	Modulazione del biofilm
<i>L. casei</i> LC-11	Riduzione del potenziale del biofilm cariogeno
<i>L. paracasei</i>	Gestione della carie
<i>Lactobacilli</i> sp	Controllo parodontale
<i>Bifidobacterium</i> sp	Gestione della gengivite
<i>L. rhamnosus</i> GG	Modulazione della risposta immunitaria
<i>Bifidobacterium</i>	Resistenza migliorata
<i>Animalis subsp. lacis</i>	alle infezioni orali

94

3.3.1. Probiotici e Parodontite

La malattia parodontale è uno dei problemi di salute tra i più diffusi e importanti in tutto il mondo. Il trattamento di questa malattia può richiedere l'uso sistemico di farmaci antimicrobici che innescano effetti collaterali gastrointestinali dovuti ad antibiotici ad ampio spettro ⁹⁵, resistenza batterica e reazioni allergiche ⁹⁶. Per questo molti autori hanno proposto terapie alternative che possono offrire risultati soddisfacenti senza causare potenziali rischi al paziente ⁹⁷.

Studi clinici hanno dimostrato che i probiotici, quando associati al trattamento parodontale convenzionale, possono migliorare la disbiosi microbica e produrre un miglioramento significativo degli indicatori clinici di malattia. Dagli studi si evince tuttavia che i probiotici estrinseci raramente si affermano nel cavo orale ma, sebbene transitori, la loro presenza può influenzare la ricolonizzazione a favore di specie benefiche dopo una totale disinfezione della bocca. La prevenzione delle malattie legate alla placca normalmente comporta il controllo aspecifico della placca dentale in quanto questo è il fattore scatenante; questo viene effettuato per mantenere i livelli di placca dentale compatibili con la

salute e quindi prevenire la rottura dell'omeostasi microbica (disbiosi) concomitante con il rischio di malattia. Tuttavia, la risposta individuale dell'ospite e altri fattori concomitanti possono influenzare l'inizio e la progressione della malattia.

Con la sempre crescente resistenza agli antibiotici e il desiderio del pubblico in generale di terapie più "naturali", è necessario ridurre al minimo l'uso di antibiotici e sviluppare nuovi trattamenti per le malattie orali che non coinvolgano agenti antimicrobici convenzionali; sono stati pertanto proposti approcci preventivi basati sul ripristino dell'equilibrio ecologico microbico, piuttosto che sull'eliminazione delle specie associate alla malattia ⁹⁸. Un probiotico che potrebbe alterare l'ecologia microbica orale può essere uno strumento utile nella gestione clinica della parodontite, con il potenziale di offrire vantaggi duplici ⁹⁹:

- per combattere la disbiosi mediante l'inibizione competitiva dei patogeni parodontali e quindi riducendo l'immunogenicità complessiva del microbiota orale;
- per modulare le vie immunitarie / infiammatorie associate alla malattia attiva, per ridurre l'infiammazione distruttiva della parodontite e portare all'omeostasi immunitaria che potrebbe essere mantenuta dall'ospite a lungo termine.

Studi clinici sull'uomo che hanno esplorato il trattamento delle malattie parodontali utilizzando la terapia probiotica senza l'ausilio di misure di trattamento clinico, hanno riportato benefici complessivi come la riduzione del sanguinamento gengivale e la profondità del

sondaggio. Tuttavia, gli studi che hanno coinvolto i probiotici in aggiunta al trattamento clinico parodontale riportano un miglioramento più marcato dello stato clinico dei pazienti rispetto al solo trattamento clinico. Questa potrebbe essere una strada importante per i probiotici come sostituti degli antibiotici nel trattamento parodontale per aiutare a ridurre il carico complessivo della resistenza agli antibiotici. Nonostante l'eterogeneità esistente negli studi clinici che hanno esaminato l'uso dei probiotici nella gestione della gengivite o della parodontite, le meta-analisi in letteratura hanno trovato un supporto generale per l'uso dei probiotici¹⁰⁰. Tuttavia, ci sono diversi aspetti della terapia probiotica che devono essere meglio compresi prima che possa essere raccomandato l'uso di routine nella gestione di gengiviti e parodontiti. Questi includono:

- durata e modalità del trattamento per impedire al microbiota parodontale di tornare a un'ecologia disbiotica al termine del trattamento;
- caratterizzare i possibili effetti cariogeni in vivo dei ceppi probiotici che possono manifestarsi durante il periodo di trattamento;
- chiarire i possibili rischi sistemici della somministrazione di ceppi probiotici a soggetti con patologie sistemiche che comportano una soppressione immunitaria da lieve a moderata.

Quando si selezionano le specie probiotiche adatte, è necessario considerare il normale habitat orale e l'associazione con la salute.

La maggior parte degli studi che indagano il ruolo dei probiotici nel modificare l'ecologia microbica nel parodonto in vivo hanno tentato di misurare specie microbiche specifiche considerate "parodontopatogene" o microrganismi chiave nello sviluppo del biofilm orale. In uno studio che ha utilizzato losanghe contenenti ceppi di *Lactobacillus reuteri* in aggiunta al trattamento di scaling e root planing in soggetti con parodontite cronica, sono state evidenziate significative riduzioni nell'abbondanza di *Porphyromonas gingivalis*. Alla dodicesima settimana, tutti i parametri clinici erano significativamente ridotti in entrambi i gruppi (gruppo 1: SRP+probiotico e gruppo 2: SRP+placebo), c'era una riduzione della profondità della tasca significativamente maggiore ($p < 0,05$) e guadagno di attacco ($p < 0,05$) in tasche moderate e profonde; in aggiunta e differentemente dal gruppo con solo SRP, nel gruppo SRP + probiotico è stata osservata una riduzione di *Porphyromonas gingivalis* ¹⁰¹. I ceppi probiotici streptococcici valutati come coadiuvanti nel trattamento clinico della parodontite cronica hanno mostrato una riduzione significativa dei punteggi della placca, oltre a riduzioni di *Tannerella forsythia* e *Prevotella intermedia* rispettivamente nella placca sopragengivale e nella saliva. In una cultura microbiologica della placca sottogengivale di una bocca trattata con *L. reuteri* in aggiunta al trattamento convenzionale nei pazienti con parodontite cronica ha mostrato riduzioni di *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* ¹⁰².

Il trattamento probiotico della gengivite in aggiunta alla rimozione meccanica professionale della placca ha anche mostrato significative riduzioni dei principali parodontopatogeni, ossia ancora una volta *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythia* nella placca sottogengivale rispetto al placebo. In uno studio che ha esaminato il consumo del probiotico *L. reuteri* due volte al giorno per 3 settimane in aggiunta al trattamento clinico della parodontite cronica, è stata osservata una riduzione significativa della proporzione di anaerobi obbligati nella placca sottogengivale fino a 21 settimane dopo la fine del decorso probiotico rispetto al placebo, con un ritorno ai livelli basali al follow-up di 1 anno ¹⁰³. Queste osservazioni suggeriscono che mentre i probiotici attualmente disponibili possono alterare l'ecologia microbica parodontale e tendere verso un'ecologia più associata alla salute durante il trattamento della gengivite o della parodontite, questo effetto non viene mantenuto dall'ospite a lungo termine. È stato suggerito che ciò potrebbe essere dovuto alla bassa persistenza di questi ceppi probiotici nel cavo orale, poiché la maggior parte di quelli utilizzati non sono isolati nella cavità orale e quelli attualmente in uso come probiotici sono loro stessi taxa rari e quindi più suscettibili alle fluttuazioni dell'ambiente orale ^{98, 104}.

3.3.2. Probiotici e Candidosi

La candidosi orale (OC) è un problema di salute pubblica in aumento a causa dell'introduzione di nuovi farmaci, dell'invecchiamento della popolazione e della crescente prevalenza di malattie croniche. L'incidenza di OC è cresciuta negli ultimi decenni, a causa

dell'aumento di alcune malattie croniche immuno-correlate (diabete, cancro, virus dell'immunodeficienza umana (HIV)) e dell'uso intensivo di alcuni farmaci, come antibiotici, chemioterapici e immunosoppressori ¹⁰⁵.

Alcuni dei principali fattori che contribuiscono allo sviluppo della candidosi orale (OC) sono:

Fattori iatrogeni

- Agenti antineoplastici ¹⁰⁵
- Antibiotici ad ampio spettro ¹⁰⁶
- Inalatori corticosteroidi ¹⁰⁷
- Abuso di sostanze ^{108 109}

Condizioni di salute

- Anemia ¹¹⁰
- Stato di immunosoppressione ¹¹¹
- Carenze nutrizionali ¹⁰⁶
- Xerostomia ¹¹⁰

Patologie

- Cancro ¹¹²
- Sindrome di Cushing ¹⁰⁶
- Diabete mellito ¹¹³
- Virus dell'immunodeficienza umana (HIV) ¹¹⁴

Altri fattori

- Età ¹¹⁰
- Indossare protesi dentali ¹¹²
- Gravidanza ¹¹⁵

- Fumo di sigaretta ¹⁰⁹

A volte, l'infezione superficiale può diffondersi nel corpo, nel flusso sanguigno, provocando una candidosi profonda e invasiva, che è associata ad un alto tasso di ospedalizzazione e persino alla mortalità. I trattamenti farmacologici disponibili (es. farmaci antifungini) sono molto efficaci ma presentano alcune criticità, come i frequenti effetti collaterali e, in particolare, la resistenza antifungina. Pertanto, sembrerebbe fondamentale sviluppare nuove strategie terapeutiche profilattiche e complementari. L'assunzione di probiotici sembra un metodo promettente per raggiungere questi scopi. Possono infatti modulare il microbiota intestinale e il suo cross-talk con la risposta immunitaria, con recidive locali (intestinali) e sistemiche. Molti studi hanno dimostrato che i probiotici rappresentano un efficace trattamento alternativo contro infezioni da *Candida spp.* Inoltre, i probiotici sono facili da usare e, quindi, sono generalmente ben accettati dai pazienti ¹¹⁶.

Una meta-analisi su 12 studi selezionati ha evidenziato che i probiotici svolgono un ruolo protettivo nell'infezione da *Candida* e soprattutto nella colonizzazione. Le proprietà anti-*Candida* possono essere spiegate in diversi modi, come

a) attraverso la co-aggregazione, la modifica del pH orale e la produzione di H₂O₂ ¹¹⁷,

b) attraverso il rilascio di elevate quantità di acido lattico (Denkova et al., “in vitro inhibitory activity of Bifidobacterium and Lactobacillus strains against *Candida albicans*”) e

c) attraverso la completa inibizione dei biofilm fungini ^{118 119}.

Tuttavia, questi effetti positivi sono fortemente legati al metodo di somministrazione, al dosaggio e ai ceppi probiotici utilizzati.

L'effetto di questi prodotti sulla candidosi orale deve essere studiato meglio per scoprire nuovi effetti antifungini. Infatti, alcuni studi hanno dimostrato che la combinazione di probiotici e prebiotici (simbiotici) può essere molto efficace nelle infezioni. ¹²⁰

Per la cura della OC sono stati studiati probiotici come *Lactobacillus plantarum*, *Fermentum L23*, *Pentosus*. I batteri lattici producono batteriocine, sostanze antimicrobiche proteiche con pesi molecolari di diverse migliaia di dalton o più. Le batteriocine possono essere suddivise in cinque classi in base alla loro struttura primaria, composizione molecolare e proprietà (Chen e Hoover, 2003; Pascual et al., 2008). La batteriocina L23 prodotta da *Lactobacillus fermentum L23* (Pascual et al., 2008), la plantaricina prodotta da *L. plantarum* (Sharma e Srivastava, 2014) e la pentocina TV35b prodotta da *L. pentosus* (Okkers et al., 1999) sembrano essere efficaci contro la forma di lievito di *Candida*. ¹²¹

Lactobacillus reuteri è un batterio promettente (soprattutto DSM 17938 e ATCC PTA 5289) per le sue proprietà anti-*Candida*, confermate da diversi studi. In uno di questi, *Lactobacillus reuteri* ha dimostrato di essere in grado di ridurre la carica di *Candida* in vivo attraverso la co-aggregazione, la modifica del pH orale con produzione di acido lattico e altri acidi organici che inibiscono la virulenza delle cellule di *Candida* e la produzione di H₂O₂ ¹¹⁷.

In un recente studio in vitro di Coman et al. (2014), i ceppi *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 e *Lactobacillus paracasei* IMC 502, da soli o in combinazione, hanno mostrato un effetto inibitorio sulla crescita di *Candida spp*¹²².

Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus B1 e *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* TAB2 sono stati trovati per combattere la *Candida*, rilasciando elevate quantità di acido lattico (Denkova et al.).

Recentemente, è stato scoperto che *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *Lactobacillus reuteri* RC-14 modulano la virulenza della *Candida glabrata*, attraverso la completa inibizione dei biofilm fungini¹¹⁸.

Inoltre, è stato riscontrato che *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inibisce la formazione di biofilm di funghi attraverso esperimenti in vitro¹¹⁹. La formazione di biofilm è probabilmente ridotta attraverso la produzione di sostanze chiamate "batteriocine" dai probiotici. Wannun et al. hanno riportato l'isolamento di una batteriocina, chiamata "fermencina SD11", da *Lactobacillus fermentum* SD11, un *Lactobacillus* orale umano, che ha un forte effetto inibitorio sulle cellule di *Candida* orale¹²³.

Nel 1997, Wagner et al. hanno dimostrato che la somministrazione di probiotici potrebbe essere una strategia profilattica e terapeutica per la candidosi delle mucose¹²⁴. Hanno dimostrato che la presenza di quattro ceppi di batteri (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei* GG e *Bifidobacterium animalis*) nel tratto gastrointestinale di topi immunodeficienti ha ridotto il numero

di cellule di *Candida albicans*, nonché l'incidenza e la gravità della candidosi mucosa e sistemica, prolungandone la sopravvivenza ¹²⁴.

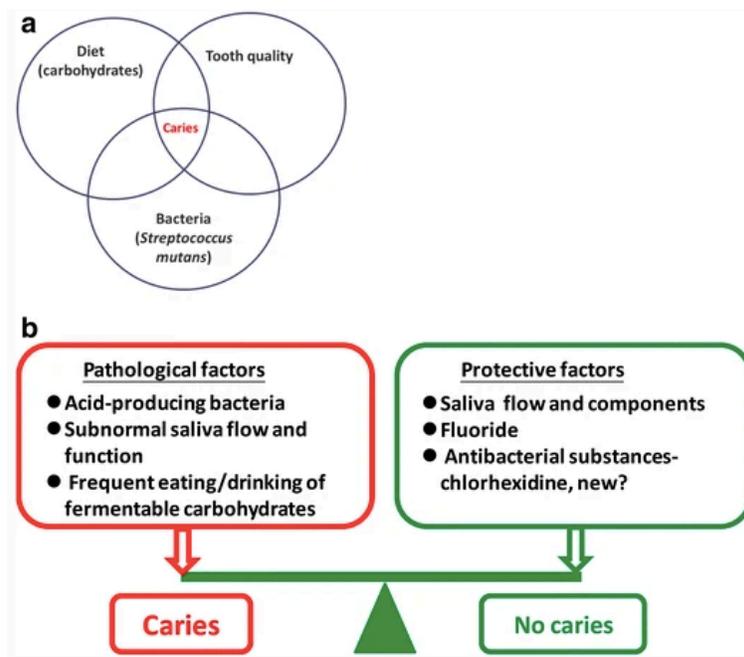
In uno studio, Matsubara et al. hanno inoculato *Candida albicans* nella cavità orale e successivamente somministrato un farmaco antimicotico (nistatina) o probiotici (*Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*); alla fine dell'esperimento, la colonizzazione da parte delle cellule di lievito era inferiore nel gruppo che riceveva probiotici (in particolare *L. rhamnosus*) rispetto al gruppo trattato con nistatina ¹²⁵.

In conclusione, anche se il meccanismo dell'effetto antifungino dei probiotici resta da chiarire completamente, alcuni autori lo hanno esplorato in studi in vitro e in vivo, dimostrando che questi batteri possono contrastare infezioni da *Candida spp.* attraverso meccanismi d'azione differenti e sinergici. ¹²⁰

3.3.3. Probiotici e Carie

Il frequente metabolismo degli zuccheri da parte del microbiota orale porta all'acidificazione dell'ecosistema, alla riduzione della diversità microbica e alla flessibilità funzionale e al miglioramento della proporzione di taxa microbici altamente produttori e tolleranti agli acidi [Kilian et al., 2016; Marsh, 2017]. Gli sforzi per recuperare il sano equilibrio da questo stato disbiotico associato alla carie utilizzando gli attuali approcci antimicrobici ad ampio spettro non si sono dimostrati efficaci [Liu et al., 2018]. Un altro modo per trattare o prevenire la disbiosi microbica correlata alla carie potrebbe essere il miglioramento della crescita e della sopravvivenza del microbiota

orale associato alla salute [Tvetman, 2018]. Esistono prove da più studi che l'arginina prebiotica può inibire lo sviluppo della carie e gli integratori probiotici sembrano ridurre l'incidenza della carie nei bambini in età prescolare e negli scolari con un alto rischio di carie. A causa dei problemi di ricerca etica per l'arginina e del rischio di bias sia per gli studi pre e probiotici, la fiducia nella stima dell'effetto è limitata. Sono necessari ulteriori studi per acquisire una migliore conoscenza degli integratori pre e probiotici e per confermare che il loro uso è vantaggioso ed economico nella cura della carie. La combinazione di arginina prebiotica con probiotici arginolitici può essere un futuro simbiotico per la prevenzione e la gestione della carie dentale.¹²⁶



Nell'immagine si vedono i fattori implicati nello sviluppo della carie e l'equilibrio tra fattori patologici e fattori protettivi. In **a** si vede che la carie dentale è una malattia orale multifattoriale infettiva causata principalmente dalla complessa interazione della flora orale

cariogena (biofilm) con i carboidrati dietetici fermentabili sulla superficie del dente nel tempo (Keyes e Jordan 1964) e in **b** l'equilibrio della carie dove il processo carioso è riconosciuto come un equilibrio tra fattori patologici e fattori protettivi nel processo della carie dentale (Featherstone et al. 2003).

Tra la flora orale, *Streptococcus salivarius*, *S. sanguis*, *S. mitis* e *S. mutans* sono le specie più frequentemente isolate dalla cavità orale (Aas et al. 2005). *S. mutans*, un batterio indigeno della bocca, è uno dei fattori contribuenti l'attivazione della carie negli esseri umani.

Questo microrganismo cariogeno mostra la capacità di colonizzare i denti, ridurre il pH nella cavità orale e sintetizzare l'EPS dal saccarosio (Koo et al. 2010). I *Lattobacilli* probiotici sono stati confermati come co-aggregati con *S. mutans* e altri ceppi carie-associati e inibiscono la crescita di *S. mutans* (Hasslöf et al. 2010; Lodi et al. 2010). Gli effetti battericidi e batteriostatici dei *Lattobacilli* probiotici sono attribuibili alla loro produzione di agenti antimicrobici come acidi organici, perossido di idrogeno e composti antifungini come acidi grassi e batteriocine (Tvetman et al. 2009).

Recentemente, numerosi studi si sono concentrati sull'effetto dei probiotici sulla salute orale. Studi in vitro hanno dimostrato che vari ceppi probiotici possono sopravvivere nella saliva umana (Hasslöf et al. 2010). Lodi et al. (2010) hanno osservato l'effetto di due bevande a base di latte fermentato, Yakult e Batavito, e una soluzione di saccarosio al 20% sullo sviluppo della carie nei volontari. È stato raccolto il biofilm dentale e sono stati analizzati la concentrazione

ionica, l'EPS insolubile e il grado di perdita di minerali. I risultati hanno indicato che la somministrazione giornaliera delle bevande ha diminuito il valore del pH del biofilm dentale e ha ridotto la demineralizzazione dello smalto (Lodi et al. 2010). Chuang et al. (2011) hanno riportato che il probiotico *L. paracasei GMNL-33* può ridurre la conta microbica salivare associata alla carie negli adulti sani, come evidenziato dai risultati di uno studio in doppio cieco, randomizzato e controllato con placebo su 78 soggetti. I risultati hanno mostrato una significativa riduzione della conta di *S. mutans* salivare. La somministrazione orale di *L. paracasei GMNL-33* nel corso di un periodo di 2 settimane è stato efficace contro la crescita di *S. mutans* (Chuang et al. 2011). Yakult è una famosa bevanda probiotica composta da una singola specie batterica viva, *Lactobacillus casei Shirota*; Lin et al. (2017) hanno analizzato i potenziali effetti cariogeni / cariostatici dell'assunzione di Yakult nei bambini studiando gli effetti dell'assunzione a breve termine sull'acidogenicità del biofilm orale e sulla conta batterica cariogena. L'assunzione di probiotici ha determinato un significativo aumento del valore di pH (Lin et al. 2017). Questi risultati indicano che l'assunzione di Yakult è utile nel promuovere la salute orale; tuttavia, questi risultati devono essere supportati da ulteriori studi.¹²⁷

Uno dei microrganismi probiotici più studiati è *Lactobacillus rhamnosus GG (LGG)*; inizialmente isolato dall'intestino umano sano nel 1983 (Gorbach, 1996). LGG sopravvive al pH dello stomaco e agli acidi biliari nel duodeno. Uno studio che ne ha studiato la

colonizzazione all'interno della cavità orale ha concluso la sua improbabilità nella maggior parte dei casi ma non in tutti (Yliknuuttila et al., 2006). *Lactobacillus rhamnosus GG* non fermenta il saccarosio o il lattosio e ha mostrato una riduzione significativa del rischio di carie (Meurman et al., 1995; Näse et al., 2001). È stata dimostrata anche la sua attività anti-infiammatoria in vivo (Lin et al., 2009). Considerando la sua non-cariogenicità e le sue proprietà anti-infiammatorie, LGG potrebbe rivelarsi essere un buon candidato per il trattamento probiotico di patologie orali ¹²⁸.

Il ceppo probiotico *Lactobacillus rhamnosus* per molti anni è stato utilizzato nei prodotti nutraceutici evidenziando vari benefici per la salute. Recentemente è stato dimostrato che la somministrazione di *Lactobacillus rhamnosus SPI* durante la prima infanzia può portare ad una riduzione dell'incidenza di carie dentale. Studi precedenti nei paesi nordici hanno dimostrato un'attività antagonista di *Lactobacillus rhamnosus* contro i batteri cariogeni con conseguente diminuzione della carie dentale nei bambini in età prescolare e la riduzione del rischio di carie ^{129 130 131 132}.

Un gruppo del Dipartimento di Odontoiatria dell'Università del Cile a Santiago ha studiato l'utilizzo di *Lactobacillus rhamnosus SPI* (prodotto da Sacco S.r.l.) ed i suoi effetti sul miglioramento della salute dentale in un gruppo di bambini in età prescolare (compresa tra due o tre anni) residenti in Cile. Lo studio effettuato ¹³³ ha coinvolto 205 bambini maggiormente esposti ad un rischio di carie dentale; 123 bambini hanno bevuto latte con *Lactobacillus*

rhamnosus SP 1, gli altri 82 bambini hanno bevuto un latte contenente un placebo.

Durante la permanenza negli asili nei giorni infra-settimanali ai bambini è stato somministrato latte prodotto con latte in polvere parzialmente scremato disciolto e pertanto adatto per l'aggiunta del *Lactobacillus rhamnosus SP 1*; in parallelo è stato anche somministrato il latte placebo, consumato nello stesso modo, come merenda pomeridiana (150 ml di latte). Il latte veniva addizionato con 1,5 miliardi di fermenti lattici vivi utilizzando una cultura liofilizzata in polvere di *L. rhamnosus SPI*. Il periodo di test è durato 10 mesi.

Il disegno sperimentale era randomizzato, triplo-cieco, controllato con placebo, e a bracci paralleli. Sono stati utilizzati i criteri internazionali ICDAS per la rilevazione visiva e tattile delle lesioni delle carie dentali e per descrivere la gravità delle lesioni. I bambini sono stati analizzati all'inizio e al termine dello studio.

Le osservazioni hanno mostrato una presenza leggermente inferiore, ma comunque significativa, di carie nel gruppo che aveva ricevuto *L. rhamnosus SP 1* (54,4%) rispetto al gruppo di controllo (65,8%).

Un altro aspetto che è stato rivelato è che, dopo altri due mesi senza ulteriore somministrazione di *L. rhamnosus SP 1* (in totale 12 mesi dopo l'inizio del test), le lesioni cariose nei bambini che avevano bevuto il latte con l'aggiunta di *L. rhamnosus SP 1* erano significativamente più basse (9,7%) rispetto al gruppo di controllo (24,3%), dimostrando che la probabilità di manifestare lesioni dentali

derivate da carie durante il periodo successivo alla somministrazione del batterio era notevolmente diminuita.

La modalità di azione potrebbe essere legata al fatto che *L.rhamnosus SP 1* interagisce con il biofilm orale cambiandone la composizione a favore di batteri che producono meno acidi organici, permettendo un migliore equilibrio tra il pH della saliva e quello della placca. Questo studio ha inoltre evidenziato un'influenza positiva anche dopo due mesi senza ulteriore assunzione di batteri probiotici; altri studi effettuati con *Lattobacilli* probiotici hanno dimostrato che erano solo transitoriamente presenti nella saliva, e quindi, un apporto giornaliero può essere raccomandato per limitare la crescita di carie dentale nei bambini in età prescolare.

4. CONCLUSIONI

I probiotici hanno un potenziale nella gestione delle malattie multifattoriali come le patologie orali (in particolare malattia parodontale e carie), affrontando in modo più efficace l'interfaccia ospite-microrganismo per ripristinare l'omeostasi che potrebbe non essere raggiunta con trattamenti convenzionali. La prevenzione delle malattie placca-correlate normalmente coinvolge il controllo aspecifico della placca dentale in quanto questa costituisce il fattore iniziale. Con l'aumento di antibiotico-resistenze si ricerca sempre più un approccio naturale, in particolare si ricercano approcci preventivi basati sul ripristino dell'equilibrio ecologico microbico piuttosto che sull'eliminazione di specie associate alla malattia. Questi includono l'uso di prebiotici per promuovere la crescita batterica associata alla salute o l'uso di probiotici con benefici associati. L'uso associato di probiotici e trattamento parodontale convenzionale possono migliorare la disbiosi microbica e produrre significativi miglioramenti negli indicatori clinici della malattia, tuttavia questo effetto non viene spesso mantenuto dall'ospite dopo la fine dell'assunzione dei probiotici.¹⁰⁴

Sono necessari ulteriori studi clinici randomizzati con periodi di follow-up a lungo termine per confermare la loro efficacia nel ridurre la prevalenza / incidenza delle malattie infettive orali. Inoltre, è necessario il riconoscimento di ceppi specifici con attività probiotica per ogni malattia orale infettiva, al fine di determinare la dose esatta, il tempo di trattamento e i veicoli ideali. ¹³⁴

Attualmente, non esistono prove sostanziali sufficienti per supportare l'uso di probiotici per prevenire, trattare o gestire le malattie del cavo orale. Al momento, l'uso di probiotici non ha causato effetti negativi o un aumento del rischio di carie o malattie parodontali. Ciò non implica alcuna prova forte contro il trattamento con utilizzo di probiotici. ⁹⁴

5. BIBLIOGRAFIA

- (1) Xiao, J.; Fiscella, K. A.; Gill, S. R. Oral Microbiome: Possible Harbinger for Children's Health. *Int. J. Oral Sci.* **2020**, *12*. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0082-x>.
- (2) Nicola Carlone e Raffaello Pompei. Rapporti Microrganismi/Ospite. In *Microbiologia Farmaceutica*; EdiSES.
- (3) Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* **2016**, *14* (8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>.
- (4) Palmer, C.; Bik, E. M.; DiGiulio, D. B.; Relman, D. A.; Brown, P. O. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLOS Biol.* **2007**, *5* (7), e177. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>.
- (5) Rowland, I.; Gibson, G.; Heinken, A.; Scott, K.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K. Gut Microbiota Functions: Metabolism of Nutrients and Other Food Components. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57* (1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1445-8>.
- (6) Enright, E. F.; Gahan, C. G. M.; Joyce, S. A.; Griffin, B. T. The Impact of the Gut Microbiota on Drug Metabolism and Clinical Outcome. *Yale J. Biol. Med.* **2016**, *89* (3), 375–382.
- (7) Savage, D. C. Microbial Biota of the Human Intestine: A Tribute to Some Pioneering Scientists. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2001**, *2* (1), 1–15.
- (8) Pariente, N. A Field Is Born. *Nat. Res.* **2019**. <https://doi.org/10.1038/d42859-019-00006-2>.
- (9) Cremon, C.; Barbaro, M. R.; Ventura, M.; Barbara, G. Pre- and Probiotic Overview. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2018**, *43*, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.010>.
- (10) Barko, P. C.; McMichael, M. A.; Swanson, K. S.; Williams, D. A. The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *J. Vet. Intern. Med.* **2018**, *32* (1), 9–25. <https://doi.org/10.1111/jvim.14875>.
- (11) Hiippala, K.; Jouhten, H.; Ronkainen, A.; Hartikainen, A.; Kainulainen, V.; Jalanka, J.; Satokari, R. The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation. *Nutrients* **2018**, *10* (8). <https://doi.org/10.3390/nu10080988>.
- (12) La Fata, G.; Weber, P.; Mohajeri, M. H. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2018**, *10* (1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9322-6>.
- (13) Sivaprakasam, S.; Prasad, P. D.; Singh, N. Benefits of Short-Chain Fatty Acids and Their Receptors in Inflammation and Carcinogenesis. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *164*, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.007>.

- (14) Rizzetto, L.; Fava, F.; Tuohy, K. M.; Selmi, C. Connecting the Immune System, Systemic Chronic Inflammation and the Gut Microbiome: The Role of Sex. *J. Autoimmun.* **2018**, *92*, 12–34. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.05.008>.
- (15) Moresco, E. M. Y.; LaVine, D.; Beutler, B. Toll-like Receptors. *Curr. Biol. CB* **2011**, *21* (13), R488-493. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.039>.
- (16) de Oliveira, G. L. V.; Leite, A. Z.; Higuchi, B. S.; Gonzaga, M. I.; Mariano, V. S. Intestinal Dysbiosis and Probiotic Applications in Autoimmune Diseases. *Immunology* **2017**, *152* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1111/imm.12765>.
- (17) Pelaseyed, T.; Bergström, J. H.; Gustafsson, J. K.; Ermund, A.; Birchenough, G. M. H.; Schütte, A.; van der Post, S.; Svensson, F.; Rodríguez-Piñeiro, A. M.; Nyström, E. E. L.; Wising, C.; Johansson, M. E. V.; Hansson, G. C. The Mucus and Mucins of the Goblet Cells and Enterocytes Provide the First Defense Line of the Gastrointestinal Tract and Interact with the Immune System. *Immunol. Rev.* **2014**, *260* (1), 8–20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>.
- (18) Browne, H. P.; Forster, S. C.; Anonye, B. O.; Kumar, N.; Neville, B. A.; Stares, M. D.; Goulding, D.; Lawley, T. D. Culturing of ‘Unculturable’ Human Microbiota Reveals Novel Taxa and Extensive Sporulation. *Nature* **2016**, *533* (7604), 543–546. <https://doi.org/10.1038/nature17645>.
- (19) Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D. R.; Fernandes, G. R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.-M.; Bertalan, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Fernandez, L.; Gautier, L.; Hansen, T.; Hattori, M.; Hayashi, T.; Kleerebezem, M.; Kurokawa, K.; Leclerc, M.; Levenez, F.; Manichanh, C.; Nielsen, H. B.; Nielsen, T.; Pons, N.; Poulain, J.; Qin, J.; Sicheritz-Ponten, T.; Tims, S.; Torrents, D.; Ugarte, E.; Zoetendal, E. G.; Wang, J.; Guarner, F.; Pedersen, O.; de Vos, W. M.; Brunak, S.; Doré, J.; MetaHIT Consortium; Antolín, M.; Artiguenave, F.; Blottiere, H. M.; Almeida, M.; Brechot, C.; Cara, C.; Chervaux, C.; Cultrone, A.; Delorme, C.; Denariáz, G.; Dervyn, R.; Foerstner, K. U.; Friss, C.; van de Guchte, M.; Guedon, E.; Haimet, F.; Huber, W.; van Hylckama-Vlieg, J.; Jamet, A.; Juste, C.; Kaci, G.; Knol, J.; Lakhdari, O.; Layec, S.; Le Roux, K.; Maguin, E.; Mérieux, A.; Melo Minardi, R.; M’rini, C.; Muller, J.; Oozeer, R.; Parkhill, J.; Renault, P.; Rescigno, M.; Sanchez, N.; Sunagawa, S.; Torrejon, A.; Turner, K.; Vandemeulebrouck, G.; Varela, E.; Winogradsky, Y.; Zeller, G.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S. D.; Bork, P. Enterotypes of the Human Gut Microbiome. *Nature* **2011**, *473* (7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>.
- (20) Cox, M. J.; Cookson, W. O. C. M.; Moffatt, M. F. Sequencing the Human Microbiome in Health and Disease. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22* (R1), R88-94. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt398>.

- (21) Ley, R. E.; Turnbaugh, P. J.; Klein, S.; Gordon, J. I. Microbial Ecology: Human Gut Microbes Associated with Obesity. *Nature* **2006**, *444* (7122), 1022–1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>.
- (22) Gregory, J. C.; Buffa, J. A.; Org, E.; Wang, Z.; Levison, B. S.; Zhu, W.; Wagner, M. A.; Bennett, B. J.; Li, L.; DiDonato, J. A.; Lusic, A. J.; Hazen, S. L. Transmission of Atherosclerosis Susceptibility with Gut Microbial Transplantation. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290* (9), 5647–5660. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618249>.
- (23) Chow, J.; Tang, H.; Mazmanian, S. K. Pathobionts of the Gastrointestinal Microbiota and Inflammatory Disease. *Curr. Opin. Immunol.* **2011**, *23* (4), 473–480. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.010>.
- (24) Zeissig, S.; Blumberg, R. S. Life at the Beginning: Perturbation of the Microbiota by Antibiotics in Early Life and Its Role in Health and Disease. *Nat. Immunol.* **2014**, *15* (4), 307–310. <https://doi.org/10.1038/ni.2847>.
- (25) Weiss, G. A.; Hennet, T. Mechanisms and Consequences of Intestinal Dysbiosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74* (16), 2959–2977. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>.
- (26) Verma, D.; Garg, P. K.; Dubey, A. K. Insights into the Human Oral Microbiome. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200* (4), 525–540. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>.
- (27) Papapanou, P. N.; Sanz, M.; Buduneli, N.; Dietrich, T.; Feres, M.; Fine, D. H.; Flemmig, T. F.; Garcia, R.; Giannobile, W. V.; Graziani, F.; Greenwell, H.; Herrera, D.; Kao, R. T.; Kebschull, M.; Kinane, D. F.; Kirkwood, K. L.; Kocher, T.; Kornman, K. S.; Kumar, P. S.; Loos, B. G.; Machtei, E.; Meng, H.; Mombelli, A.; Needleman, I.; Offenbacher, S.; Seymour, G. J.; Teles, R.; Tonetti, M. S. Periodontitis: Consensus Report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.* **2018**, *89 Suppl 1*, S173–S182. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721>.
- (28) Sanz, M.; Winkelhoff, A. J. van. Periodontal Infections: Understanding the Complexity – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J. Clin. Periodontol.* **2011**, *38* (s11), 3–6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01681.x>.
- (29) Page, R. C.; Kornman, K. S. The Pathogenesis of Human Periodontitis: An Introduction. *Periodontol. 2000* **1997**, *14* (1), 9–11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x>.
- (30) Socransky, S. S.; Haffajee, A. D.; Cugini, M. A.; Smith, C.; Kent, R. L. Microbial Complexes in Subgingival Plaque. *J. Clin. Periodontol.* **1998**, *25* (2), 134–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>.
- (31) Nørskov-Lauritsen, N.; Claesson, R.; Jensen, A. B.; Åberg, C. H.; Haubek, D. Aggregatibacter Actinomycetemcomitans:

- Clinical Significance of a Pathobiont Subjected to Ample Changes in Classification and Nomenclature. *Pathogens* **2019**, *8* (4). <https://doi.org/10.3390/pathogens8040243>.
- (32) Gregory J. Seymour, Tord Berglundh, Leonardo Trombelli. Patogenesi Della Parodontite. In *Parodontologia clinica e implantologia orale*; Niklaus P. Lang, Jan Lindhe; Vol. 1.
- (33) Mealey, B. L.; Oates, T. W. Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases. *J. Periodontol.* **2006**, *77* (8), 1289–1303. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050459>.
- (34) Johnson, G. K.; Guthmiller, J. M. The Impact of Cigarette Smoking on Periodontal Disease and Treatment. *Periodontol.* **2000** **2007**, *44* (1), 178–194. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2007.00212.x>.
- (35) Biondi, M.; Zannino, L.-G. Psychological Stress, Neuroimmunomodulation, and Susceptibility to Infectious Diseases in Animals and Man: A Review. *Psychother. Psychosom.* **1997**, *66* (1), 3–26. <https://doi.org/10.1159/000289101>.
- (36) Nicu, E. A.; Rijkschroeff, P.; Wartewig, E.; Nazmi, K.; Loos, B. G. Characterization of Oral Polymorphonuclear Neutrophils in Periodontitis Patients: A Case-Control Study. *BMC Oral Health* **2018**, *18*. <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0615-2>.
- (37) Kinane, D. F.; Preshaw, P. M.; Loos, B. G. Host-Response: Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms of Host-Microbial Interactions – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J. Clin. Periodontol.* **2011**, *38* (s11), 44–48. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01682.x>.
- (38) Preshaw, P. M.; Taylor, J. J. How Has Research into Cytokine Interactions and Their Role in Driving Immune Responses Impacted Our Understanding of Periodontitis? *J. Clin. Periodontol.* **2011**, *38* (s11), 60–84. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x>.
- (39) Highfield, J. Diagnosis and Classification of Periodontal Disease. *Aust. Dent. J.* **2009**, *54* Suppl 1, S11–26. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x>.
- (40) Caton, J. G.; Armitage, G.; Berglundh, T.; Chapple, I. L. C.; Jepsen, S.; Kornman, K. S.; Mealey, B. L.; Papapanou, P. N.; Sanz, M.; Tonetti, M. S. A New Classification Scheme for Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions – Introduction and Key Changes from the 1999 Classification. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45* (S20), S1–S8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>.
- (41) Giovanni E. Salvi, Tord Berglundh e Niklaus P. Lang. Esame Del Paziente. In *Parodontologia clinica e implantologia orale*; Niklaus P. Lang, Jan Lindhe; Vol. 2.
- (42) Albandar, J. M.; Brunelle, J. A.; Kingman, A. Destructive Periodontal Disease in Adults 30 Years of Age and Older in

- the United States, 1988-1994. *J. Periodontol.* **1999**, *70* (1), 13–29. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.1.13>.
- (43) Albandar, J. M. Periodontal Diseases in North America: Periodontal Diseases in North America. *Periodontol.* **2000**, *29* (1), 31–69. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.290103.x>.
- (44) Bergstrom, J. Cigarette Smoking as Risk Factor in Chronic Periodontal Disease. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **1989**, *17* (5), 245–247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1989.tb00626.x>.
- (45) Haber, J.; Wattles, J.; Crowley, M.; Mandell, R.; Joshipura, K.; Kent, R. L. Evidence for Cigarette Smoking as a Major Risk Factor for Periodontitis. *J. Periodontol.* **1993**, *64* (1), 16–23. <https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.1.16>.
- (46) Tomar, S. L.; Asma, S. Smoking-Attributable Periodontitis in the United States: Findings From NHANES III. *J. Periodontol.* **2000**, *71* (5), 743–751. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.5.743>.
- (47) Leite, F. R. M.; Nascimento, G. G.; Baake, S.; Pedersen, L. D.; Scheutz, F.; López, R. Impact of Smoking Cessation on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Longitudinal Observational and Interventional Studies. *Nicotine Tob. Res.* **2019**, *21* (12), 1600–1608. <https://doi.org/10.1093/ntr/nty147>.
- (48) Christoph A. Ramseier, Jeanie E. Suvan e Delwyn Catley. Colloquio Motivazionale. In *Parodontologia clinica e implantologia orale*; Niklaus P. Lang, Jan Lindhe; Vol. 2.
- (49) Löe, H.; Theilade, E.; Jensen, S. B. Experimental Gingivitis in Man. *J. Periodontol.* **1965**, *36* (3), 177–187. <https://doi.org/10.1902/jop.1965.36.3.177>.
- (50) Fridus Van der Weijden, Dagmar Else Slot, José J. Echeverría e Jan Lindhe. Controllo Meccanico Della Placca Sopragengivale. In *Parodontologia clinica e implantologia orale*; Niklaus P. Lang, Jan Lindhe; Vol. 2.
- (51) Baehni, P.; Takeuchi, Y. Anti-Plaque Agents in the Prevention of Biofilm-Associated Oral Diseases: **Anti-Plaque Agents**. *Oral Dis.* **2003**, *9*, 23–29. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.9.s1.5.x>.
- (52) Costalonga, M.; Herzberg, M. C. The Oral Microbiome and the Immunobiology of Periodontal Disease and Caries. *Immunol. Lett.* **2014**, *162* (200), 22–38. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>.
- (53) Mombelli, A. Microbial Colonization of the Periodontal Pocket and Its Significance for Periodontal Therapy. *Periodontol.* **2000** **2018**, *76* (1), 85–96. <https://doi.org/10.1111/prd.12147>.
- (54) Eberhard, J.; Jepsen, S.; Jervøe-Storm, P.-M.; Needleman, I.; Worthington, H. V. Full-mouth Disinfection for the Treatment of Adult Chronic Periodontitis. *Cochrane*

- Database Syst. Rev.* **2008**, No. 1.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD004622.pub2>.
- (55) Jan L. Wennström e Cristiano Tomasi. Terapia Non Chirurgica. In *Parodontologia clinica e implantologia orale*; Niklaus P. Lang, Jan Lindhe; Vol. 2.
- (56) Jan L. Wennström e Jan Lindhe. Chirurgia Parodontale: Terapia Di Accesso. In *Parodontologia clinica e implantologia orale*; Niklaus P. Lang, Jan Lindhe; Vol. 2.
- (57) Nicola Carlone e Raffaello Pompei. Principali Miceti Di Importanza Clinica. In *Microbiologia Farmaceutica*; EdiSES.
- (58) Hellstein, J. W.; Marek, C. L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head Neck Pathol.* **2019**, *13* (1), 25–32. <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01004-6>.
- (59) Lyu, X.; Zhao, C.; Yan, Z.; Hua, H. Efficacy of Nystatin for the Treatment of Oral Candidiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 1161–1171. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S100795>.
- (60) Lewis, M. a. O.; Williams, D. W. Diagnosis and Management of Oral Candidosis. *Br. Dent. J.* **2017**, *223* (9), 675–681. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.886>.
- (61) Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: A Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20* (1), 133–163. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>.
- (62) Innes, N. P. T.; Frencken, J. E.; Bjørndal, L.; Maltz, M.; Manton, D. J.; Ricketts, D.; Van Landuyt, K.; Banerjee, A.; Campus, G.; Doméjean, S.; Fontana, M.; Leal, S.; Lo, E.; Machiulskiene, V.; Schulte, A.; Splieth, C.; Zandona, A.; Schwendicke, F. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Terminology. *Adv. Dent. Res.* **2016**, *28* (2), 49–57. <https://doi.org/10.1177/0022034516639276>.
- (63) Giovanni Sammarco. Diagnosi e Trattamento Delle Lesioni Iniziali. In *Restauri diretti nei settori posteriori*; QUINTESSENCE PUBLISHING.
- (64) Linee Guida Nazionali per La Promozione Della Salute Orale e La Prevenzione Delle Patologie Orali in Età Adulta_17_publicazioni_2441_allegato.Pdf.
- (65) Paolo Ferrari. Diagnosi Di Carie. In *Odontoiatria restaurativa procedure di trattamento e prospettive future*; Edra.
- (66) Kassebaum, N. J.; Smith, A. G. C.; Bernabé, E.; Fleming, T. D.; Reynolds, A. E.; Vos, T.; Murray, C. J. L.; Marcenes, W. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J. Dent. Res.* **2017**, *96* (4), 380–387. <https://doi.org/10.1177/0022034517693566>.

- (67) Beltrán-Aguilar, E. D.; Barker, L. K.; Canto, M. T.; Dye, B. A.; Gooch, B. F.; Griffin, S. O.; Hyman, J.; Jaramillo, F.; Kingman, A.; Nowjack-Raymer, R.; Selwitz, R. H.; Wu, T.; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Dental Caries, Dental Sealants, Tooth Retention, Edentulism, and Enamel Fluorosis--United States, 1988-1994 and 1999-2002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep. Surveill. Summ. Wash. DC 2002* **2005**, *54* (3), 1–43.
- (68) Pitts, N. B.; Zero, D. T.; Marsh, P. D.; Ekstrand, K.; Weintraub, J. A.; Ramos-Gomez, F.; Tagami, J.; Twetman, S.; Tsakos, G.; Ismail, A. Dental Caries. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2017**, *3*, 17030. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>.
- (69) Marsh, P. D. Dental Plaque as a Biofilm: The Significance of PH in Health and Caries. *Compend. Contin. Educ. Dent. Jamesburg NJ 1995* **2009**, *30* (2), 76–78, 80, 83–87; quiz 88, 90.
- (70) Zero, D. T.; Fontana, M.; Martínez-Mier, E. A.; Ferreira-Zandoná, A.; Ando, M.; González-Cabezas, C.; Bayne, S. The Biology, Prevention, Diagnosis and Treatment of Dental Caries: Scientific Advances in the United States. *J. Am. Dent. Assoc.* **2009**, *140*, 25S-34S. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2009.0355>.
- (71) Beighton, D.; Al-Haboubi, M.; Mantzourani, M.; Gilbert, S. C.; Clark, D.; Zoitopoulos, L.; Gallagher, J. E. Oral Bifidobacteria: Caries-Associated Bacteria in Older Adults. *J. Dent. Res.* **2010**, *89* (9), 970–974. <https://doi.org/10.1177/0022034510369319>.
- (72) Wolff, D.; Frese, C.; Maier-Kraus, T.; Krueger, T.; Wolff, B. Bacterial Biofilm Composition in Caries and Caries-Free Subjects. *Caries Res.* **2013**, *47* (1), 69–77. <https://doi.org/10.1159/000344022>.
- (73) Nyvad, B.; Crielaard, W.; Mira, A.; Takahashi, N.; Beighton, D. Dental Caries from a Molecular Microbiological Perspective. *Caries Res.* **2013**, *47* (2), 89–102. <https://doi.org/10.1159/000345367>.
- (74) Buchen, L. Microbiology: The New Germ Theory. *Nature* **2010**, *468* (7323), 492–495. <https://doi.org/10.1038/468492a>.
- (75) Kutsch, V. K. Dental Caries: An Updated Medical Model of Risk Assessment. *J. Prosthet. Dent.* **2014**, *111* (4), 280–285. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2013.07.014>.
- (76) Rosier, B. T.; De Jager, M.; Zaura, E.; Krom, B. P. Historical and Contemporary Hypotheses on the Development of Oral Diseases: Are We There Yet? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2014**, *4*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00092>.
- (77) Lif Holgersson, P.; Öhman, C.; Rönnlund, A.; Johansson, I. Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. *PLoS ONE* **2015**, *10* (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128534>.

- (78) Conrads, G.; About, I. Pathophysiology of Dental Caries. *Caries Excav. Evol. Treat. Cavitated Carious Lesions* **2018**, *27*, 1–10. <https://doi.org/10.1159/000487826>.
- (79) Gomez, J. Detection and Diagnosis of the Early Caries Lesion. *BMC Oral Health* **2015**, *15* (Suppl 1), S3. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S3>.
- (80) Featherstone, J. D. B. THE SCIENCE AND PRACTICE OF CARIES PREVENTION. *J. Am. Dent. Assoc.* **2000**, *131* (7), 887–899. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0307>.
- (81) Rechmann, P.; Kinsel, R.; Featherstone, J. D. B. Integrating Caries Management by Risk Assessment (CAMBRA) and Prevention Strategies Into the Contemporary Dental Practice. *Compend. Contin. Educ. Dent. Jamesburg NJ 1995* **2018**, *39* (4), 226–233; quiz 234.
- (82) Divaris, K. Predicting Dental Caries Outcomes in Children. *J. Dent. Res.* **2016**, *95* (3), 248–254. <https://doi.org/10.1177/0022034515620779>.
- (83) *Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation*; Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Eds.; FAO food and nutrition paper; Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization: Rome, 2006.
- (84) Hellas Cena, Ilaria Di Napoli. *Dal microbiota ai probiotici. Meccanismi d'azione, fisiologia e applicazioni.*
- (85) Scientific Opinion on the Substantiation of Health Claims Related to Non Characterised Bacteria and Yeasts Pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.* **2010**, *8* (2), 1470. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1470>.
- (86) Pineiro, M.; Asp, N.-G.; Reid, G.; Macfarlane, S.; Morelli, L.; Brunser, O.; Tuohy, K. FAO Technical Meeting on Prebiotics. *J. Clin. Gastroenterol.* **2008**, *42 Suppl 3 Pt 2*, S156-159. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31817f184e>.
- (87) Gibson, G.; Scott, K.; Rastall, R.; Tuohy, K.; Hotchkiss, A.; Dubert-Ferrandon, A.; Gareau, M.; Murphy, E.; Saulnier, D.; Loh, G.; Macfarlane, S.; Delzenne, N.; Ringel, Y.; Kozianowski, G.; Dickmann, R.; Lenoir-Wijnkoop, I.; Walker, C.; Buddington, R. Dietary Prebiotics: Current Status and New Definition. *Food Sci. Technol. Bull. Funct. Foods* **2010**, *7*, 1–19. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>.
- (88) Gibson, G. R.; Hutkins, R.; Sanders, M. E.; Prescott, S. L.; Reimer, R. A.; Salminen, S. J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K. S.; Cani, P. D.; Verbeke, K.; Reid, G. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14* (8), 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.

- (89) Toscano, M.; De Grandi, R.; Pastorelli, L.; Vecchi, M.; Drago, L. A Consumer's Guide for Probiotics: 10 Golden Rules for a Correct Use. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **2017**, *49* (11), 1177–1184. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.07.011>.
- (90) Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Merenstein, D. J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R. B.; Flint, H. J.; Salminen, S.; Calder, P. C.; Sanders, M. E. Expert Consensus Document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11* (8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.
- (91) Sanders, M. E.; Benson, A.; Lebeer, S.; Merenstein, D. J.; Klaenhammer, T. R. Shared Mechanisms among Probiotic Taxa: Implications for General Probiotic Claims. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2018**, *49*, 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.09.007>.
- (92) Duar, R. M.; Lin, X. B.; Zheng, J.; Martino, M. E.; Grenier, T.; Pérez-Muñoz, M. E.; Leulier, F.; Gänzle, M.; Walter, J. Lifestyles in Transition: Evolution and Natural History of the Genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41* (Supp_1), S27–S48. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux030>.
- (93) O'Callaghan, A.; van Sinderen, D. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 925. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00925>.
- (94) Mahasneh, S. A.; Mahasneh, A. M. Probiotics: A Promising Role in Dental Health. *Dent. J.* **2017**, *5* (4). <https://doi.org/10.3390/dj5040026>.
- (95) Becker, D. E. Drug Allergies and Implications for Dental Practice. *Anesth. Prog.* **2013**, *60* (4), 188–197. <https://doi.org/10.2344/0003-3006-60.4.188>.
- (96) Becker, D. E. Antimicrobial Drugs. *Anesth. Prog.* **2013**, *60* (3), 111–123. <https://doi.org/10.2344/0003-3006-60.3.111>.
- (97) Bennadi, D. Self-Medication: A Current Challenge. *J. Basic Clin. Pharm.* **2013**, *5* (1), 19–23. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.128253>.
- (98) Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3077007/> (accessed Oct 16, 2020).
- (99) Probiotics as oral health biotherapeutics: Expert Opinion on Biological Therapy: Vol 12, No 9 <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2012.693474> (accessed Oct 16, 2020).
- (100) Gruner, D.; Paris, S.; Schwendicke, F. Probiotics for Managing Caries and Periodontitis: Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Dent.* **2016**, *48*, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.03.002>.

- (101) Teughels, W.; Durukan, A.; Ozcelik, O.; Pauwels, M.; Quirynen, M.; Haytac, M. C. Clinical and Microbiological Effects of *Lactobacillus Reuteri* Probiotics in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Randomized Placebo-Controlled Study. *J. Clin. Periodontol.* **2013**, *40* (11), 1025–1035. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12155>.
- (102) Vivekananda, M. R.; Vandana, K. L.; Bhat, K. G. Effect of the Probiotic *Lactobacilli Reuteri* (Prodentis) in the Management of Periodontal Disease: A Preliminary Randomized Clinical Trial. *J. Oral Microbiol.* **2010**, *2*. <https://doi.org/10.3402/jom.v2i0.5344>.
- (103) Tekce, M.; Ince, G.; GURSOY, H.; Dirikan Ipci, S.; Cakar, G.; Kadir, T.; Yılmaz, S. Clinical and Microbiological Effects of Probiotic Lozenges in the Treatment of Chronic Periodontitis: A 1-Year Follow-up Study. *J. Clin. Periodontol.* **2015**, *42* (4), 363–372. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12387>.
- (104) Allaker, R. P.; Stephen, A. S. Use of Probiotics and Oral Health. *Curr. Oral Health Rep.* **2017**, *4* (4), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s40496-017-0159-6>.
- (105) Oral fungal infections: an update for the general practitioner - Farah - 2010 - Australian Dental Journal - Wiley Online Library <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1834-7819.2010.01198.x> (accessed Oct 18, 2020).
- (106) Akpan, A.; Morgan, R. Oral Candidiasis. *Postgrad. Med. J.* **2002**, *78* (922), 455–459. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.922.455>.
- (107) Inhaled Corticosteroids and the Occurrence of Oral Candidiasis: A Prescription Sequence Symmetry Analysis | SpringerLink <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs40264-013-0029-7> (accessed Oct 18, 2020).
- (108) Daya Attie, M.; Anderson, I. A.; Portnof, J. Mandibular Osteomyelitis Associated with *Candida Albicans* in Marijuana and Heroin Abusers. *Ann. Maxillofac. Surg.* **2018**, *8* (2), 355–357. https://doi.org/10.4103/ams.ams_83_18.
- (109) Keten, H. S.; Keten, D.; Ucer, H.; Yildirim, F.; Hakkoymaz, H.; Isik, O. Prevalence of Oral *Candida* Carriage and *Candida* Species among Cigarette and Maras Powder Users. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8* (6), 9847–9854.
- (110) Relationship Between the Quantity of Oral *Candida* and Systemic Condition/Diseases of the Host: Oral *Candida* Increases with Advancing Age and Anemia | SpringerLink <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11046-019-00326-x> (accessed Oct 18, 2020).
- (111) dos Santos, S. B.; Sabadin, C. E. S.; Mario, D. N.; Rigo, L.; Barbosa, D. A. Presence of *Candida* Spp. and Candidiasis in Liver Transplant Patients. *An. Bras. Dermatol.* **2018**, *93* (3), 356–361. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20186533>.

- (112) Mothibe, J. V.; Patel, M. Pathogenic Characteristics of *Candida Albicans* Isolated from Oral Cavities of Denture Wearers and Cancer Patients Wearing Oral Prostheses. *Microb. Pathog.* **2017**, *110*, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.036>.
- (113) Al-Maskari, A. Y.; Al-Maskari, M. Y.; Al-Sudairy, S. Oral Manifestations and Complications of Diabetes Mellitus. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* **2011**, *11* (2), 179–186.
- (114) Mushi, M. F.; Bader, O.; Taverne-Ghadwal, L.; Bii, C.; Groß, U.; Mshana, S. E. Oral Candidiasis among African Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals: 10 Years of Systematic Review and Meta-Analysis from Sub-Saharan Africa. *J. Oral Microbiol.* **2017**, *9* (1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1317579>.
- (115) Prevalence of oral mucosal disorders during pregnancy: A systematic review and meta-analysis - Bett - 2019 - Journal of Oral Pathology & Medicine - Wiley Online Library <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jop.12831> (accessed Oct 18, 2020).
- (116) Probiotici per prevenire l’enterocolite necrotizzante: troppo economici e facili? <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4173901/> (accessed Oct 18, 2020).
- (117) Jørgensen, M. R.; Kragelund, C.; Jensen, P. Ø.; Keller, M. K.; Twetman, S. Probiotic *Lactobacillus Reuteri* Has Antifungal Effects on Oral *Candida* Species in Vitro. *J. Oral Microbiol.* **2017**, *9* (1). <https://doi.org/10.1080/20002297.2016.1274582>.
- (118) Chew, S. Y.; Cheah, Y. K.; Seow, H. F.; Sandai, D.; Than, L. T. L. In Vitro Modulation of Probiotic Bacteria on the Biofilm of *Candida Glabrata*. *Anaerobe* **2015**, *34*, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.05.009>.
- (119) Vilela, S. F.; Barbosa, J. O.; Rossoni, R. D.; Santos, J. D.; Prata, M. C.; Anbinder, A. L.; Jorge, A. O.; Junqueira, J. C. *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356 Inhibits Biofilm Formation by *C. Albicans* and Attenuates the Experimental Candidiasis in *Galleria Mellonella*. *Virulence* **2015**, *6* (1), 29–39. <https://doi.org/10.4161/21505594.2014.981486>.
- (120) Mundula, T.; Ricci, F.; Barbeta, B.; Baccini, M.; Amedei, A. Effect of Probiotics on Oral Candidiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **2019**, *11* (10). <https://doi.org/10.3390/nu11102449>.
- (121) Ohshima, T.; Kojima, Y.; Seneviratne, C. J.; Maeda, N. Therapeutic Application of Synbiotics, a Fusion of Probiotics and Prebiotics, and Biogenics as a New Concept for Oral *Candida* Infections: A Mini Review. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00010>.
- (122) Coman, M. M.; Verdenelli, M. C.; Cecchini, C.; Silvi, S.; Orpianesi, C.; Boyko, N.; Cresci, A. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of *Lactobacillus Rhamnosus* IMC

- 501(®) , Lactobacillus Paracasei IMC 502(®) and SYN BIO(®) against Pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117* (2), 518–527. <https://doi.org/10.1111/jam.12544>.
- (123) Wannun, P.; Piwat, S.; Teanpaisan, R. Purification, Characterization, and Optimum Conditions of Fermencin SD11, a Bacteriocin Produced by Human Orally Lactobacillus Fermentum SD11. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2016**, *179* (4), 572–582. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2014-y>.
- (124) Wagner, R. D.; Pierson, C.; Warner, T.; Dohnalek, M.; Farmer, J.; Roberts, L.; Hilty, M.; Balish, E. Biotherapeutic Effects of Probiotic Bacteria on Candidiasis in Immunodeficient Mice. *Infect. Immun.* **1997**, *65* (10), 4165–4172.
- (125) Matsubara, V. H.; Silva, E. G.; Paula, C. R.; Ishikawa, K. H.; Nakamae, A. E. M. Treatment with Probiotics in Experimental Oral Colonization by Candida Albicans in Murine Model (DBA/2). *Oral Dis.* **2012**, *18* (3), 260–264. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01868.x>.
- (126) Zaura, E.; Twetman, S. Critical Appraisal of Oral Pre- and Probiotics for Caries Prevention and Care. *Caries Res.* **2019**, *53* (5), 514–526. <https://doi.org/10.1159/000499037>.
- (127) Lin, T.-H.; Lin, C.-H.; Pan, T.-M. The Implication of Probiotics in the Prevention of Dental Caries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102* (2), 577–586. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8664-z>.
- (128) Gatej, S.; Gully, N.; Gibson, R.; Bartold, P. M. Probiotics and Periodontitis - A Literature Review. *J. Int. Acad. Periodontol.* **2017**, *19* (2), 42–50.
- (129) Simark-Mattsson, C.; Emilson, C.-G.; Håkansson, E. G.; Jacobsson, C.; Roos, K.; Holm, S. Lactobacillus-Mediated Interference of Mutans Streptococci in Caries-Free vs. Caries-Active Subjects. *Eur. J. Oral Sci.* **2007**, *115* (4), 308–314. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2007.00458.x>.
- (130) Stecksén-Blicks, C.; Sjöström, I.; Twetman, S. Effect of Long-Term Consumption of Milk Supplemented with Probiotic Lactobacilli and Fluoride on Dental Caries and General Health in Preschool Children: A Cluster-Randomized Study. *Caries Res.* **2009**, *43* (5), 374–381. <https://doi.org/10.1159/000235581>.
- (131) Petersson, L. G.; Magnusson, K.; Hakestam, U.; Baigi, A.; Twetman, S. Reversal of Primary Root Caries Lesions after Daily Intake of Milk Supplemented with Fluoride and Probiotic Lactobacilli in Older Adults. *Acta Odontol. Scand.* **2011**, *69* (6), 321–327. <https://doi.org/10.3109/00016357.2011.568962>.
- (132) Stensson, M.; Koch, G.; Coric, S.; Abrahamsson, T. R.; Jenmalm, M. C.; Birkhed, D.; Wendt, L.-K. Oral Administration of Lactobacillus Reuteri during the First Year of Life Reduces Caries Prevalence in the Primary Dentition

- at 9 Years of Age. *Caries Res.* **2014**, *48* (2), 111–117.
<https://doi.org/10.1159/000354412>.
- (133) Rodríguez, G.; Ruiz, B.; Faleiros, S.; Vistoso, A.; Marró, M. L.; Sánchez, J.; Urzúa, I.; Cabello, R. Probiotic Compared with Standard Milk for High-Caries Children: A Cluster Randomized Trial. *J. Dent. Res.* **2016**, *95* (4), 402–407.
<https://doi.org/10.1177/0022034515623935>.
- (134) Seminario-Amez, M.; López-López, J.; Estrugo-Devesa, A.; Ayuso-Montero, R.; Jané-Salas, E. Probiotics and Oral Health: A Systematic Review. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **2017**, *22* (3), e282–e288.
<https://doi.org/10.4317/medoral.21494>.