



UNIVERSITÀ
di **VERONA**

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI

SCIENZE CHIRURGICHE ODONTOSTOMATOLOGICHE E MATERNO-INFANTILI

*SCUOLA DI DOTTORATO DI
SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE*

*DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CARDIOVASCOLARI*

XXXIII CICLO/ANNO ACCADEMICO 2017/2018

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

**CARATTERIZZAZIONE DEL MICROBIOTA ORALE E DI BIOPSIE DI TESSUTO
VALVOLARE PATOLOGICO IN UN CAMPIONE DI PAZIENTI PARODONTALI E NON
PARODONTALI**

S.S.D. MED/50

Coordinatore: Prof. Giuseppe Faggian

Firma: _____

Tutor: Prof. Giovanni Battista Luciani

Firma: _____

Co-Tutor: Prof. Massimo Albanese

Firma: _____

Dottorando: Dott.ssa Alessia Pardo

Firma: _____

SOMMARIO

La parodontite è una malattia a carattere infiammatorio degenerativo che colpisce i tessuti di supporto degli elementi dentari, causata principalmente da batteri Gram-negativi.

Queste specie batteriche aderiscono alle superfici dei denti e sono organizzati in una struttura complessa, la placca dentale, considerata recentemente un biofilm.

Conditio sine qua non perché si abbia la manifestazione clinica della patologia è la presenza di uno o più patogeni parodontali di specifico tipo clonale e in quantità sufficiente. Le specie patogene frequentemente coinvolte nello sviluppo e progressione della malattia parodontale sono *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, appartenenti al *red complex*.

L'obiettivo del trattamento di base delle parodontiti consiste nel ridurre / eliminare la placca sopra e sottogengivale e nel creare le condizioni idonee ad un buon controllo di placca da parte del paziente.

Numerosi studi clinici e sperimentali hanno evidenziato la presenza di una forte associazione fra le malattie parodontali ed alcune malattie sistemiche, in particolare malattie cardiovascolari, diabete, patologie polmonari, oppure con le complicanze della gravidanza. L'ipotesi che le malattie parodontali possano avere effetti sistemici diretti (tramite la disseminazione di batteri patogeni) o indiretti (tramite il loro contributo all'infiammazione sistemica) rappresenta la base teorica per comprendere e studiare la relazione tra parodontite e malattie sistemiche.

Una delle principali patologie correlata al cavo orale ed alla malattia parodontale è la patologia cardiovascolare. Le malattie cardiovascolari sono tra le principali cause di morbosità, invalidità e mortalità in Italia.

Le correlazioni tra le due patologie riguardano principalmente l'aterosclerosi. Diversi Autori hanno ricercato i batteri del cavo orale ed in particolare quelli parodontopatogeni nelle placche aterosclerotiche.

Secondo gli Autori di uno studio pubblicato su *Circulation* nel 2011 (Lockhart et al.) la malattia parodontale viene definita come fattore di rischio indipendente per l'aterosclerosi, tuttavia i dati derivati da altri studi cross-sectional e trial clinici controllati sono discordi.

Da una parte, un effetto diretto della parodontite sull'aterogenesi o sulla progressione della aterosclerosi potrebbe essere mediato dalla traslocazione di patogeni parodontali dal cavo orale al sistema circolatorio. La batteriemia è stata rilevata non solo dopo episodi di terapia parodontale attiva, ma anche dopo manipolazioni tissutali minori quali il sondaggio. La frequenza di questo fenomeno potrebbe tuttavia essere minore di quanto precedentemente ipotizzato.

D'altra parte, il meccanismo indiretto con cui la parodontite potrebbe contribuire alla patogenesi della malattia aterosclerotica origina dall'osservazione della presenza di una grande produzione locale di mediatori dell'infiammazione nella lesione parodontale che potrebbero così entrare in circolo. In effetti, nel siero dei pazienti parodontali si rilevano elevati livelli di citochine pro-infiammatorie, mediatori che sono considerati markers della malattia cardiovascolare.

Nel presente studio sono stati inclusi un gruppo di pazienti che sono stati successivamente sottoposti a chirurgia cardiovascolare, in particolare di sostituzione valvolare.

Ai pazienti sono state eseguite le valutazioni parodontali e microbiologiche sia sulla placca dentale che sulle valvole rimosse in sede chirurgica, allo scopo di valutare la prevalenza della malattia parodontale presente nel campione e di mettere a confronto i profili microbiologici a livello orale e cardiovascolare.

ABSTRACT

Aim. To assess the prevalence of periodontal disease among patients presenting severe heart valve impairment and requiring coronary by-pass surgery. To investigate the presence of periodontal pathogens in cardiovascular specimens and to analyse the relationship between oral and cardiovascular patterns of the microorganisms detected.

Materials and Methods. An observational study was conducted at the Cardiovascular Surgery Division, University Hospital of Verona, Verona, Italy. The Ethical approval was previously obtained in order to enroll subjects referring to the Hospital for heart valves replacement and coronary bypass surgery. Patients were scheduled to be visited by a dentist, together with a dental hygienist, the day before the surgery: periodontal conditions were accurately registered through clinical and radiographic examinations and dental plaque or salivary samples were collected. Cardiovascular specimens were collected during surgical heart valve replacement for the scheduled microbiological 16 rRNA gene sequencing. Plaque samples and cardiovascular specimens were analyzed according to periodontal status. A qualitative comparison between oral and cardiovascular profiles of the microorganisms detected was also performed.

Results. 26 patients (15 men and 11 women) attended the study. The overall number of patients examined for the conditions of soft tissues were 19, as 7 patients were edentulous and reported to had lost dentition for history of periodontal disease. 46.15% and 11.54% individuals respectively presented moderate periodontitis and severe periodontitis. A statistically significant difference ($p=0.04$) was found for PPD between healthy patients, patients with moderate periodontitis and patients with severe periodontitis. Regarding plaque samples and cardiovascular specimens, no statistically significant differences were found in both cases between healthy patients, patients with moderate periodontitis, patients with severe periodontitis and edentulous patients. Nine valves were found to be positive at the presence of oral and periodontopathic bacterial DNA. The principal species detected were *Streptococcus periodonticum*, *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum-periodonticum*, *Aggregatibacter segnis* and *Porphyromonas pasteri*.

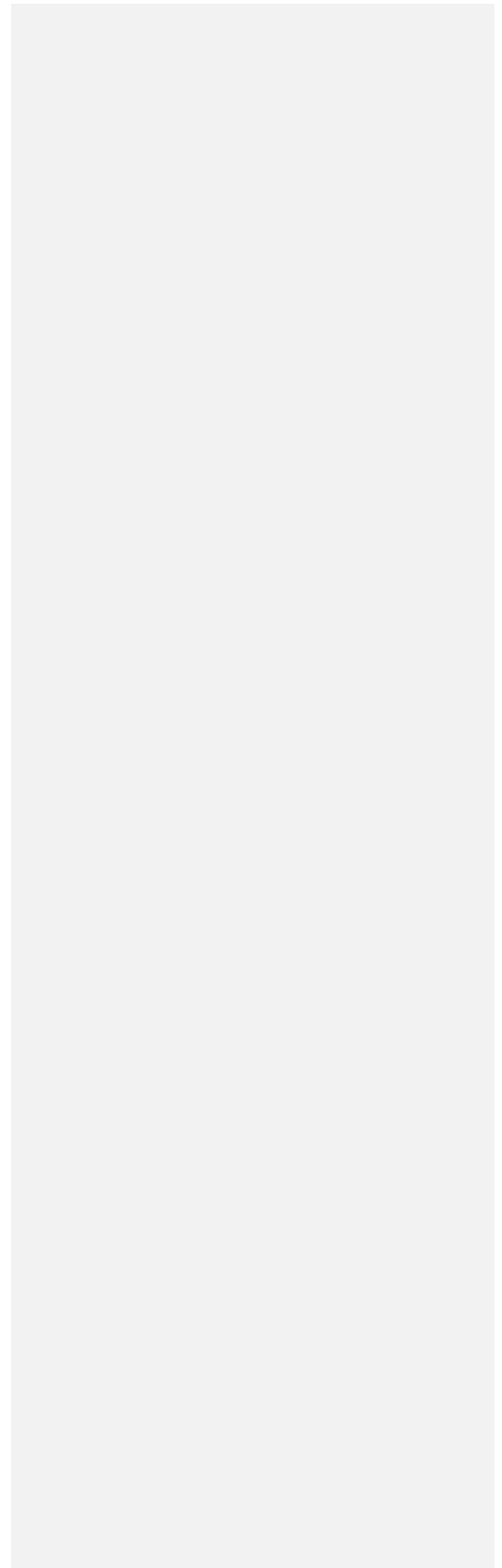
Conclusions.

The significant number of oral and periodontopathic bacterial DNA species found in valve tissue samples, in patients with periodontitis, suggests that the presence of these microorganisms in valve tissue seems to be not coincidental, and that they may have a role in the development of vascular diseases.

INDICE

1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLO STUDIO	pagina 1
2. LA MALATTIA PARODONTALE	pagina 5
2.1. Definizione ed epidemiologia	
2.2. Eziologia e fisiopatologia	
2.3. Microbiologia	
3. LA MALATTIA CARDIOVASCOLARE	pagina 21
3.1. Valvulopatia	
4. CORRELAZIONE TRA MALATTIA PARODONTALE E MALATTIA CARDIOVASCOLARE	pagina 29
4.1. Meccanismo diretto	
4.2. Meccanismo indiretto	
4.3. Terapia parodontale e rischio cardiovascolare	
5. MATERIALI E METODI	pagina 38
5.1. Disegno e obiettivo dello studio	
5.2. Campione	
5.3. Prima visita	
5.4. Analisi microbiologiche	
5.5. Analisi statistica	
6. RISULTATI	pagina 45
6.1. Risultati demografici	
6.2. Risultati dento-parodontali	
6.3. Risultati microbiologici sui campioni di placca subgingivale e saliva	
6.4. Risultati microbiologici sui campioni di tessuto cardiaco	
7. DISCUSSIONE	pagina 87

8. CONCLUSIONI	pagina 95
9. BIBLIOGRAFIA.....	pagina 96



1.INTRODUZIONE E SCOPO DELLO STUDIO

La carie e la malattia parodontale, considerate tra le più comuni e diffuse patologie odontoiatriche^{1,2}, sono state associate negli ultimi anni allo stato di salute dal punto di vista sistemico.

In particolare, recenti evidenze scientifiche indicano una correlazione tra la malattia parodontale e le patologie cardiovascolari³, anche se finora soltanto pochi studi hanno riscontrato la presenza di batteri parodontopatogeni nei tessuti valvolari e vascolari⁴⁻⁶. Tale correlazione trova attualmente riscontro dal punto di vista epidemiologico e scientifico, in quanto la letteratura suggerisce come l'infiammazione dovuta alla presenza di batteri orali, quali streptococchi e batteri parodontopatogeni, sia in grado di scatenare risposte infiammatorie in grado di influenzare lo stato di salute del soggetto affetto da malattia cardiovascolare^{7,8}. Inoltre, la connessione tra parodontite e patologia ateromasica sarebbe da ricondursi a meccanismi infiammatori indotti dai batteri parodontopatogeni che, agendo a livello locale oppure sistemico, possono influenzare l'insorgenza o la diffusione della lesione aterosclerotica⁹.

La malattia parodontale si configura come un'infezione causata da batteri endogeni presenti nel cavo orale. Di circa 700 specie che possono colonizzare l'ambiente orale, soltanto una parte è responsabile dello sviluppo di parodontite negli uomini^{10,11}. Negli individui particolarmente suscettibili, la placca batterica, maturando, può estendersi nel solco, andando a formare la placca subgingivale, la quale aderisce alla superficie dei denti in maniera estremamente persistente, motivo per cui risulta difficile da rimuovere¹².

Con la maturazione della placca batterica iniziano a prevalere batteri Gram-negativi che rilasciano delle vescicole ricche di lipopolissaccaride (LPS), endotossina di cui il biofilm fa da serbatoio per una sua continua produzione. Il LPS ed altre sostanze di origine batterica sono responsabili dell'inizio e della progressione dell'infiammazione a seguito dell'attivazione del sistema immunitario, con conseguente innalzamento del livello di citochine proinfiammatorie. Ne deriva la conseguente produzione di una famiglia di enzimi proteolitici, le metalloproteasi della matrice (MMPs), in grado di distruggere il tessuto connettivo della gengiva e del legamento parodontale, e di produrre

prostaglandine, le quali mediano invece la distruzione dell'osso alveolare¹³. Il LPS ed i batteri Gram-negativi possono anche distaccarsi dal biofilm ed entrare nel circolo ematico insieme alle citochine proinfiammatorie del tessuto parodontale infiammato¹⁴. È stato infatti dimostrato come diversi mediatori e markers dell'infiammazione siano presenti in elevate concentrazioni a livello ematico nei pazienti affetti da parodontite rispetto ai pazienti sani dal punto di vista parodontale¹⁵.

Sono stati ipotizzati due meccanismi alla base dell'associazione tra parodontite e malattia cardiovascolare¹⁶.

Da una parte, i dati derivanti da svariati studi^{17,18} dimostrano che a livello della lesione parodontale vengono prodotti elevati livelli di citochine ed altri mediatori, che possono quindi riversarsi nel flusso ematico. Se i mediatori raggiungono sufficienti concentrazioni preservando la loro bioattività, possono raggiungere tessuti ed organi anche distanti dal cavo orale, come il fegato oppure il cuore, scatenando una fase di infiammazione acuta che può coinvolgere a cascata anche altri organi¹⁹. Più precisamente le modificazioni infiammatorie avvengono a livello endoteliale e si manifestano come *up-regulation* dell'adesione molecolare e produzione di citochine, che potrebbero per esempio favorire per la formazione di ateromi o accelerarne lo sviluppo²⁰. Tuttavia, approfondite evidenze a supporto di questo meccanismo, tale per cui citochine infiammatorie ed altri mediatori entrino in circolazione, non paiono ancora del tutto chiare.

Dall'altra parte, è stato ipotizzato che significativi livelli di LPS e componenti batteriche solubili abbiano accesso immediato ai tessuti connettivali ed entrino quindi a livello del circolo ematico; questa affermazione è supportata dal fatto che pazienti affetti da parodontite possano sviluppare episodi di batteriemia, e che rilevabili concentrazioni di LPS siano frequentemente ritrovati in circolo²¹. Manovre moderatamente invasive, quali *scaling* e *root planing*, effettuate durante la terapia non chirurgica parodontale, possono infatti indurre batteriemia con conseguente attivazione della risposta immunitaria umorale; lo stesso effetto si può ottenere perfino con manovre più semplici, quali lo spazzolamento, l'uso del filo interdentale e lo stesso atto masticatorio^{22,23}.

Studi su animali, come quelli riguardanti il microrganismo parodontopatogeno *Porphyromonas gingivalis*, dimostrano come infezioni orali o sistemiche possano promuovere risposte infiammatorie in siti anche distanti dal cavo orale²⁴. Nel caso dell'ateroma, tali microrganismi oppure le loro componenti batteriche, possono stimolare la risposta infiammatoria dell'ospite, sia essa sistemica o locale, promuovendo cambiamenti infiammatori che possono contribuire allo sviluppo di lesioni ateromasiche²⁵. Altri studi indicano che le concentrazioni sieriche di lipidi potenzialmente infiammatori (lipoproteine a densità bassa e molto bassa), sono molto elevate nei pazienti parodontopatici; essi entrano più facilmente nel torrente ematico e vengono conseguentemente incorporati nella lesione aterosclerotica, accelerando lo sviluppo di lesioni locali e promuovendone la maturazione²⁶.

Alcuni Autori si sono concentrati sulla presenza sia di batteri Gram-positivi orali, che di batteri parodontopatogeni Gram-negativi. Lo stato ossidativo, inteso come riferito alla concentrazione di ossigeno nel flusso ematico, deve essere difatti considerato, in quanto garantisce vantaggi in termini di sopravvivenza agli streptococchi orali, se comparati con le specie batteriche anaerobie obbligate tipiche della parodontite²⁷. In uno studio pilota recente, il DNA dello *Streptococcus mutans* è stato rilevato in circa il 70% dei campioni cardiovascolari di valvole cardiache e placche ateromasiche^{28,29}. Nakano et al.² hanno valutato la presenza di *S. mutans* nei campioni di valvole cardiache (69%) e di placche ateromatose (74%), rispettivamente in 35 e 27 pazienti, programmati per la sostituzione della valvola cardiaca; altre specie batteriche, inclusi i patogeni parodontali, sono state rilevate con frequenze molto più basse. È stata inoltre evidenziata una parziale correlazione fra campioni cardiovascolari e la presenza di alcune specie batteriche nella placca dentale quali *S. mutans*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*². In uno studio di Chapulova et al.³⁰ sono stati valutati 41 pazienti per sostituzione valvolare cardiaca; è stata poi eseguita una valutazione orale e prescritta un'ortopantomografia.

L'amplificazione ed il successivo sequenziamento dei geni rRNA 16S di campioni cardiovascolari ha evidenziato la presenza di tre specie batteriche orali, quali *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus oralis* e *S. mutans*.

In Letteratura sono svariati e non univoci i risultati a supporto della correlazione diretta tra malattia parodontale e patologia cardiovascolare. Gli studi che prevedevano dei prelievi di tessuto cardiovascolare erano tuttavia associati a studi pilota con un numero ristretto di pazienti.

Gli Obiettivi indagati nello studio sono stati principalmente tre:

- il primo obiettivo è stato quello di indagare la prevalenza della malattia parodontale in un gruppo di pazienti sottoposti ad intervento di cardiocirurgia (sostituzione valvolare e/o associato a by-pass);
- il secondo obiettivo è stato quello di indagare la presenza di batteri orali e parodontopatogeni a livello sia dei tessuti valvolari che della placca dentale, a supporto dell'ipotesi che vi sia una correlazione tra parodontite e malattia cardiovascolare;
- il terzo obiettivo è stato quello di verificare la relazione tra i profili microbiologici dei campioni di placca dentale e dei tessuti cardiovascolari.

Lo sviluppo delle tematiche sovradescritte negli obiettivi può rappresentare una base per lo sviluppo di progetti futuri sulla valutazione di come la prevenzione ed il trattamento della parodontite possano essere considerati fattori in grado di prevenire o ridurre l'insorgenza e/o l'evoluzione delle patologie cardiovascolari.

2.LA MALATTIA PARODONTALE

2.1 Definizione ed epidemiologia

La parodontite è una patologia cronica caratterizzata da un processo infiammatorio distruttivo ad eziologia batterica che colpisce il parodonto (o periodonto, dal greco *peri* = intorno, *odontos* = dente)³¹, che identifica l'insieme dei tessuti di sostegno del dente quali gengiva, legamento parodontale, cemento radicolare ed osso alveolare. Essi garantiscono la fissazione del dente al tessuto osseo dei mascellari e permettono di conservare l'integrità della superficie della mucosa masticatoria della cavità orale.

La malattia parodontale, pertanto definita come una patologia che colpisce i tessuti di supporto del dente, può essere caratterizzata o meno da reversibilità. La gengivite è un'infezione reversibile che coinvolge i tessuti gengivali parodontali, o parodonto superficiale; la parodontite, invece, determina, in un individuo suscettibile, uno stato infiammatorio irreversibile dei tessuti parodontali, con coinvolgimento e progressiva distruzione del parodonto profondo, ed esita nella migrazione apicale dell'epitelio gengivale e nella formazione della tasca parodontale³².

Una parodontite non trattata può portare nel tempo a mobilità degli elementi interessati, e conseguente diminuzione della funzione masticatoria ed eventuale perdita degli stessi³³, con inevitabile ed ulteriore impatto a livello estetico e psicologico.

La parodontite è la prima causa di perdita dei denti nella popolazione adulta dei paesi industrializzati e rappresenta quindi la causa di un grave handicap legato alla conseguente perdita delle funzioni masticatoria e fonatoria, nonché un grave disturbo alla vita di relazione e all'estetica del sorriso.

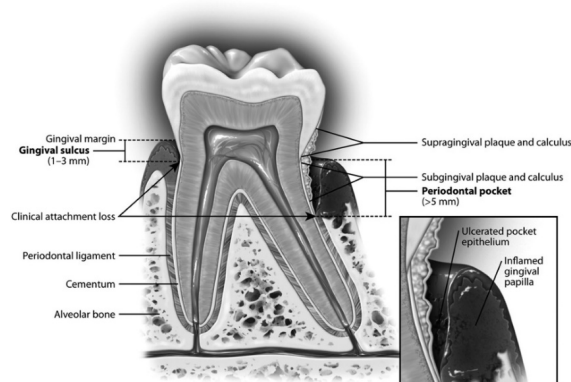


Figura 1: Anatomia del parodonto in condizioni fisiologiche (lato sinistro) e in condizioni patologiche (lato destro). (Copyrights Lockhart et al.)

Il *World Workshop* sulla classificazione delle malattie e delle condizioni parodontali e peri-implantari, tenutosi a Chicago nel novembre 2017, ha aggiornato la precedente classificazione delle malattie parodontali risalente al 1999.

La nuova classificazione prevede una distinzione tra:

- malattie e condizioni parodontali, distinte in: salute del parodonto, patologie e condizioni patologiche gengivali, parodontiti, a loro volta distinte in sottogruppi, quali parodontiti propriamente dette, forme necrotizzanti (gengivite ulcerativa necrotizzante, parodontite ulcerativa necrotizzante, stomatite necrotizzante) e parodontiti secondarie a malattie sistemiche; altre condizioni patologiche del parodonto (ad esempio ascessi parodontali, lesioni endo-parodontali, traumi occlusali);
- malattie e condizioni patologiche peri-implantari, quali salute, mucosite, peri-implantite e deficit dei tessuti molli o duri peri-implantari.

In particolare, per la parodontite propriamente detta, sono stati introdotti nuovi criteri per definirne lo *staging* (severità e difficoltà di trattamento), l'estensione (localizzata o generalizzata), il *grading* (intesa come velocità di progressione) e fattori di rischio³⁴.

Dal punto di vista epidemiologico, la malattia parodontale è una delle condizioni orali più diffuse al mondo e può colpire soggetti di ogni età, da bambini ancora in dentatura da latte a soggetti nella terza età. A livello mondiale, ne è colpito circa il 10-15% della popolazione³⁵, tuttavia una recente revisione della Letteratura ad opera di Nazir³⁶ amplia tale statistica, individuando una prevalenza della patologia variabile dal 20 fino al 50%. In Italia interessa una fascia di individui corrispondente fino al 60% della popolazione, e di questi il 10% manifesta forme avanzate. Si tratta prevalentemente di individui il cui *range* di età oscilla tra i 35 e i 44 anni³⁷.

Per effettuare diagnosi di malattia parodontale è fondamentale la raccolta dei dati relativi all'anamnesi medica generale, farmacologica nonché odontoiatrica del paziente, unitamente all'esame obiettivo. Tali dati sono da integrarsi con esami radiografici ed eventuali esami di laboratorio³⁸.

Negli studi epidemiologici, sono tre i parametri tipicamente registrati per valutare la prevalenza di malattia parodontale: sanguinamento al sondaggio (BOP), indice della presenza di un infiltrato infiammatorio a livello dei tessuti gengivali; profondità di tasca (PPD), che misura la profondità di sondaggio del solco/tasca gengivale; livello clinico di attacco (CAL), fondamentale per valutare la perdita effettiva di tessuto parodontale³⁹.

Nel corso degli anni molti studi epidemiologici si sono focalizzati sulla prevalenza della malattia parodontale⁴⁰, con dati epidemiologici che variano in misura considerevole da studio a studio.

Si denota come la percentuale di individui con un parodonto sano (assenza di infiammazione e profondità di sondaggio non superiore a 4 mm) diminuisca con l'aumentare dell'età e non rappresenta più del 10% della popolazione adulta⁴¹.

In Europa e nel Nord America sono stati riportati tassi di prevalenza della gengivite che oscillano dal 70 al 95% negli adulti. Studi più recenti hanno evidenziato una modificazione nei tassi di prevalenza con valori di gengivite compresi tra il 40 e il 50% negli adulti³³.

Alcuni studi⁴¹⁻⁴⁴ dimostrano come sia la prevalenza sia la gravità della parodontite siano direttamente proporzionali all'età del soggetto; sulla base di tali risultati, all'avanzare dell'età corrisponderebbe una maggior probabilità di perdita di

tessuto parodontale. In linea con questa supposizione sono infatti i dati forniti dalla *World Health Organization*, secondo la quale approssimativamente il 40% della popolazione anziana è edentula⁴⁵.

Per quanto concerne il sesso, se da una parte gli studi non dimostrano predisposizioni genetiche alla patologia parodontale diverse tra uomo e donna, dall'altra emerge la tendenza da parte del sesso maschile ad un peggior livello di salute dento-parodontale: tali differenze sono state spesso ricondotte ad una migliore compliance all'igiene orale da parte della popolazione femminile. Si tratta di una spiegazione forse semplicistica, ma che ad oggi viene tenuta in considerazione, in assenza di studi capaci di dimostrare con sufficiente validità la predisposizione alla malattia parodontale correlata al sesso, senza interferenza di altri fattori di rischio, modificabili e non modificabili, come età, patologie di base, ma anche etnia e stato socio-economico⁴⁶.

La Letteratura scientifica, infatti, avanza l'ipotesi circa differenze nell'incidenza della patologia parodontale anche a seconda dell'etnia di origine e delle aree geografiche di appartenenza. Ciononostante, sembra ragionevole pensare che queste possano influire sulle diverse possibilità relative all'accesso ai servizi, alle risorse disponibili, nonché sullo status socio-economico, più che predisporre o meno a tale patologia⁴⁷.

Infine, diversi Autori hanno identificato una serie di fattori predisponenti dell'ospite in grado di influenzare sviluppo e velocità di progressione della patologia; numerosi studi riportano il ruolo giocato dal polimorfismo dell'interleuchina 1 ed altri polimorfismi, quali potenziali markers genetici per la parodontite⁴⁸⁻⁵¹.

2.2. Etiologia e fisiopatologia

Al momento della nascita il cavo orale del bambino è sterile, ma nelle ore successive viene rapidamente colonizzato dai microrganismi che daranno luogo all'ecosistema microbico orale. Nell'uomo adulto, la cavità orale può arrivare ad ospitare oltre 700 diversi ceppi batterici, in grado di colonizzare diversi habitat, tra cui la superficie dei denti e il solco gengivale⁵².

Alcuni di questi microrganismi, che in condizione di salute, vivono in uno stato di equilibrio tra loro, tuttavia, in determinate condizioni, possono colonizzare le aree sottogengivali portando alla progressiva distruzione dei tessuti parodontali.

Il fattore primario nella possibile distruzione dei tessuti è la placca dentaria, il cui accumulo progressivo, come dimostrato da Loë⁵³, è correlato allo sviluppo di gengivite placca-correlata, che si distingue dagli altri tipi di gengivite indotti da cause e fattori differenti.

La gengivite, definita dall'*American Academy of Periodontology* come lesione infiammatoria confinata al margine gengivale⁵⁴ rappresenta il primo *step* di alterazione dei tessuti. Può essere inoltre considerata come forma iniziale di parodontite, in quanto con il passare del tempo e se non curata, può progredire in forma di patologia parodontale irreversibile⁵⁵.

È bene però precisare che, nonostante la presenza di accumulo di placca giochi un ruolo fondamentale nell'alterazione dei tessuti parodontali e rappresenti l'agente eziologico della gengivite, risulta fattore indispensabile ma non sufficiente per lo sviluppo di parodontite.

La parodontite è definita come una lesione infiammatoria che si estende ai tessuti più profondi⁵⁴, caratterizzata dalla perdita di tessuto connettivo e di osso, e dalla migrazione apicale dell'epitelio giunzionale, fino alla formazione della tasca parodontale, valutata clinicamente come una maggiore profondità di sondaggio⁵⁶. Può colpire in tutte le fasce d'età, anche in quelle più giovani, per le quali si manifesta in forma aggressiva. Nelle persone adulte viene di solito diagnosticata come forma cronica e può rimanere stabile per molti anni o progredire in forme più severe di parodontite⁵⁷.

Durante gli anni '70-'80 la gengivite e la parodontite sono state classificate dal punto di vista isto-patologico in 4 fasi: lesione iniziale, lesione precoce, lesione stabile e lesione avanzata.

La prima fase, la lesione iniziale, si sviluppa nel giro di 2-4 giorni dall'inizio dell'accumulo di placca ed è caratterizzata da un aumento del flusso crevicolare gengivale, della quantità di leucociti neutrofilici polimorfonucleati e di linfociti T, e dalla perdita di tessuto connettivo.

Se non fermata dopo massimo 10 giorni, essa progredisce a lesione precoce, caratterizzata da una continua perdita di tessuto connettivale e da un denso infiltrato infiammatorio ricco di leucociti e macrofagi⁵⁸.

I microrganismi, durante queste prime fasi, sembrano invadere i tessuti creando come conseguenza diretta la distruzione degli stessi, a causa della formazione di tossine, liberazione di LPS ed enzimi proteolitici.

Uno studio di Bullon mostra come gli LPS, soprattutto quelli presenti nella membrana del *P. gingivalis*, siano correlati all'autofagia⁵⁹.

L'autofagia è un processo cellulare fisiologico in cui porzioni di proteine e organelli danneggiati sono avvolti in una struttura a doppia membrana, l'autofagosoma, e diretti ai lisosomi per la digestione. Questo processo normalmente serve a mantenere l'equilibrio, ma aumenta nelle cellule infiammate in funzione dell'eliminazione dei patogeni⁶⁰.

Gli LPS portano all'autofagia mediata da specie reattive dell'ossigeno (ROS) e quindi ad un aumento del processo infiammatorio⁵⁹.

Inoltre, durante la risposta infiammatoria immuno-mediata, le metalloproteinasi della matrice (MMPs) inducono la degradazione della matrice extracellulare (ECM) nei tessuti parodontali. È stato anche dimostrato che la metalloproteinasi della matrice batterica extracellulare (EMMPRIN) viene sovra-espressa e si associa a sua volta alla sovra-espressione delle MMPs⁶¹.

L'EMMPRIN è un'immunoglobulina transmembrana glicosilata di tipo 1 che contiene nel suo dominio N-terminale due immunoglobuline extracellulari, Ig1 e Ig2; Ig1 è difatti coinvolta nell'attivazione delle MMPs che a loro volta portano alla distruzione dei tessuti⁶².

In queste prime fasi, gli LPS, associati all'acido lipoteicoico (LTA) ed ai peptidoglicani, attraverso una via alternativa, portano all'attivazione del complemento nel liquido del solco gengivale⁶³.

L'attivazione del complemento provoca la formazione di complessi di attacco di membrana che lisano cellule batteriche e componenti che sono vasoattivi e chemiotattici verso i fagociti. Il conseguente reclutamento di fagociti nell'area provoca quindi danni ai tessuti attraverso una varietà di meccanismi, incluso il rilascio di enzimi lisosomiali⁶⁴.

I meccanismi cellulari e molecolari precedentemente descritti evidenziano come la distruzione dei tessuti sia causata anche dall'attivazione della risposta infiammatoria dell'ospite, che se da un lato serve a proteggere i tessuti, dall'altro li distrugge.

La risposta infiammatoria che si attiva a livello parodontale, che si configura come un classico meccanismo riconducibile all'infiammazione acuta, comporta: stravasamento di leucociti e loro migrazione verso l'esterno, dilatazione degli spazi intercellulari degli epitelii superficiali, rilascio graduale di mediatori immunoinfiammatori come le citochine. A loro volta le citochine inducono la produzione di prostaglandine (in particolare il PGE₂) ed altre sostanze responsabili delle fasi più avanzate dell'infiammazione, come il riassorbimento osseo. Inoltre, gli antigeni batterici stimolano la produzione di anticorpi, rilasciano altre immunoglobuline, contemporaneamente all'aumento della quantità di plasmacellule, linfociti e macrofagi. La lesione passa così dall'essere confinata alla gengiva marginale, all'approfondirsi all'interno dei tessuti⁶⁵.

Le citochine sono piccole proteine solubili che alterano a cascata il comportamento o le proprietà di altre cellule, sia a livello locale che sistemico. Normalmente sono prodotte dalle cellule che compongono i tessuti, ma in caso di infiammazione possono essere secrete anche dalle cellule infiltrate localmente. Quelle coinvolte nella lesione parodontale sono IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , classificate come citochine infiammatorie⁶⁶.

IL-1 α , IL-1 β e TNF- α sembrano essere responsabili del riassorbimento osseo, in quanto stimolano i fibroblasti del legamento parodontale, che a loro volta producono altre citochine, enzimi degradanti la matrice e prostaglandine, portando

alla distruzione del tessuto connettivo con conseguente perdita di attacco. Inoltre, come già citato precedentemente, IL-1 stimola la produzione di MMPs⁶⁷.

Anche IL-6, oltre ad essere responsabile della maturazione finale delle cellule B, sembra essere implicata nel riassorbimento osseo in quanto stimola la formazione di osteoclasti⁶⁸.

Nella stessa produzione degli osteoclasti è coinvolto anche il TNF- α ⁶⁹.

IL-8 partecipa invece alla migrazione dei neutrofilo nella lamina propria e nell'epitelio della gengiva infiammata⁶⁶.

Anche alte concentrazioni di prostaglandine indicano segno di malattia parodontale: la prostaglandina più importante, PGE2, induce vasodilatazione e aumento della permeabilità dei capillari, provocando così i segni clinici dell'infiammazione, quali arrossamento ed edema, che sono effetti vasoattivi potenziati dall'interazione sinergica con altri mediatori. Oltre a ciò, anche la PGE2 stimola la produzione degli osteoclasti responsabili della distruzione ossea⁷⁰.

Le prime due fasi (lesione iniziale e lesione precoce) sono seguite, nel giro di 2-3 settimane, dalla lesione definita stabilizzata, caratterizzata da una predominanza di plasmacellule e di linfociti T e B, che aumentano con la gravità della patologia^{71,72}.

Le cellule responsabili della formazione della tasca parodontale sono proprio le cellule B, che portano alla distruzione del tessuto connettivo e quindi alla migrazione dell'epitelio giunzionale. La permeabilità dell'ambiente della tasca facilita un progressivo ingresso di batteri, citochine infiammatorie (come IL-1, TNF- α) e PGE2⁷³.

Tale lesione può rimanere stabile per molti anni oppure trasformarsi nella successiva lesione avanzata, che dal punto di vista della risposta infiammatoria è simile, in quanto continuano ad essere presenti molte plasmacellule, ma si assiste ad una progressiva distruzione di osso alveolare e del legamento parodontale.

È solito associare le prime due fasi (iniziale e precoce) alla gengivite e le ultime due (stabilizzata e avanzata) alla parodontite^{58,74}.

Nonostante entrambe siano accumulate da invasione batterica da un lato e risposta infiammatoria dell'ospite dall'altro, ciò che le differenzia è la distruzione

tissutale che avviene nella fase stabilizzata e in quella avanzata, da attribuirsi prevalentemente alla risposta immunitaria⁷⁵.

Per quanto riguarda i neutrofili, in diversi studi si è osservato come giochino un ruolo importante nel prevenire lo sviluppo di queste due patologie, in quanto rappresentano la prima linea difensiva attorno agli elementi dentali e, in condizioni fisiologiche, non lasciano traccia del loro passaggio e non creano danni tissutali⁷⁴.

È infatti normalmente presente un flusso costante di neutrofili che va dal plesso gengivale fino al margine gengivale, al solco gengivale e alla cavità orale⁷⁶.

Nella gengivite e nella parodontite è possibile osservare una differente colonizzazione batterica man mano che la lesione progredisce. Vi è un progressivo viraggio da una microflora prevalentemente Gram-positiva a spirochete, anaerobi obbligati e organismi Gram-negativa.

Ancora prima dell'inizio dell'infiammazione, in situazioni di salute dei tessuti, sono presenti colonie batteriche formate soprattutto da streptococchi e specie facoltative anaerobiche di *Actinomyces* (*A. viscosus* e *A. naeslundii*) e *Rothia dentocariosa*^{77,78}.

Con l'inizio della gengivite si assiste ad un cambiamento da batteri prevalentemente Gram-positivi, come gli streptococchi, ad una maggior presenza di actinomiceti⁷⁹.

Ulteriore cambiamento avviene con la malattia parodontale: in una lesione parodontale avanzata, la tasca rappresenta una nicchia ecologica ideale per lo sviluppo di uno specifico microbiota sottogengivale anaerobio, composto da anaerobi e bacilli gram-negativi microaerofili come *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*^{80,81}.

Per essere definito patogeno parodontale, un microrganismo deve rispondere a specifici criteri, basati sui postulati di Koch, in seguito modificati e ampliati. Questi criteri includono: l'associazione, l'eliminazione, la risposta dell'ospite, i fattori di virulenza, gli studi negli animali e la valutazione del rischio⁸².

Ne deriva che un patogeno parodontale debba essere in grado di colonizzare la tasca parodontale, e quindi sopravvivere in ambiente sottogengivale, e produrre

fattori in grado di danneggiare, direttamente o indirettamente, il tessuto dell'ospite. Affinché si sviluppi una parodontite, tuttavia, la sola presenza dell'agente patogeno è necessaria ma non sufficiente⁸³, infatti l'instaurarsi e la progressione dell'infezione sono strettamente dipendenti dall'interazione simultanea di più fattori⁸⁴ distinti in fattori non modificabili e fattori modificabili. Tra i fattori non modificabili si identificano: età, sesso, razza/origine etnica, predisposizione genetica. Diversi autori hanno identificato una serie di fattori predisponenti dell'ospite in grado di influenzare sviluppo e velocità di progressione della patologia, come il ruolo giocato dal polimorfismo dell'IL-1, e da altri polimorfismi, quali potenziali *markers* genetici per la parodontite⁴⁸⁻⁵¹. Pare tuttavia che la presenza di questi *markers* genetici sia un fattore capace di contribuire, ma non indispensabile, alla progressione della malattia parodontale⁸⁵. Le prove epidemiologiche ad oggi presenti risultano dunque insufficienti per definire con certezza se suddetti polimorfismi costituiscano un effettivo fattore di rischio per la parodontite, dati i risultati talvolta discordanti degli studi effettuati in merito⁸⁶⁻⁸⁸.

Anche i fattori di rischio modificabili, locali e sistemici, rivestono un ruolo importante nella fisiopatologia della parodontite: diabete mellito, fumo, alcol, stile di vita sedentario, stress, osteoporosi/osteopenie, infezioni virali⁸⁹⁻⁹¹.

A tal proposito l'interesse dei ricercatori si sta rivolgendo sempre più ad una correlazione tra malattia parodontale e rischio di malattie sistemiche. In particolare, sarebbero molteplici le evidenze a conferma di un nesso tra infezione parodontale e aterosclerosi, patologia cardiovascolare e cerebrovascolare, complicanze gravidiche e diabete mellito. Le modalità per cui la parodontite sia in grado di influire su un ospite già predisposto a malattie sistemiche si riscontrano in: condivisione dei fattori di rischio; biofilm sottogengivale quale serbatoio di batteri Gram-negativi, in grado di rilasciare tossine e indurre maggiori risposte vascolari; elevata presenza di mediatori dell'infiammazione, quali citochine pro-infiammatorie, interleuchine, interferone gamma, prostaglandine⁹²⁻⁹⁴.

2.3 Microbiologia della malattia parodontale

Una superficie dentale pulita viene rapidamente ricoperta da una biopellicola, denominata pellicola acquisita, formata in seguito all'assorbimento di proteine e glicoproteine salivari da parte dell'idrossiapatite dello smalto; questo processo consente la colonizzazione da parte di microrganismi sia sopra che sotto il margine gengivale, portando allo sviluppo della placca dentale.

Il numero dei batteri presenti nei siti sottogengivali va da 10^{13} , nei solchi sani e poco profondi, a 10^{18} , nelle tasche parodontali profonde. Tali microrganismi, in condizione di salute, vivono in uno stato di equilibrio tra loro: in determinate condizioni, alcuni di essi possono tuttavia colonizzare le aree sottogengivali, portando alla progressiva distruzione dei tessuti parodontali.

Molti microrganismi che colonizzano il margine gengivale o il solco gengivale possono appartenere alla classificazione dei patogeni parodontali; nonostante la loro presenza, i tessuti parodontali non vengono danneggiati, in quanto si può osservare che un agente patogeno è necessario, ma non sufficiente, perché si verifichi la malattia: questo concetto si adatta alla definizione di parodontite come malattia infettiva. Similmente ad altre patologie infettive, la parodontite sembra essere causata da un gruppo definito di patogeni parodontali, che agiscono da soli o in combinazione con altri.

In una lesione parodontale avanzata, la tasca, formata in seguito alla migrazione apicale dell'epitelio, rappresenta una nicchia ecologica ideale per lo sviluppo di un microbiota sottogengivale anaerobio, composto da anaerobi e bacilli Gram-negativi microaerofili^{80,81}.

Si assiste quindi ad un progressivo viraggio da una microflora prevalentemente gram-positiva, a spirochete, anaerobi obbligati, e organismi Gram-negativi, come *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *C. rectus*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *A. actinomycetencomitans*^{80,95}.

Ne deriva che un patogeno parodontale debba essere in grado di colonizzare la tasca parodontale, e quindi sopravvivere in ambiente sottogengivale, e produrre fattori in grado di danneggiare, direttamente o indirettamente, il tessuto dell'ospite.

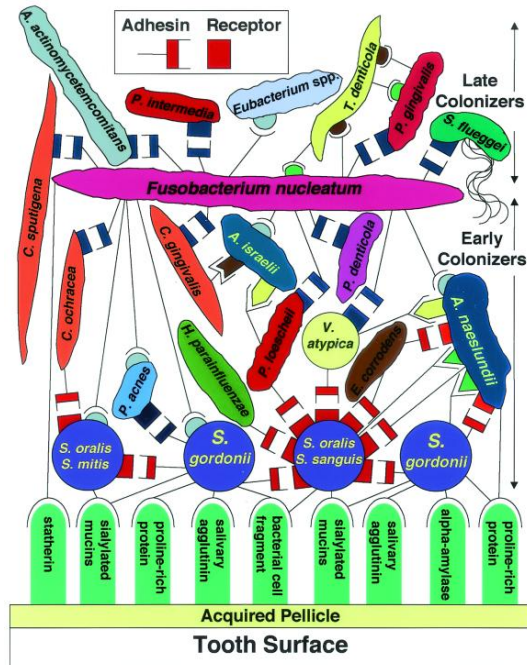


Figura 2: Modello spazio-temporale della colonizzazione microbica orale.
(Copyrights Kolenbrander et al)

Sono stati descritti sei cluster nel biofilm sottogengivale, coinvolti nella formazione della gengivite e della parodontite⁹⁶.

Il cluster giallo è composto dalle specie di streptococchi che includono lo *Streptococcus sanguis* e *oralis* mentre il cluster viola dall'*Actinomyces odontolyticus* e dalla *Veillonella parvula*: insieme agli *Actinomyces*, si pensa che queste specie fossero "colonizzatori precoci" che esprimessero recettori per colonizzare, consentendo un attacco rapido e deciso alla superficie dell'ospite. Il cluster verde consiste invece in *Capnocytophaga spp.*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens*, *A. actinomycetemcomitans*. Il cluster arancione consiste in *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Micromonas micros* (*Peptostreptococcus micros*), *Campylobacter spp.*, *Eubacterium spp.*, *Streptococcus constellatus*.

Queste specie sono considerate specie ibride, sia per le loro capacità fisiologiche di utilizzare e rilasciare sostanze nutritive nei biofilm, sia per il fatto che presentano delle adesine batteriche sulla superficie cellulare e tramite le quali possono legarsi ai primi colonizzatori e ai membri del complesso rosso⁹⁷. Il cluster rosso è costituito da tre specie batteriche specifiche: *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*. Questo cluster è considerato il più significativo nella progressione della malattia parodontale, in quanto i membri di questo consorzio aumentano di numero e prevalenza con l'aumentare dei parametri clinici della malattia parodontale.

Il *P. gingivalis* è considerato il primo patogeno parodontale e gli isolati di questa specie sono bastoncelli Gram-negativi asaccarolitici, anaerobi e non mobili. La crescita *in vitro* del *P. gingivalis* e l'analisi dei suoi componenti (LPS, proteine di membrana e i prodotti del metabolismo) rivela che è in grado di produrre una serie di fattori di virulenza putativi⁹⁸.

È stato inoltre riportato come uno dei membri maggiormente coinvolti nel microbiota patogeno della patologia parodontale caratterizzate dalla perdita di osso alveolare⁹⁹.

Come parte del repertorio dei fattori di virulenza di *P. gingivalis*, è stato dimostrato che esso possiede molecole e strutture essenziali per le interazioni con l'ospite. In particolare, questa specie ha dimostrato di essere in grado di aderire a una varietà di tessuti e cellule ospiti e di invadere queste cellule e moltiplicarsi¹⁰⁰. La coaggregazione¹⁰¹ è un fenomeno che descrive l'interazione specifica di coppie di batteri orali: molte specie hanno dimostrato questa funzione, presumibilmente correlata allo sviluppo dei complessi *biofilm* del cavo orale.

L'evento iniziale nella patogenesi di *P. gingivalis* è la sua interazione come capacità di aderenza nella cavità orale¹⁰², che si esprime attraverso diversi componenti batterici, come fimbrie, proteasi ed emoagglutinine¹⁰³.

Le fimbrie di *P. gingivalis* partecipano a quasi tutte le interazioni tra il batterio, l'ospite e gli altri batteri coinvolti nel fenomeno patologico: l'aderenza batterica alle superfici della mucosa e dei denti, così come la coaggregazione batterica, sono infatti passaggi essenziali per la colonizzazione di varie specie batteriche orali.

Il *P. gingivalis* si aggrega frequentemente con *A. naeslundii*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus mitis*¹⁰⁰. Recenti studi hanno mostrato come solo le fimbrie dello *Streptococcus salivarius* interagiscono con il *P. gingivalis*¹⁰⁴. Kamaguchi et al. hanno evidenziato una frequente associazione fra *P. gingivalis* e *P. intermedia* nel biofilm maturo della parodontite¹⁰⁵.

La distruzione del tessuto connettivo gengivale e dell'osso nella parodontite è un'importante conseguenza del microbiota batterico sottogengivale. Il *P. gingivalis*, a causa del suo alto contenuto di enzimi proteolitici, è chiaramente un attore importante in questa distruzione. Tuttavia, dal punto di vista della sua crescita e sopravvivenza, la distruzione del tessuto connettivo rappresenta un'ottima fonte di nutrienti, soprattutto amminoacidi, per cui questo microorganismo assume anche un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'edema e dell'aumento del fluido crevicolare¹⁰⁶.

I dati degli studi epidemiologici sull'uomo suggeriscono che *P. gingivalis* può innescare più efficacemente i processi patologici se interagisce con altre due specie parodontopatogene quali l'attivazione di processi patologici in modo più efficace in collaborazione con *T. denticola* e *T. forsythia*.

Evidenti e numerosi studi scientifici indicano l'importanza del *T. denticola* nella progressione della malattia parodontale: nella fase di salute gengivale il numero e la distribuzione di questo microorganismo è molto bassa e non quantificabile, mentre in caso di gengivite e nelle fasi di progressione della lesione parodontale si osserva un incremento significativo del numero di cellule di *T. denticola* si è notato un suo notevole incremento. Questo batterio anaerobio Gram-negativo è stato stimato per un 50% della conta totale di batteri presenti in una lesione parodontale¹⁰⁷.

Oltre 2 decenni fa, è stata stabilita una correlazione positiva tra la percentuale di spirochete nelle tasche parodontali e le misure cliniche di infiammazione, l'aumento della placca dentale, l'aumento dell'essudato gengivale, il sanguinamento al sondaggio, la profondità della tasca parodontale e la perdita di attaccamento del tessuto connettivo. È pertanto fondamentale comprendere le peculiarità di questo patogeno commensale poiché interagisce e supporta il

complesso biofilm caratteristico del microbiota patogeno della malattia parodontale¹⁰⁸.

Il *T. denticola* interagisce con altri microrganismi orali, specialmente con *P. gingivalis* e il *F. nucleatum*¹⁰⁹

Questa correlazione tra le specie orali gioca un ruolo fondamentale nella progressione della malattia parodontale e nella formazione del biofilm¹¹⁰.

La coaggregazione tra *P. gingivalis* e *T. denticola* è mediata dalla proteina legante le fimbrie di *T. denticola*, la dentilisina. Poiché il *P. gingivalis* è più comune negli stadi avanzati della parodontite insieme a *T. denticola*, è possibile che la coaggregazione osservata sia determinante per veicolare il *P. gingivalis* nelle regioni più profonde della tasca parodontale in via di sviluppo. Queste posizioni potrebbero essere più favorevoli alla crescita di *P. gingivalis* (essendo più anaerobio), oltre a fornire un ambiente nutrizionale più ricco (dagli essudati delle fessure gengivali). È stato inoltre dimostrato che *T. denticola* si lega a una varietà di superfici orali, inclusa la superficie del dente, le proteine della matrice extracellulare, tra cui la laminina, la fibronectina, l'eparina e cellule ospiti, come fibroblasti gengivali umani¹¹¹.

Il terzo membro del red complex è la *T. forsythia*; Tanner et al. lo descrivono come un Gram-negativo, anaerobio, di aspetto fusiforme⁷⁸.

Diversi studi, riguardanti la presenza di *T. forsythia* nella placca sottogengivale, hanno evidenziato una frequenza significativamente più alta nei soggetti malati rispetto ai controlli sani¹¹². Inoltre, la presenza di *T. forsythia* è frequentemente associata alla colonizzazione da parte di *P. gingivalis* ed è regolarmente rilevata in gruppi di pazienti più anziani¹¹³.

I livelli di *T. forsythia* sono significativamente elevati nei siti con sanguinamento al sondaggio rispetto ai siti non sanguinanti, nonché con un indice CPTIN (Community Periodontal Index of Treatment Needs) di 3 vs 0, suggerendo una relazione con la malattia esistente e i siti di malattia potenzialmente attivi¹¹⁴.

T. forsythia è stata identificata in campioni di placca sottogengivale di adulti e bambini, nonché in campioni di saliva, in particolare di soggetti con parodontite. È interessante notare come in campioni di saliva prelevati da genitori e figli, *T. forsythia* sia più frequente nel campione dei genitori, sebbene questa specie sia

stata rilevata con una frequenza sostanzialmente più alta nei bambini quando i genitori erano infetti¹¹⁵.

È stato precedentemente riportato come *T. forsythia* è ora considerato, insieme a *P. gingivalis* e *T. denticola*, un membro importante del microbiota parodontale. I primi studi sulla correlazione tra la malattia parodontale e le patologie sistemiche hanno indicato che questo membro del complesso rosso poteva essere coinvolto con le malattie cardiovascolari¹¹⁶.

Infine, una delle associazioni più forti tra un presunto patogeno e la patologia parodontale avanzata è anche quella riguardante la specie microbica *A. actinomycetemcomitans*; si tratta di un bastoncello, Gram-negativo, che di norma viene associato alla parodontite per la frequenza con cui si ritrova nelle lesioni tipiche della parodontite giovanile localizzata, comparata con dei campioni di placca di altre condizioni cliniche (parodontite, gengivite e salute parodontale)¹¹⁷.

Quando i soggetti con questa forma di parodontite venivano trattati con la terapia parodontale causale, non si rilevava più la presenza del patogeno o comunque a livelli inferiori rispetto al prelievo di partenza; il fallimento terapeutico era associato ad una mancata eradicazione della specie microbica¹¹⁸.

Recentemente è stato osservato che *A. actinomycetemcomitans* era in grado di produrre una quantità di metaboliti patogeni che favoriscono l'invasione delle cellule epiteliali dei tessuti gengivali in colture *in vitro*^{119,120}.

Esso è anche implicato nelle forme distruttive dell'adulto, ma tuttavia è stato isolato con meno frequenza ed in minor numero rispetto alla malattia parodontale giovanile¹²¹.

Il sierotipo *b* del patogeno parodontale è stato identificato con maggior frequenza in pazienti americani con parodontite giovanile, mentre il sierotipo *a* era più frequente nell'adulto¹²².

Questa scoperta è stata avvalorata indirettamente mediante analisi del titolo anticorpale nel siero nei confronti dei due sierotipi.

3. LA MALATTIA CARDIOVASCOLARE

Le malattie cardiovascolari sono tra le principali cause di morbosità, invalidità e mortalità in Italia¹²³.

Secondo i dati della *World Health Organization*, nel 2016 circa 17.9 milioni di persone sono morte a causa di malattie cardiovascolari, che rappresentano il 31% di tutti i decessi a livello mondiale¹²⁴.

I dati Istat 2012 riportano, per l'Italia, 613.520 decessi. Le cause di morte più frequenti risultano essere la cardiopatia ischemica (75.080 casi), le malattie cerebrovascolari (61.255) e altre patologie cardiache¹²⁵ (48.384).

Il termine malattia cardiovascolare indica un vasto gruppo di condizioni patologiche che colpiscono il cuore e i vasi sanguigni, e che riconoscono un importante fattore eziologico comune nell'aterosclerosi^{3,123}.

Per aterogenesi, si intendono quegli eventi che portano alla formazione della placca aterosclerotica.

Il termine aterosclerosi, introdotto da Marchand nel 1904, identifica una reazione infiammatoria cronica caratterizzata dalla comparsa a livello della tunica elastica e muscolare delle arterie di ispessimenti focali sclerojalini o sclerolipidici intimo-mediali, che esitano in specifici quadri anatomico-clinici¹²⁶.

Questi processi infiammatori sono responsabili della progressione morfologica della lesione aterosclerotica. Tali siti infiammatori attraggono macrofagi, linfociti B e mastociti, oltre a lipidi pro-infiammatori. Quest'ultimi depositandosi, restringono il lume del vaso ed aumentano il rischio di rottura della placca e trombosi^{126,127}.

Un elevato numero di situazioni infiammatorie derivate da infezioni comuni, tra cui la parodontite, sono state considerate probabili promotori di aterogenesi e quindi capaci di incrementare il rischio di eventi cardiovascolari e cerebrovascolari¹²⁸.

3.1 Valvulopatia

Le valvulopatie sono un gruppo di patologie, congenite o acquisite, che colpiscono le valvole cardiache. Le valvole cardiache sono strutture anatomiche la cui funzione è quella di regolare la direzione del flusso di sangue: due sono posizionate tra gli atri ed i ventricoli (valvola mitrale e valvola tricuspide), mentre le altre due tra ventricolo sinistro e aorta (valvola aortica) e tra ventricolo destro ed arteria polmonare (valvola polmonare). Esse si aprono per garantire il flusso ematico dagli atri ai ventricoli e dai ventricoli al circolo polmonare o sistemico; si chiudono per impedirne il reflusso.

La disfunzione delle valvole cardiache native ha diverse cause¹²⁹: più frequentemente la malattia intrinseca dei lembi/cuspidi della valvola deriva da calcificazioni, fibrosi, dalla fusione, dalla retrazione, dalla perforazione, dalla rottura o dallo stiramento del lembo o delle cuspidi. In secondo luogo, possono esserci malformazioni valvolari congenite che spesso coinvolgono strutture associate.

Sono possibili due effetti funzionali della malattia della valvola: inibizione del flusso in avanti secondario all'ostruzione causata dalla mancata apertura completa di una valvola (nota come stenosi) e flusso inverso causato dalla mancata chiusura completa di una valvola (nota come insufficienza). La degenerazione calcifica della valvola aortica, dovuta alla calcificazione distrofica delle cuspidi e dell'anello della valvola aortica (chiamato anulus) è la causa più comune di stenosi aortica, la patologia valvolare clinicamente più comune.

Inoltre, la funzione di una qualsiasi delle quattro valvole cardiache può essere influenzata da processi infettivi (chiamati endocarditi) che sono in grado di distruggere il tessuto valvolare in pochi giorni o settimane e di solito provocano un'insufficienza valvolare.

Il trattamento delle valvulopatie è in genere chirurgico: spesso le valvole vengono sostituite con valvole meccaniche o biologiche¹³⁰.

La stenosi della valvola aortica è la malattia valvolare più comune nei Paesi industrializzati³.

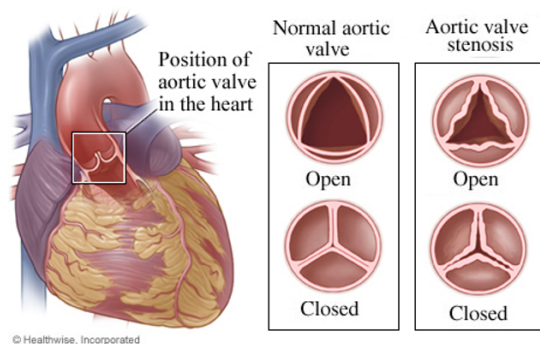


Figura 3: Rappresentazione valvola aortica in condizioni fisiologiche e patologiche. Da <https://www.umcvc.org/conditions-treatments/aortic-stenosis>.

La stenosi aortica può essere causata da una malattia reumatica o più comunemente da calcificazione delle tre cuspidi valvolari (Fig.3). La prevalenza di stenosi aortica aumenta con l'età, in media dello 0,2% nella coorte di 50-59 anni e aumentando al 9,8% nella coorte di 80-89 anni¹³¹. La bicuspidia aortica congenita rappresenta un fattore di rischio.

La stenosi aortica degenerativa è il risultato finale di un processo infiammatorio causato da un danno endoteliale dovuto a stress meccanico, penetrazione lipidica che porta a fibrosi, ispessimento del lembo e infine calcificazione¹³². La stenosi aortica calcifica causa una maggiore rigidità del lembo e un orifizio della valvola aortica ristretto che si traduce in un gradiente di pressione attraverso la valvola¹³³. La stenosi aortica ha un periodo subclinico prolungato definito come sclerosi aortica, durante il quale c'è calcificazione sulla valvola ma non è presente gradiente transvalvolare. Il restringimento progressivo della valvola aortica con concomitante sovraccarico di pressione ventricolare sinistra e conseguente ipertrofia ventricolare sinistra portano alla classica triade dei sintomi della stenosi aortica: dispnea, sincope e angina¹³².

Un passaggio critico nella valutazione dei pazienti con stenosi aortica a basso flusso e basso gradiente è distinguere la stenosi aortica valvolare veramente critica dalla pseudo-stenosi (che è indicativa solo di una stenosi aortica moderata). Nella vera stenosi aortica grave a basso flusso, a basso gradiente, la lesione gravemente stenotica provoca un aumento del postcarico e una ridotta frazione di eiezione ventricolare sinistra, causando una riduzione della gittata sistolica e un basso gradiente di pressione transvalvolare. Nella pseudo-stenosi i pazienti hanno un basso gradiente di pressione transvalvolare a causa di una combinazione di stenosi aortica solo moderata e bassa gittata cardiaca. Il basso flusso dovuto alla ridotta contrattilità riduce, infatti, le forze di apertura della valvola, che determina una mobilità limitata di una valvola non ancora gravemente malata. È fondamentale distinguere la vera stenosi aortica severa dalla pseudo-stenosi, poiché questa distinzione definisce quei pazienti che trarranno maggiori benefici dalla sostituzione della valvola aortica. La pseudo-stenosi non ha indicazione chirurgica in quanto è ancora una stenosi moderata, per cui va seguita nel tempo mediante ecocardiogrammi seriati per valutare l'eventuale aumento del gradiente transvalvolare aortico. Infatti, un gradiente medio transvalvolare (Gmean) aortico > 40 mmHg e una velocità del flusso transvalvolare (V_{max}) >4 m/s definiscono la stenosi aortica severa e pongono indicazione alla sostituzione valvolare aortica. Nel caso della stenosi aortica low-flow low-gradient (Gmean <40 mmHg e $V_{max} < 4$ m/s) l'ecocardiogramma effettuato con un inotropo come la dobutamina può aiutare a fare diagnosi differenziale con la pseudo-stenosi. In corso di dobutamina il Gmean tenderà ad aumentare in caso stenosi aortica severa. Inoltre, considerando l'area valvolare, quest'ultima non aumenterà in caso di vera stenosi (area valvolare, AVA <1 cm²), mentre potrebbe rimanere uguale o addirittura aumentare nella pseudo-stenosi (AVA >1 cm²).

La stenosi della valvola aortica calcifica ha caratteristiche anatomico-patologiche di natura osteoblastica. Il processo calcifico inizia in profondità nel tessuto valvolare, vicino ai margini di attacco. Nella malattia avanzata, i noduli si estendono attraverso le superfici di deflusso delle cuspidi e sono quasi transmurali. Uno stadio morfologico precoce del processo di calcificazione è chiamato sclerosi della valvola aortica. Nella fase successiva, la stenosi atrio-

ventricolare, l'area valvolare funzionale è sufficientemente ridotta da causare un'ostruzione misurabile al deflusso e un gradiente significativo dal ventricolo sinistro all'aorta.

I lipidi svolgono anche un importante ruolo di avvio nella segnalazione cellulare della calcificazione vascolare e valvolare¹³⁴. Studi patologici chirurgici hanno dimostrato la presenza di lipoproteine a bassa densità ossidate (LDL) nelle valvole calcificate^{135,136}.

Pazienti con ipercolesterolemia familiare omozigote rappresentano un ottimo campione per testare l'ipotesi che i lipidi abbiano un ruolo nello sviluppo della stenosi aortica calcifica, perché questi pazienti hanno livelli estremamente elevati di colesterolo LDL senza altri fattori di rischio tradizionali per l'arteria coronaria^{137,138}.

La scoperta del ruolo, o presunto tale, degli agenti infettivi nella patogenesi di questi quadri clinici, è dimostrato dal numero di studi che negli ultimi decenni si sono concentrati proprio sull'argomento. Tali agenti infettivi sono noti come possibile causa di endocardite infettiva, un'altra delle principali cause di sostituzione della valvola, ma prove recenti collegano questi agenti patogeni anche alla stenosi valvolare e/o al rigurgito¹³⁹.

Ad esempio, un'associazione tra infezione da polmonite da *Chlamydomphila pneumoniae* e stenosi aortica è stata suggerita dagli studi di Nyström-Rosander et al. e Turgeman et al.^{140,141}.

L'endocardite infettiva è rara, con un'incidenza annua di circa 3-10 su 100.000 persone¹⁴².

Il modello della malattia varia in tutto il mondo, con un'epidemiologia nei paesi a basso reddito simile a quella dei paesi ad alto reddito durante l'utilizzo dei primi antibiotici¹⁴³.

La malattia reumatica cardiaca resta il fattore di rischio chiave per l'endocardite infettiva nei paesi a basso reddito ed è alla base fino a due terzi dei casi¹⁴⁴.

I pazienti sono generalmente giovani adulti e l'infezione è causata principalmente da streptococchi acquisiti in comunità, sensibili alla penicillina, che entrano nel torrente circolatorio attraverso il cavo orale¹⁴⁵.

La prevalenza della cardiopatia reumatica è diminuita nei paesi ad alto reddito per merito del miglioramento degli standard di vita e per la disponibilità di antibiotici per la faringite causata dagli streptococchi. Tuttavia, la malattia valvolare degenerativa, il diabete, il cancro, l'uso di droghe per via endovenosa e la cardiopatia congenita hanno sostituito la cardiopatia reumatica e vengono considerati come i principali fattori di rischio per l'endocardite infettiva. Inoltre, è stato osservato che i pazienti con endocardite infettiva sono per lo più anziani, con un'età media, che da metà degli anni '40 all'inizio degli anni '80, è passata a più di 70 anni¹⁴⁶.

I cocci Gram-positivi delle specie stafilococco, streptococco ed enterococco contribuiscono all'insorgenza dell'80-90% delle endocarditi infettive. Lo *Staphylococcus aureus* è il microrganismo più frequentemente isolato associato all'endocardite infettiva nei paesi ad alto reddito ed è segnalato fino al 30% dei casi¹⁴⁷.

L'endocardite infettiva da stafilococco si estende oltre i gruppi tradizionali a rischio, come i pazienti in emodialisi e i consumatori di droghe per via endovenosa, e può colpire sia le valvole native che quelle protesiche. Inoltre, ha un'elevata propensione ad acquisire resistenza agli antibiotici: è ormai noto come ceppi resistenti alla meticillina siano emersi in tutto il mondo¹⁴⁸.

Gli stafilococchi coagulasi negativi (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis* e *Staphylococcus capitis*) sono commensali cutanei ubiquitari. Colonizzano linee e dispositivi (ad esempio cateteri venosi) a permanenza e rappresentano la specie più comune nell'endocardite valvolare protesica precoce¹⁴⁹.

Gli stafilococchi coagulasi negativi possono anche causare l'endocardite valvolare nativa acquisita in ospedale¹⁵⁰; la produzione di biofilm, alti tassi di formazione di ascessi e la resistenza a più antibiotici sono caratteristiche di questi commensali¹⁵¹.

L'endocardite infettiva streptococcica causata da batteri appartenenti al gruppo *viridans* orale rimane più comune nei paesi a basso reddito¹⁴³.

Dal termine latino *viridis*, che significa verde (riferito alla caratteristica colorazione verde dell'alone d'emolisi che circonda la colonia streptococcica su

agar sangue), questo gruppo include *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*.

La maggior parte degli isolati è *Enterococcus faecalis*, che causa sia endocardite valvolare nativa che endocardite valvolare protesica nei pazienti anziani o cronici. In particolare, nella specie *Enterococcus faecium* si è osservata una sempre più frequente resistenza a vancomicina, aminoglicosidi e ampicillina¹⁵².

Raramente le endocarditi infettive sono determinate da batteri Gram-negativi (*Acinetobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa*), *Legionella spp*, *Mycoplasma spp* e *Tropheryma whippelii*¹⁵³.

L'endocardite fungina, solitamente *Candida o Aspergillus*, è rara ma spesso fatale, insorge in pazienti immunosoppressi o dopo un intervento di cardiocirurgia, principalmente sulle valvole protesiche¹⁵⁴.

Per anni è stato suggerito che i classici fattori di rischio cardiovascolare come il diabete, l'iperlipidemia, l'ipertensione arteriosa, il fumo e la predisposizione familiare potessero promuovere la patogenesi della stenosi della valvola aortica calcifica¹⁵⁵. Oltre a un metabolismo del calcio alterato ed a influenze immunologiche¹⁵⁶, l'endocardite subacuta o acuta è responsabile dello sviluppo della sVHD¹⁵⁷ (Single ventricle heart disease).

Studi scientifici hanno confermato un legame tra endocardite batterica subclinica e calcificazione della valvola aortica in un modello animale¹⁵⁸. L'inoculo di corinebatteri e streptococchi nei conigli bianchi neozelandesi ha portato alla calcificazione delle valvole cardiache dopo 50 giorni. Uno studio approfondito sui batteri responsabili di tale fenomeno ha identificato diversi meccanismi che promuovono la calcificazione dei tessuti¹⁵⁹. Studi di biologia molecolare, eseguiti mediante reazione a catena della polimerasi (PCR), hanno evidenziato la presenza di batteri nel tessuto valvolare cardiaco in pazienti con sVHD¹³⁹, in particolare sono stati rilevati i seguenti generi batterici: streptococchi, stafilococchi, proprionibatteri¹⁶⁰, clamidie e micoplasm¹⁶¹.

In alcuni pazienti con disfunzione della valvola cardiaca (stenosi o rigurgito) è necessaria una sostituzione chirurgica della valvola. Sebbene alcuni dei problemi valvolari siano dovuti a un processo acuto, ovvero endocardite acuta, infarto

miocardico o trauma, i processi cronici sono una delle principali cause di disfunzione valvolare. La valvola cardiaca è sottoposta a stress meccanico, che può portare al danneggiamento dell'endotelio che ricopre la valvola¹⁶². Può facilitare la penetrazione e l'accumulo di lipidi nella valvola^{135,136}, che a sua volta può causare o esacerbare i processi infiammatori nei lembi delle valvole. Alcuni studi confermano l'origine infiammatoria della degenerazione calcifica delle valvole cardiache, cioè, aumento dei livelli di proteina C reattiva¹⁶³, Interleuchina-1 β ¹⁶⁴ e fattore di crescita trasformante β 1¹⁶⁵ o un aumento della temperatura nelle valvole stenotiche¹⁶⁶. Questi processi possono facilitare la successiva fibrosi e calcificazione della valvola, che causa rigidità della valvola e disfunzione emodinamica.

La valutazione della correlazione tra la presenza di *P. gingivalis* nelle tasche parodontali e nelle valvole cardiache può aiutare nella comprensione del ruolo di questa specie batterica nei processi infiammatori o degenerativi che coinvolgono le valvole cardiache. *P. gingivalis* è stato identificato nella placca aterosclerotica ed è ragionevole presumere che la sua presenza possa provocare processi infiammatori anche nelle valvole cardiache. In tal caso, potrebbe essere trovato un nuovo collegamento tra la presenza di *P. gingivalis* nella placca arterosclerotica e l'insorgenza della patologia e degenerazione della valvola calcifica.

4.CORRELAZIONE TRA MALATTIA PARODONTALE E MALATTIA CARDIOVASCOLARE

Malattia parodontale e malattia cardiovascolare presentano fattori di rischio comuni, quali sesso maschile, età, fumo, abuso di alcol, etnia, status socio-economico, stress, diabete mellito e obesità^{167,168}.

Il rischio di incidenza di malattia cardiovascolare nei pazienti affetti da parodontite sembra essere più elevato del 20-50%, rispetto ad individui sani dal punto di vista parodontale^{168,169}.

È stato dimostrato che la parodontite aumenta la risposta infiammatoria sistemica, implicata nell'aterosclerosi e nelle malattie cardiovascolari. La patologia parodontale è difatti il risultato di una complessa interazione tra l'infezione batterica cronica e la risposta infiammatoria dell'ospite, che porta alla distruzione irreversibile dei tessuti di supporto dei denti, e quindi ad una perdita degli stessi come esito finale della patologia¹⁷⁰ (circa il 40% degli anziani è edentulo). La parodontite è associata a marcatori elevati di infiammazione¹⁷¹, che sono indicatori di CVD (Cardiovascular disease) e rischio di ictus. La perdita dei denti, come marker di progressiva malattia parodontale, è stata inoltre correlata all'aterosclerosi subclinica e alla prevalenza della placca carotidea¹⁷².

È noto come le persone che soffrono di malattie cardiovascolari hanno significativamente una salute orale peggiore rispetto alla popolazione generale^{158,173}.

Si ritiene che la parodontite, che è di natura cronica ma con periodi di fase acuta, causi una reazione infiammatoria sistemica piccola ma di lunga durata, che a sua volta contribuisce allo sviluppo dell'aterosclerosi e ad un aumento del rischio di eventi cardiovascolari. Studi pubblicati nel 1993 hanno dimostrato che una malattia parodontale cronica attiva aumenta il rischio di malattia coronarica del 25% rispetto ai soggetti sani.

Queste evidenze hanno indotto gli studiosi ad indagare circa una possibile correlazione tra le due patologie; questa stretta associazione fra parodontite e patologie cardiovascolari è stata infatti confermata nell'ultimo decennio grazie a numerosi studi clinici randomizzati e meta-analisi³ (livello di evidenza A).

Due sono le ipotesi riguardo i possibili meccanismi attraverso cui le due patologie possono interagire l'una con l'altra.

4.1 Meccanismo diretto

Gli adulti ospitano più di un miliardo di batteri in bocca. Sebbene la flora microbica vari nei diversi habitat orali, l'area di maggiore potenziale rilevanza per le patologie cardiovascolari è la tasca parodontale. La superficie totale delle tasche nei pazienti con parodontite è stimata tra 8 e 20 cm² e le regioni di ulcerazione nella tasca posizionano il biofilm batterico in corrispondenza dei vasi sanguigni.

Per batteriemia transitoria, si intende uno stato morboso, caratterizzato dalla presenza nel circolo ematico di microrganismi batterici.

È stato dimostrato da diversi studi che un certo numero di batteri parodontali sono in grado di passare dalla cavità orale al flusso ematico, mentre una parte di parodontopatogeni rimane localizzata all'interno dei tessuti connettivi^{25,174,175}.

È noto come sia le normali procedure di igiene orale domiciliare e soprattutto quelle di igiene orale professionale, ad esempio *scaling* e *root planing* sottogengivale, siano in grado di provocare una batteriemia^{174,176}.

In aggiunta sembra che nei pazienti affetti da parodontite grave anche il solo processo della masticazione sia in grado di provocare la comparsa di batteri nel sangue nel 55% dei casi³.

Sebbene il concetto di prevenzione di batteriemie sia costantemente preso in esame negli studi, il rischio relativo derivante dalle procedure odontoiatriche rispetto agli eventi quotidiani di routine come lo spazzolamento dei denti è sconosciuto. È infatti noto come i batteri comunemente entrano nella circolazione sanguigna attraverso il tessuto crevicolare gengivale ulcerato che circonda i denti¹⁷⁷.

Diversi studi sottolineano come le estrazioni dentali siano tra le procedure dentali più probabili per causare batteriemia, lo spazzolamento dei denti può lesionare una superficie molto più ampia del tessuto gengivale. È stato riscontrato che questa comune attività quotidiana d'igiene orale possa determinare una batteriemia (nel 23% dei casi), a sua volta responsabile di endocardite infettiva.

In uno studio che comprendeva sia pazienti sottoposti a spazzolamento che pazienti non vincolati a questa pratica d'igiene orale si è osservato che i primi presentavano una più elevata percentuale emocolture positive dopo circa 60 minuti di campionamento (9% vs 2%). Ciò suggerisce che lo spazzolamento rappresenta un rischio di batteriemia simile a quello di un'estrazione dentale; considerando che le linee guida professionali raccomandano di spazzolare i denti almeno due volte al giorno. C'è la possibilità che la batteriemia dovuta al solo spazzolamento dei denti si verifichi 200 volte all'anno, e quindi molto più frequentemente rispetto a batteriemie originate in persone che subiscono un intervento odontoiatrico. Questi dati suggeriscono fortemente che il solco gengivale è la principale fonte di portale del flusso sanguigno per le specie batteriche orali nel sangue^{22,178}.

Già nel 1998 Herzberg e Weyer avevano dimostrato che *P. gingivalis* e *S. sanguis* esprimono fattori di virulenza in grado di indurre, *in vitro* e *in vivo*, l'aggregazione piastrinica con conseguente possibile formazione di trombi¹⁷⁹.

Sempre nello stesso anno, Deshpande et al. hanno osservato che *P. gingivalis* era capace di aderire ed invadere le cellule endoteliali dall'aorta e delle coronarie. In molteplici studi, inoltre, erano state identificate specie parodontopatogene a livello delle placche ateromatose¹⁸⁰.

In uno studio con 35 pazienti sottoposti alla sostituzione della valvola cardiaca e 27 soggetti sottoposti a riparazione di aneurisma aortico è stata rilevata la presenza di *S. mutans* nel 69% delle valvole e nel 74% dei campioni di placca ateromatose¹⁸¹.

Haraszthy et al. in uno studio condotto sfruttando la PCR hanno riscontrato che il 30% dei campioni da endoarteriectomia carotidea erano esami positivi per *T. forsythia*, il 26% per *P. gingivalis*, il 18% per *A. actinomycetemcomitans* e il 14% al *P. intermedia*²⁵.

Pochi anni dopo, in uno studio condotto su animali da laboratorio, è stato evidenziato del DNA genomico di *P. gingivalis* all'interno dei tessuti aortici¹⁸².

Negli anni successivi altri studi hanno poi avvalorato tale ipotesi^{183,184,175}, fino ad arrivare in tempi più recenti agli studi di Oliveira et al. e Ziebolz et al. i quali

hanno dimostrato la presenza di batteri orali a livello dei tessuti cardiaci ed in particolare a livello delle valvole cardiache^{139,185,186}.

Si ritiene che l'invasione delle cellule ospiti sia un'importante strategia utilizzata da un elevato numero di agenti patogeni poiché offre protezione dal sistema immunitario dell'ospite. L'invasione microbica di cellule non fagocitiche avviene grazie ad una serie di eventi comuni a tutti i patogeni invasivi. Questi includono: (1) riconoscimento specifico dei recettori sulla superficie delle cellule eucariotiche, (2) trasduzione del segnale dalle molecole della superficie cellulare ai domini intracellulari della cellula ospite e (3) riarrangiamenti citoscheletrici con conseguente formazione di un vacuolo intracellulare e successiva invasione della specie microbica¹⁸⁷.

La colonizzazione batterica del tessuto gengivale e la penetrazione nei tessuti più profondi sono processi critici nella patogenesi della malattia parodontale. I batteri orali sono stati osservati all'interno del tessuto gengivale malato¹⁸⁸ e si ritiene che la capacità dei batteri orali di invadere le cellule ospiti sia un'importante strategia non solo per eludere la risposta immunitaria dell'ospite ma anche per raggiungere il tessuto sottostante.

Due patogeni parodontali, l'*A. actinomycetemcomitans* e il *P. gingivalis*, sono stati ampiamente esaminati per la loro capacità di invadere le cellule epiteliali. *A. actinomycetemcomitans* è il principale patogeno associato alla malattia parodontale giovanile. Le strategie di invasione di *A. actinomycetemcomitans* sono state studiate in dettaglio e si sviluppano attraverso un processo dinamico, a più fasi che coinvolge entrata, fuga dal vacuolo, moltiplicazione rapida, uscita dall'ospite cellula (diffusione intracellulare) e da cellula a cellula¹⁸⁹.

Numerosi studi hanno descritto l'invasione di cellule epiteliali da parte di *P. gingivalis* caratterizzandone le condizioni e l'efficienza dell'invasione^{190,191}.

È interessante notare che oltre all'invasione delle cellule epiteliali il *P. gingivalis* è in grado di invadere e replicarsi attivamente anche all'interno delle cellule endoteliali vascolari *in vitro*¹⁸⁰.

Un altro gruppo di batteri in grado di invadere le cellule endoteliali sono gli streptococchi¹⁹², membri prevalenti della flora orale che frequentemente sono causa di endocarditi infettive¹⁹³.

È stato osservato che nell'ultimo decennio l'incidenza annuale di endocardite infettiva (EI) in Nord America è di circa 11-15 soggetti per 100.000 abitanti¹⁹⁴.

Gli streptococchi sono la seconda causa principale di EI dopo gli stafilococchi¹⁹⁴, e sono una causa comune di EI acquisita in comunità¹⁴⁷.

Ci sono diversi gruppi di microorganismi che fanno parte della flora normale del cavo orale, una nicchia condivisa con gli streptococchi del gruppo. La cavità orale è un sito colonizzato da specie microbiche che causano l'IE.

Anche streptococchi anaerobi, appartenenti al genere *Peptostreptococcus*, costituiscono parte della flora normale del cavo orale e contribuiscono all'insorgenza di EI¹⁹⁵.

Lim Kim et al. hanno trovato il gruppo *Viridans* di streptococchi su 224 ceppi batterici isolati in episodi di EI. 161 appartenevano a streptococchi del gruppo *viridans*, di cui 99 *S. mitis* (61%), 24 *S. bovis* (15%), 21 *S. mutans* (13%), 15 *S. anginosus* e 2 *S. salivarius* (1%)

Il 28% dei restanti isolati riguardavano streptococchi di altri gruppi o appartenevano ad altre specie microbiche¹⁹⁶.

La ricerca dello *S. mutans* cariogeno nell'Atherosclerotic Disease (AD) è stata ricercata anche in altri studi associata alla presenza dei batteri parodontopatogeni. Uno studio effettuato su 203 pazienti che includeva 82 campioni di valvola aortica, 35 campioni di valvola mitrale e 86 campioni di parete aneurismatica aortica, ha evidenziato che *S. mutans* era la specie microbica rilevata più frequentemente nelle valvole cardiache (42,7%) e nelle pareti dei vasi sanguigni con aneurisma (62,8%).

Inoltre, mentre la maggior parte degli *S. mutans* cariogeni appartiene ai sierotipi c, e ed f, gli *S. mutans* associati all'AD appartengono a un nuovo sierotipo, k, caratterizzato da una drastica riduzione sia della quantità di catene laterali del glucosio che del potenziale cariogeno dei ceppi^{1,2,28}.

4.2 Meccanismo indiretto

L'ipotesi di un meccanismo indiretto, si basa sui concetti di infiammazione sistemica e mimetismo. Secondo la via dell'infiammazione sistemica l'insorgenza di un'infezione parodontale è associata alla presenza, a livello della lesione parodontale, di numerosi di markers dell'infiammazione

La patologia maggiormente correlata con questo tipo di meccanismo è l'aterosclerosi. L'aterosclerosi è un processo che determina lente modificazioni a carico delle pareti dell'endotelio, a causa dell'accumulo di lipoproteine a bassa intensità (LDL). È stato dimostrato che i pazienti con patologie parodontali tendono ad avere elevati livelli sierici di lipidi potenzialmente infiammatori, tra cui trigliceridi e LDL. Queste forme lipidiche possono entrare facilmente in circolo ed essere incorporate nella placca ateromatosa, promuovendone la maturazione¹⁹⁷.

Una volta depositatesi a livello della placca ateromatosa, le LDL subiscono modificazioni ossidative ad opera di enzimi secreti dalle cellule endoteliali, divenendo LDL ossidate (OxLDL); esse stimolano le cellule dell'endotelio a secernere molecole pro-infiammatorie, proteine chemiotattiche e fattori di crescita, che hanno un ruolo chiave nel reclutamento di monociti nella parete arteriosa e nel promuoverne la differenziazione e proliferazione in macrofagi⁹³.

La placca ateromatosa, in presenza di una alimentazione non equilibrata, può addirittura iniziare a formarsi durante l'infanzia e rimanere nel tempo cronica e quiescente, oppure andare incontro a rottura, con conseguente riversamento nel sangue di sostanze capaci di attivare il processo di trombosi. Questa condizione determina uno stato di infiammazione cronica con infiltrati di monociti/macrofagi, cellule T e neutrofili all'interno dei tessuti del cappuccio fibroso della placca, nonché con un aumento dei marcatori circolanti di infiammazione nel flusso ematico^{3,127}.

Elevati livelli di citochine proinfiammatorie, infatti, come IL-1 beta, IL-2, IL-6 e IL-8, sono state rilevate all'interno di lesioni ateromatose dagli studi di Barath et al. e di Galea et al.¹⁹⁸⁻²⁰⁰.

La proteina C-reattiva, IL-6 e la fosfolipasi A2 sono considerati markers altrettanto importanti nel determinare lo stato infiammatorio. Verosimilmente,

anche in un paziente con patologia parodontale, si rileva un aumento di markers infiammatori sistemici, quali TNF- α e TNF- β , proteina C-reattiva, IL-1, IL-6 e IL-8¹⁷¹.

Essi sono considerati importanti marcatori della malattia cardiovascolare capaci di promuovere, insieme ad altri mediatori prodotti dall'ospite in risposta a certi microrganismi o LPS batterici, lo sviluppo, la maturazione e la stabilizzazione delle lesioni ateromatose nelle arterie (Fig.4) con ripercussioni sulla coagulazione, in particolare sulla funzione piastrinica¹²⁷ e con notevole aumento del rischio di eventi cardiovascolari.

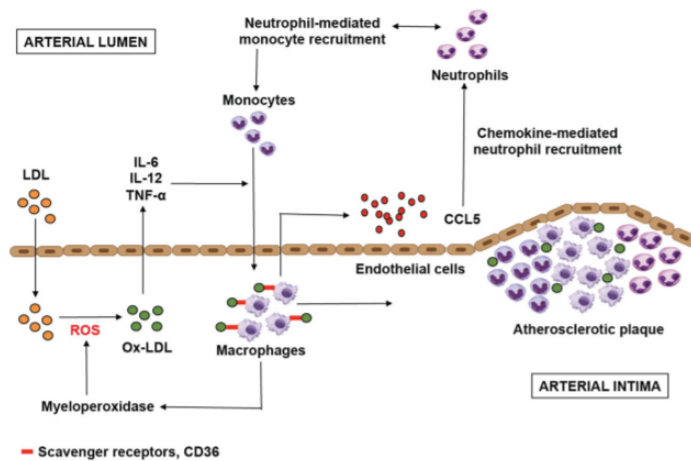


Figura 4: Rappresentazione schematica dei meccanismi infiammatori coinvolti nella patogenesi dell'aterosclerosi e della formazione della placca. Chhibber-Goel et al., 2016.

Secondo la via del mimetismo antigenico, infine, sembra plausibile l'ipotesi connessa ad una risposta autoimmune stimolata dall'elevata somiglianza tra peptidi antigeni di origine batterica e proteine umane. In particolare le proteine HSP (proteine prodotte in corso di shock da ustione), espresse sulle membrane batteriche, sembrano essere in grado di aumentare la risposta immunitaria innata con la produzione di alti livelli di anticorpi cross-reattivi e cellule T-helper

autoaggressive. La risposta del sistema immunitario alle HSP nei pazienti affetti da parodontite e patologia cardiovascolare si traduce, *in vitro*, in una risposta proliferativa significativamente elevata da parte dei macrofagi¹²⁸. L'interazione tra HSP e la risposta immunitaria indotta dall'infezione batterica potrebbe quindi essere responsabile dell'inizio della lesione aterosclerotica precoce.

La placca ateromatosa cronica e quiescente può passare a uno stato più pericoloso in cui la sua vulnerabilità alla rottura è aumentata, soprattutto se il nucleo ateromatoso molle è instabile, e la sua rottura esporrà contenuti altamente trombogenici al sangue, con attivazione di trombosi e conseguente sindrome coronarica acuta (ACS) o infarto miocardico (IM) o ictus²⁰¹. I principali determinanti dell'aumentata vulnerabilità della placca ateromasi sono le dimensioni e la consistenza del nucleo ateromatoso, e l'assottigliamento di entrambi con l'infiammazione del cappuccio fibroso che copre il nucleo. Tale infiammazione si manifesta come infiltrati di monociti / macrofagi, linfociti T e neutrofili all'interno dei tessuti del cappuccio (cappello)²⁰¹, così come aumento dei markers di infiammazione circolanti nel sangue. Il legame tra atherosclerotic vascular disease (ASVD) e mediatori dell'infiammazione nel sangue è ben stabilito, con associazioni coerenti tra i livelli di marcatori infiammatori sistemici e aumenti di eventi clinici come IM e ictus non emorragico, e marcatori surrogati come l'aumento dello spessore intima-media carotideo (cIMT)²⁰².

L'infiammazione sistemica può essere misurata con diversi markers infiammatori. Un marker infiammatorio ben studiato è la proteina C reattiva (CRP). Più di una dozzina di studi epidemiologici prospettici su individui senza storia pregressa di ASVD hanno dimostrato che una singola misura di CRP non a digiuno è un predittore di eventi vascolari futuri, tra cui IM, ictus, arteriopatia periferica e morte cardiaca improvvisa²⁰³. La CRP è un predittore indipendente di eventi cardiovascolari futuri che possono aggiungere informazioni prognostiche allo screening lipidico, alla sindrome metabolica e al punteggio di rischio di Framingham²⁰⁴.

L'infiammazione parodontale è similmente correlata all'aumento dei marcatori infiammatori sistemici, tra cui CRP, fattore di necrosi tumorale, IL-1, IL-6 e IL-8²⁰⁵. L'infiammazione sistemica è associata all'attivazione cellulare che coinvolge

le molecole di adesione cellulare, recettori toll-like, metalloproteinasi della matrice e attivazione del fattore B nucleare. L'interazione risultante tra endotelio, monociti e piastrine potrebbe essere pro-aterogena²⁰⁶, contribuendo indirettamente all'aterogenesi o ad esiti cardiovascolari avversi correlati alla rottura della placca ateromatosa in soggetti con parodontite²⁰⁷. Ci sono anche dati che suggeriscono che il parodonto infiammato produce la CRP a livello locale, ma non è stato determinato in che misura la CRP prodotta localmente sia responsabile di livelli più elevati di CRP nella parodontite²⁰⁸.

5.MATERIALI E METODI

5.1 Disegno e obiettivi dello studio

La ricerca è uno studio clinico sperimentale senza farmaco né dispositivo. Lo studio osservazionale è stato condotto presso la Sezione di Chirurgia Cardiovascolare, Ospedale Universitario di Verona, Verona, Italia. Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Verona (Protocollo n. 21021, data di approvazione 14/04/2020). Lo studio è stato condotto in conformità con i principi etici della 64a dichiarazione della *World Medical Association* di Helsinki in coerenza con le buone pratiche cliniche. Tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato scritto.

L'obiettivo primario è stato quello di indagare la prevalenza di pazienti con malattia parodontale nei pazienti con patologia cardiovascolare e valutare la presenza di batteri parodontopatogeni sia nella placca dentale, che nei campioni cardiaci.

Nella placca dentale sono stati ricercati, mediante tecniche di biologia molecolare (PCR end point e PCR Multiplex) i seguenti parodontopatogeni: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *A. naeslundii*, *T. forsythia* e *T. denticola*.

Nelle valvole cardiache, sono stati ricercati, mediante amplificazione del gene 16sRNA, eventuali batteri presenti.

Gli obiettivi secondari hanno riguardato la valutazione della percentuale di fattori di rischio nei pazienti senza e con parodontite, quali età, genere, fumo, stato di salute a livello cardiovascolare e malattie sistemiche, pregresse endocarditi, abitudini di igiene orale. Questi fattori sono definiti tali in quanto influenzano la risposta dell'organismo all'attacco microbico, sulla base dei dati disponibili in letteratura²⁰⁹.

La valutazione dei fattori di rischio relativi al paziente è stata fatta ai fini di semplice prevalenza e descrizione demografica, tramite la compilazione dell'anamnesi medica, mentre la valutazione delle abitudini di igiene orale domiciliari del paziente è stata valutata tramite l'anamnesi odontoiatrica.

5.2 Campione

La popolazione presa in esame è costituita da un campione di 26 pazienti, che sono stati sottoposti ad intervento cardiocirurgico di sostituzione valvolare, eventualmente associato a by-pass coronarico presso il reparto di Cardiocirurgia dell'Ospedale di Borgo Trento, Verona.

I criteri di inclusione sono stati: essere in lista per sostituzione valvolare e by-pass coronarico; età superiore o uguale ai 35 anni. I criteri di esclusione sono stati: patologie valvolari cardiache o aneurismi dell'aorta congeniti; donne in gravidanza o allattamento; popolazioni particolarmente vulnerabili (situazioni di emergenza valutate dal Cardiocirurgo). Il criterio per l'uscita in itinere dallo studio è stata la mancata partecipazione alla visita odontoiatrica o all'intervento di cardio-chirurgia.

5.3 Prima visita: procedure previste ed informazioni raccolte

Lo studio ha previsto di sottoporre a valutazione parodontale pazienti in lista operatoria per sostituzione valvolare e by-pass coronarico. La valutazione e diagnosi di malattia parodontale è stata effettuata dal Prof. Giorgio Lombardo afferente alla Clinica di Chirurgia Maxillo-facciale e di Odontoiatria dell'Ospedale di Borgo Roma, Verona.

I pazienti sono stati inclusi nello studio il giorno in cui sono stati ricoverati per l'intervento, in seguito alla compilazione dell'anamnesi medica e dopo la valutazione positiva alla possibilità di partecipazione alla ricerca e al consenso del paziente stesso, fornito direttamente al Cardiocirurgo. Il giorno precedente all'intervento è stato prescritto un esame radiografico delle arcate dentarie (ortopantomografia, OPT) per quantificare l'eventuale perdita ossea, indice di malattia parodontale; antecedente alla visita odontoiatrica, è stata prescritta e somministrata dal Cardiocirurgo la profilassi antibiotica, da assumere un'ora prima della seduta odontoiatrica, come indicato nelle linee guida *American Heart Association*²¹⁰.

La seduta, della durata di circa 45 minuti, si è tenuta il giorno prima dell'intervento, al letto del paziente nel reparto di Cardiocirurgia ed è stata effettuata da un Odontoiatra e un Igienista Dentale.

In tale occasione, per ciascun paziente, sono stati raccolti i dati personali, le informazioni relative ad anamnesi medica generale, farmacologica ed odontoiatrica.

5.3.1 Visita parodontale

Nella seconda fase della visita i pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione della condizione dei denti e dello stato parodontale corrente. Con una sonda di Williams sono stati rilevati: la profondità di tasca (Probing Pocket Depth, PPD), rilevata in mm come la distanza tra il margine gengivale e la base della tasca; il sanguinamento al sondaggio (Bleeding on Probing, BOP), valutato 0 per nessun sanguinamento oppure 1 per sanguinamento al sondaggio; l'indice di placca (Visible Plaque Index, VPI) valutato 0 per nessuna presenza di placca o 1 per presenza di placca al sondaggio; i valori del BOP e del VPI sono stati poi espressi in termini percentuali. Sei siti per ogni dente sono stati valutati, tre per la zona del vestibolo (mesiale, vestibolare, distale) e tre per le zone buccali/palatali.

Sono stati classificati come affetti da parodontite i pazienti con profondità di tasca ≥ 4 mm in almeno 4 siti, presenza di sanguinamento al sondaggio e perdita ossea alveolare visibile radiograficamente dall'OPT³¹.

La severità della parodontite è stata misurata attraverso il PRA (Periodontal Risk Assesment), un diagramma funzionale per valutare il rischio di progressione della malattia parodontale di ogni paziente, consiste nel valutare i seguenti parametri: la prevalenza di tasche residue maggiori o uguale a 4 mm, perdita di denti su un totale di 28, perdita di osso di supporto in relazione all'età del paziente, la presenza di malattie sistemiche e i fattori di rischio quali il fumo²¹¹.

5.3.2 Campioni di placca e di tessuto cardiovascolare

I campioni sono stati raccolti durante la visita parodontale il giorno prima dell'intervento di cardio-chirurgia; dopo aver rimosso la placca sopragengivale, è stato isolato con un rullo di cotone sterile il sito maggiormente coinvolto a livello parodontale e attraverso l'uso di un currettes di Gracey è stata campionata la placca (1mg) alla base della tasca. Nei pazienti edentuli è stato eseguito il prelievo di un campione di saliva. I campioni sono stati conservati in doppia provetta, una

conteneva TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) per l'investigazione molecolare tramite PCR, l'altra conteneva tioglicolato (BD Difco) per l'indagine colturale, per un totale di 6 provette per paziente.

Solo per i pazienti edentuli è stato raccolto, sempre in duplice provetta, un campione di saliva.

I campioni sono stati raccolti a fine della visita parodontale.

La valvola cardiaca e/o il tessuto vascolare sono stati campionati, in condizioni asettiche, durante gli interventi chirurgici e conservati a -20°C in una soluzione di Rna later, per poi essere esaminati tramite il sequenziamento del gene 16SrRNA.

5.4 Analisi microbiologiche

Le indagini microbiologiche sono state eseguite dalla Dott.ssa Caterina Signoretto presso il Laboratorio di Microbiologia del dipartimento di Diagnostica e Sanità Pubblica dell'Università di Verona.

I campioni di placca e di saliva, dopo opportuna diluizione in soluzione fisiologica, sono stati seminati su terreni di coltura agarizzati quali Agar Sangue (contenente triptone 10g/L, peptone 5g/L, NaCl 5g/L, sangue defibrinato di montone al 5%) e Agar Schaedler (contenente caseina 5,7g/L, peptone 5g/L, estratto di lievito 5g/L, glucosio 5,8g/L, NaCl 1,7 g/L, sangue defibrinato di montone al 5%), arricchito con emina e vitamina K. Le piastre seminate di Agar Sangue sono state incubate a 37° C per 24 ore in aerobiosi, mentre quelle di Agar Schaedler sono state incubate a 37° C per 48 ore in dedicate giare per anaerobiosi contenenti opportuni sistemi di generazione di atmosfera anaerobica.

I campioni di tessuto cardiaco sono stati estratti attraverso il QIAamp Fast DNA Tissue Kit, QIAGEN, mentre per la placca è stato utilizzato il GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit, Sigma-Aldrich secondo le indicazioni fornite dal produttore. Successivamente, gli estratti sono stati amplificati attraverso reazione a catena della polimerasi (PCR end point e PCR Multiplex) allo scopo di valutare la presenza di batteri parodontopatogeni (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomices naeslundii*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*).

La metodica PCR Multiplex consente di indagare la presenza di più microrganismi batterici in un singolo tubo di reazione di PCR. Più di una sequenza target viene infatti amplificata utilizzando più set di primer. L'amplificazione del gene batterico è stata eseguita utilizzando i primer per indagare la presenza delle seguenti specie batteriche: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces naeslundii*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Streptococcus mutans* (Tab. 1).

Type	Target	Sequence	Reference	PCR	Annealing
F	16s rRNA	CGT GCC AGC AGC CGC GGT AAT ACG	Garcia et al., 2013	mPCR1	70°C
R	PI	TCC GCA TAC GTT GCG TGC ACT CAA G			
R	PG	TAC ATA GAA GCC CCG AAG GAA GAC G			
R	AG	CTT TGC ACA TCA GCG TCA GTA CAT CCC CAA GG			
F	TD	GCA AGA CTT GTA GCG GTA GT	This study	mPCR2	60°C
R	TD	GAT GCC TAT TTG CGG GCT TG			
F	TF	CGG TGG TCT CCA ATC TCA CC			
R	TF	GCC CTC AAC ACA CGA CAC TT			
F	AN	GGA ATG ATG GCG TGA ATG GC			
R	AN	CCG ATC CCG TGA GTA CAT GG			
F	AC	GGC KTG CGG TGG GTA CGGG C	Xia et al., 2003	sPCR	60°C
R	AC	GGC TTT AAG GGA TTC GCT CCR CCT CAC			
F	VE	GTA ACA AAG GTG TCG TTT CTC G	Mashima et al., 2016	sPCR	60°C
R	VE	GCA CCR TCA AAT ACA GGT GTA GC			
F	SM	GGCACCACAACATTGGGAAGCTCAGTT	Nakano et al., 2006	sPCR	70°C
R	SM	GGAATGGCCGCTAAGTCAACAGGAT			

Abbreviazioni: F=forward primer, R=reverse primer, PG=*P.gingivalis*, PI=*P.intermedia*, AG=*A.actinomycetemcomitans*, AN=*A.naeslundii*, TF=*T.forsythia*, TD=*T.denticola*, AC=*Actinomyces* spp., VE=*Veillonella* spp., SM=*S.mutans*.

Tabella 1. Primers and PCR conditions used in the study.

Le valvole cardiache sono state analizzate per la ricerca del gene 16sRNA e quelle risultate positive all'amplificazione, cioè per la presenza di DNA batterico, sono

state in seguito inviate alla BMR Genomics dove si è proceduto al sequenziamento per la successiva identificazione batterica (analisi tassonomica 16S-NGS su DNA²¹²).

Per il tessuto valvolare l'eventuale contaminazione batterica è stata indagata tramite la ricerca del gene 16sRNA presente a livello ribosomiale in tutte le specie batteriche e utilizzato come marcatore batterico. L'esito positivo al test del 16sRNA segnala la presenza di specie batteriche a livello valvolare, ma non permette di identificarle qualitativamente e quantitativamente. Le valvole risultate positive alla presenza di 16sRNA sono state quindi sottoposte ad ulteriori analisi per verificare la presenza nello specifico dei parodontopatogeni o microrganismi di derivazione del cavo orale, già indagati sui campioni di placca/saliva, utilizzando i medesimi primer Mediante tecnologie NGS. Con NGS (Next Generation Sequencing) si intende l'insieme delle tecnologie di sequenziamento degli acidi nucleici che consentono di effettuare milioni di analisi di sequenziamento contemporaneamente sullo stesso campione e su più campioni diversi. Sulle valvole positive ai microrganismi del genere di possibile derivazione del cavo orale è stata quindi eseguita un'ulteriore analisi bioinformatica per arrivare a definirne la specie. Le varianti della sequenza dell'amplicone (ASV) prodotte nei progetti 16S-NGS (trimming adattatori con cutadapt, reads-denoising con DADA2, filtraggio delle ASV per frequenza (0.005%) e costruzione della feature-table finale) sono state processate con un plugin di QIIME2 chiamato feature-classifier, al fine di associare la tassonomia di GreenGenes, Silva e RDP. Le stesse ASV sono state poi allineate contro i database Silva 132, RDP e NCBI (nr) considerando soltanto il best hit. Tutte le tabelle tassonomiche sono state quindi fuse in un'unica tabella usando un programma in python3 appositamente sviluppato per tale scopo.

5.5. Analisi statistica

L'analisi univariata è stata eseguita valutando le ipotesi di normalità per i dati quantitativi con il test di Shapiro-Wilk; la media e la deviazione standard sono state riportate per i dati continui che seguivano una distribuzione normale; in caso contrario, sono stati riportati mediana e range interquartile (iqr); per le variabili

binarie (come VPI, BOP) sono state riportate frequenze assolute, percentuali e intervalli di confidenza al 95%. L'associazione tra variabili categoriali è stata verificata con il test χ^2 ; se uno dei valori attesi fosse stato inferiore a 5, sarebbe stato eseguito un test esatto di Fisher. Il confronto tra le medie di diversi gruppi è stato eseguito utilizzando l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) o il test di Kruskal-Wallis. Il confronto microbiologico tra campioni di placca e campioni cardiovascolari è stato eseguito utilizzando il test Mc Nemar per variabili binarie. Il livello di significatività statistica è stato fissato a 0.05 e le analisi sono state eseguite tramite Stata v.13.0 for Macintosh (StataCorp, College Station, TX, USA).

6. RISULTATI

6.1 Risultati demografici

In totale sono stati arruolati nello studio 26 pazienti (15 di sesso maschile e 11 di sesso femminile), con età media di 72 ± 10 anni (range 49-87 anni).

L'81% dei pazienti è stato sottoposto ad intervento chirurgico di sostituzione valvolare aortica, e nel 19% dei casi, tale intervento è stato associato a chirurgia coronarica di passaggio.

Un paziente presentava pregressa endocardite, il follow-up a tre mesi non ha evidenziato endocarditi secondarie all'intervento.

Tutti i pazienti arruolati nello studio erano di etnia caucasica, ad eccezione di uno di origine asiatica. Solo due pazienti hanno dichiarato di essere fumatori ($6 \pm 1,4$ sigarette/die); sei, sul totale di 26, erano affetti anche da diabete, di cui due in terapia insulinica. Ben 16 pazienti su 26 (62%) erano affetti da ipertensione. 14 pazienti su 26 (53%) assumevano antiaggreganti, 3 su 26 (12%) anticoagulanti, 1 paziente presentava in cartella clinica pregressa endocardite, 2 presentavano una valvulopatia su base reumatica.

Come si evince dalla Tabella 2, il 57,69% dei pazienti ha aderito a un programma di mantenimento di almeno una sessione di igiene orale professionale regolare in un anno, mentre il 23,08% di loro ha dichiarato di utilizzare regolarmente dispositivi per l'igiene orale interprossimale.

Si riporta anche il tipo di esame (sedi dentali o saliva, in caso di paziente edentulo) e il tipo di campione (placca in caso di sedi dentarie, saliva o saliva con placca in caso di paziente edentulo).

Variable	n (%)
Sex	
male	15 (57.69)
female	11 (42.31)
Age	72±10 years
Smoking	
no	24 (92.31)
yes (>25 cigarettes/day)	2 (7.69)
Cardiovascular disease	
Severe aortic valve impairment	3 (11.54)
Severe aortic stenosis	15 (57.69)
Severe aortic stenosis+coronopathy	4 (15.38)
Severe aortic stenosis+severe aortic valve impairment	3 (11.54)
Severe aortic stenosis+severe aortic valve impairment+coronopathy	1 (3.85)
Previous endocarditis episodes	1 (3.84)
Antiplatelets agents assumption	14 (53.84)
Anticoagulants assumption	3 (11.53)
Oral professional hygiene/year	
not regular	4 (15.38)
1/year	15 (57.69)
2/year	7 (26.92)
Use of interproximal oral hygiene devices	
no	20 (76.92)
yes	6 (23.08)
Type of oral examination	
edentulous patient	7 (26.92)
tooth site	19 (73.08)
Type of oral sample	
saliva (edentulous patient)	6 (23.08)
plaque (tooth site)	10 (38.46)
saliva+plaque (edentulous patient)	10 (38.46)

Tabella 2: Risultati Demografici. Variabili correlate al paziente espresse in percentuale (%). N= numero di pazienti; l'età è presentata come media±deviazione standard (DS)

6.2. Risultati dento-parodontali

La Figura 5 e la Tabella 3 mostrano la prevalenza della malattia parodontale nel campione esaminato. In particolare, il 27% dei pazienti è edentulo, il 15% sano dal punto di vista parodontale (definito "No perio" in Figura 5), il 58% affetto da parodontite, di cui il 12% da parodontite severa ed il 46% da parodontite moderata.

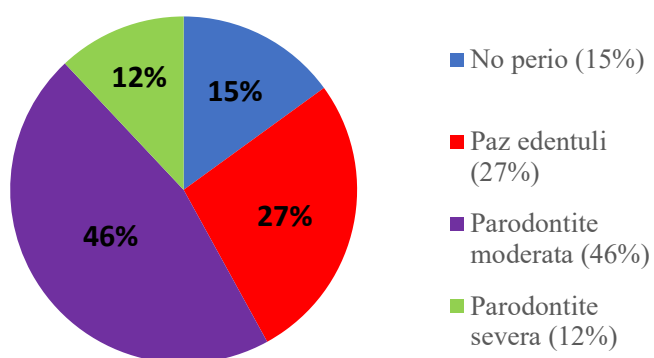


Figura 5: Fotografia del campione arruolato.

Periodontal status	n (%)
periodontal health	4 (15.38)
moderate periodontitis	12 (46.15)
severe periodontitis	3 (11.54)
edentulous (tooth loss caused by periodontitis)	7 (26.92)

Tabella 3: Distribuzione dei pazienti rispetto allo stato parodontale, espressa come espressa in percentuale (%). N= numero di pazienti.

19 pazienti non edentuli (Fig. 6) sono stati sottoposti a sondaggio e cartella parodontale per la valutazione dello status del cavo orale. Di questi, 12 (63%) manifestavano segni di parodontite moderata (almeno 4 siti con PPD \geq 4 mm), mentre 3 (16%) di parodontite severa (PPD >5 mm), La causa principale di edentulia riferita dagli altri 7 pazienti è stata la mobilità (100%); solo un paziente ha dichiarato come seconda causa la carie dentale.

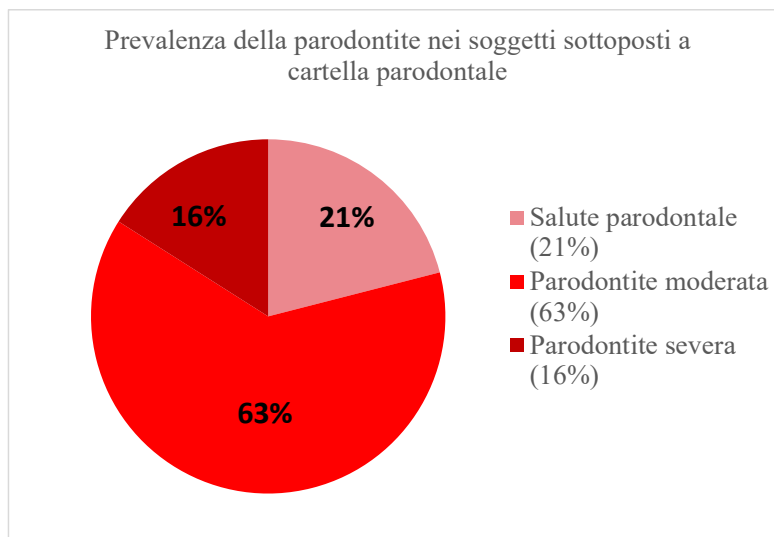


Figura 6: Prevalenza della parodontite nei soggetti sottoposti a cartella parodontale (non edentuli).

Si riporta di seguito (Tab. 4) la valutazione dei tessuti molli per tutti i pazienti sani e parodontali: il PPD medio era di 4,2 mm e le percentuali medie per BOP e VPI erano rispettivamente del 14% e del 22%. Inoltre, è stata trovata una differenza statisticamente significativa ($p = 0,04$) per il PPD tra pazienti sani, pazienti con parodontite moderata e pazienti con parodontite grave.

	Overall	Periodontal status			p-value
		periodontal health	moderate periodontitis	severe periodontitis	
PPD [mm]	4.2 (0.5)	4.2 (0.25)	4.2 (0.2)	4.6 (1.4)	0.04 *
BOP (%)	14 ± 12	4 ± 3	17 ± 11	20 ± 17	0.12
VPI (%)	22 (43)	33 (61)	21 (52)	56 (34)	0.52
CAL [mm]	4.4 (0.6)	4.4 (0.4)	4.3 (0.4)	5 (1)	0.051
Tooth loss	12 (7)	10 (3)	11 (7)	14 (10)	0.77
PRA	2 (1)	2 (1)	2 (1)	3 (1)	0.22

Tabella 4: Variabili relative allo stato parodontale, espresse come media ± deviazione standard o mediana (iqr, range interquartile); PPD e CAL sono espressi in [mm]; BOP e VPI sono espressi in (%).

In entrambi i gruppi di soggetti, parodontali e non parodontali, l'indice di placca è risultato elevato, dato che trova conferma con quanto riferito dai pazienti nel corso del colloquio orale, tenutosi in occasione della prima visita.

Le risposte date dai pazienti fanno emergere come la compliance all'igiene orale domiciliare e la cura verso il cavo orale siano tendenzialmente trascurate: il 35% dei pazienti dichiara di dedicarsi a manovre di igiene orale domiciliari una sola volta al giorno; il 58% non si sottopone regolarmente (o non si è sottoposto, nel caso dei pazienti edentuli) a sedute di igiene orale professionale, e ben il 62% non si sottopone regolarmente a visite dentistiche di controllo, ma vi si reca solo in caso di urgenza (Figg. 7-9).

Per quanto riguarda le abitudini di igiene orale domiciliari il totale dei pazienti dichiara di utilizzare lo spazzolino, il 23% di utilizzare presidi per l'igiene orale interprossimale (Fig. 8).

Per quanto concerne la perdita degli elementi dentali, diversi pazienti hanno riferito come causa la mobilità, pertanto la maggior perdita di elementi tra il gruppo non parodontale e il gruppo parodontale potrebbe essere legata ad esiti di pregressa malattia parodontale; tuttavia si tratta solo di supposizioni basate su quanto riportato dai pazienti. Alcuni infatti affermavano di non ricordare il motivo per cui i denti fossero stati persi o estratti.

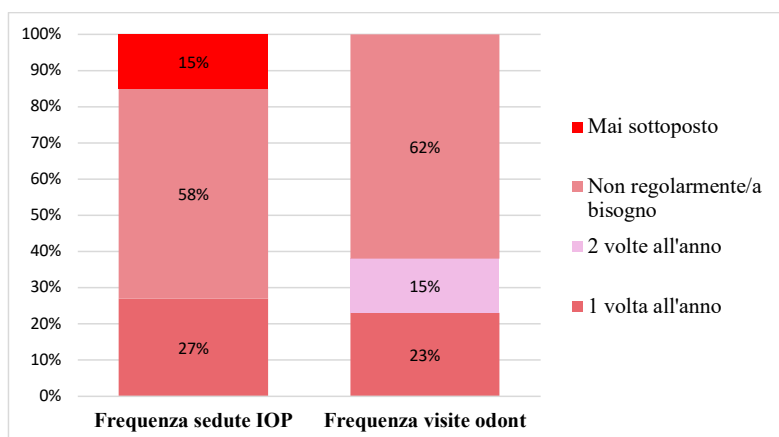


Figura 7: Frequenza visite odontoiatriche e sedute di igiene orale professionale (IOP).

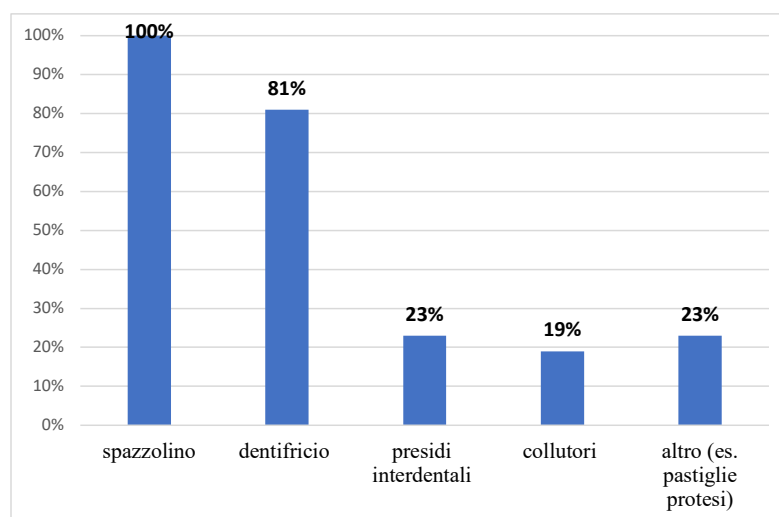


Figura 8: Abitudini di igiene orale domiciliare.

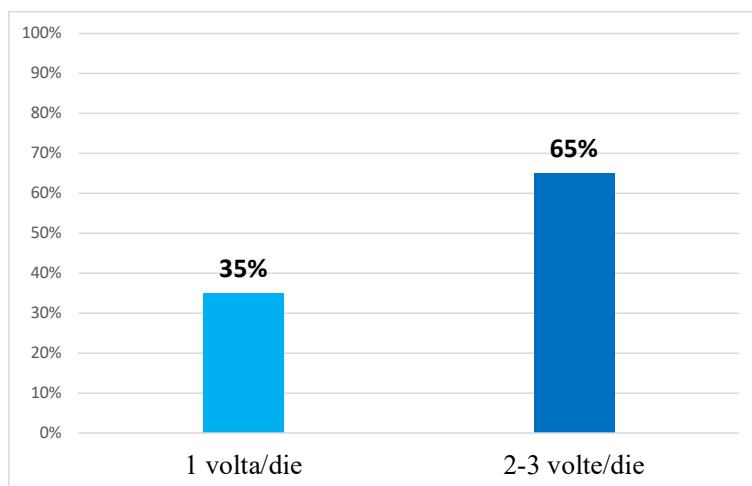


Figura 9: Frequenza manovre di igiene orale domiciliare.

Di seguito si riportano la frequenza di visite odontoiatriche, di sedute di igiene orale professionale, di abitudini di igiene orale domiciliare e la frequenza di manovre di igiene orale, confrontate tra pazienti parodontali e pazienti non parodontali (Figg. 10-13). Si riscontra come i pazienti parodontali si presentino con maggior frequenza per i controlli odontoiatrici rispetto a quelli non parodontali, tuttavia le visite semestrali sono insufficienti per arrestare la patologia parodontale.

Per quanto riguarda invece le abitudini di igiene orale domiciliare, non si riscontra una differenza significativa tra i due gruppi.

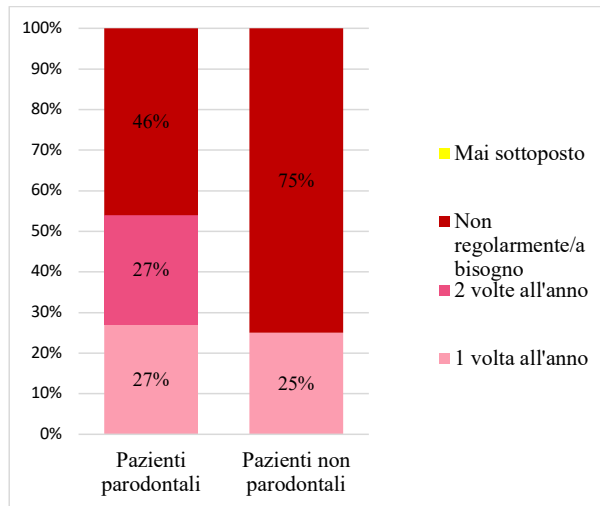


Figura 10: Frequenza visite odontoiatriche tra pazienti parodontali e non parodontali

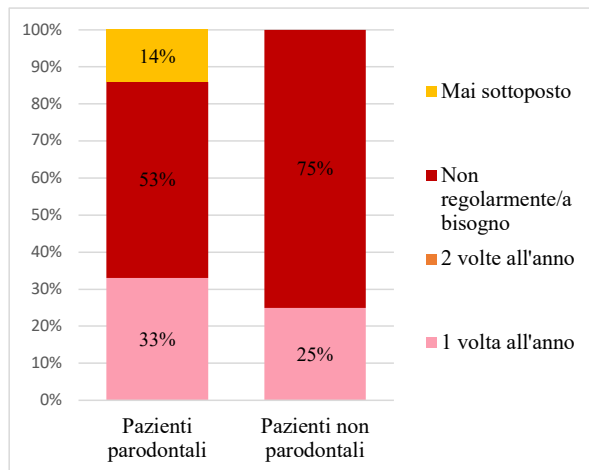


Figura 11: Frequenza sedute di igiene orale professionale (IOP) tra pazienti parodontali e non parodontali

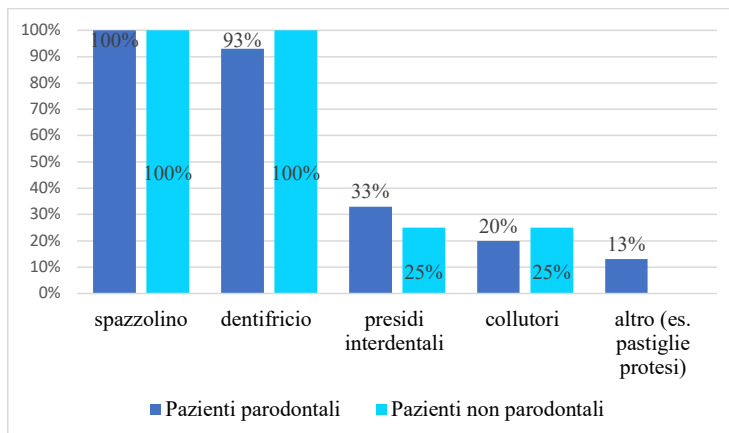


Figura 12: Abitudini di igiene orale domiciliare in pazienti parodontali e non parodontali

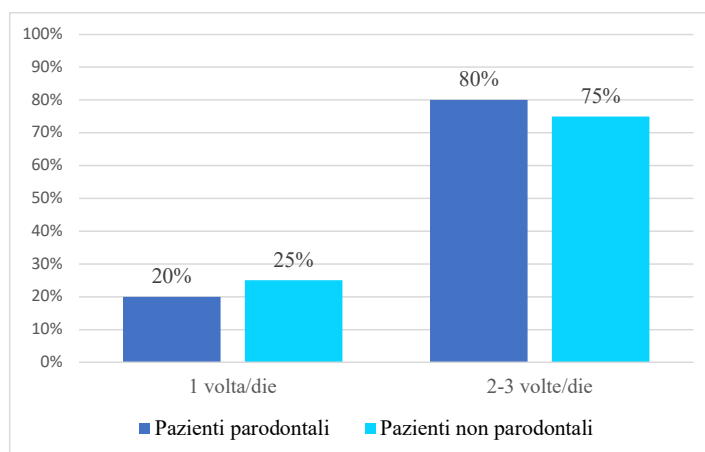


Figura 13: Frequenza manovre di igiene orale domiciliare in pazienti parodontali e non parodontali

6.3 Risultati microbiologici sui campioni di placca subgingivale/saliva

I campioni di placca subgingivale o di saliva per i pazienti edentuli sono stati sottoposti ad analisi microbiologica Culturale e tramite PCR end point e PCR Multiplex per indagare la presenza delle seguenti specie batteriche:

P. gingivalis - *P. intermedia* - *A. actinomycetemcomitans* - *A. naeslundii* - *T. forsythia* - *T. denticola* - *S. mutans*.

Per quanto riguarda l'analisi culturale nei campioni di placca e saliva si è osservata una distribuzione maggiore di batteri anaerobi rispetto agli aerobi, come riportato nella Figura 20.

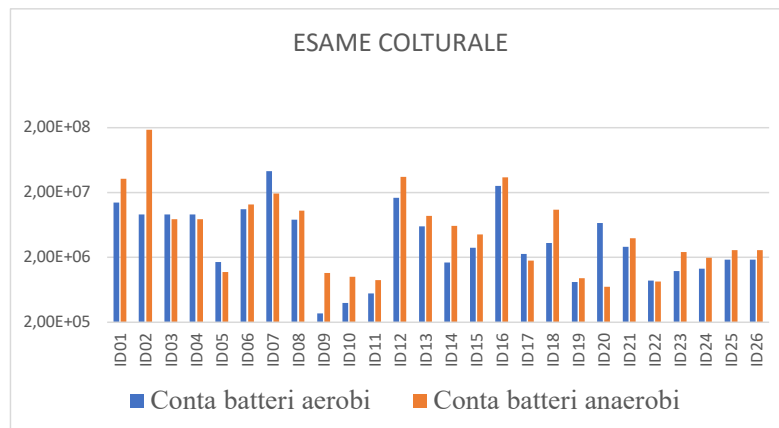


Figura 20: Distribuzione Conta batteri aerobi-anaerobi

In particolare, si è riscontrato un conteggio di batteri anaerobi maggiore rispetto agli aerobi in 19 pazienti su 26, di questi 19, 10 sono risultati essere pazienti parodontali (2 con parodontite severa, 6 sono edentuli e 3 pazienti non parodontali).

Tutti i campioni analizzati sono risultati positivi alla presenza di almeno 2 dei patogeni indagati con metodica PCR.

Di seguito (Tabella 5, Figure 21 e 22) sono riportate le frequenze assolute e relative delle varie specie batteriche in relazione al totale dei pazienti arruolati (26) e al totale dei campioni raccolti (60).

	Frequenza assoluta - (pazienti)	Frequenza assoluta (campioni)	Frequenza relativa n% (pazienti)	Frequenza relativa n% (campioni)
<i>P. gingivalis</i>	21	43	81%	72%
<i>P. intermedia</i>	26	60	100%	100%
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	26	56	100%	93%
<i>T. denticola</i>	5	8	19%	13%
<i>T. forsythia</i>	17	35	65%	58%
<i>A. naeslundii</i>	16	30	62%	50%
<i>S. mutans</i>	6	13	23%	22%

Tabella 5: Frequenze assolute e relative.

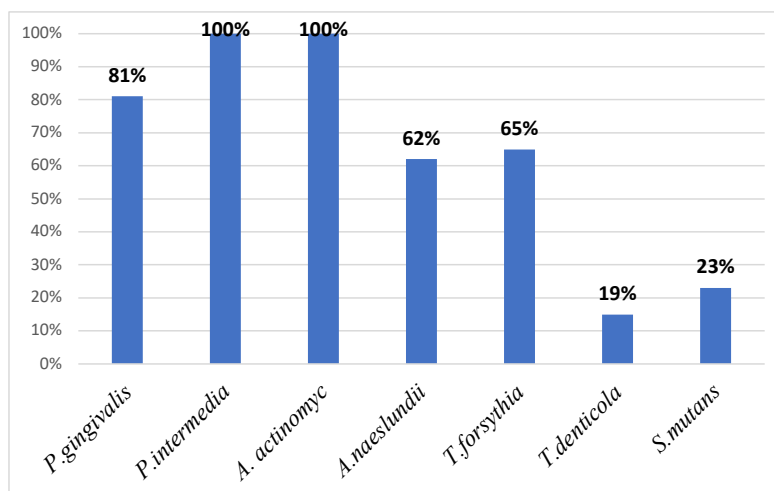


Figura 21: Prevalenza dei batteri parodontopatogeni nel campione di 26 pazienti (%).

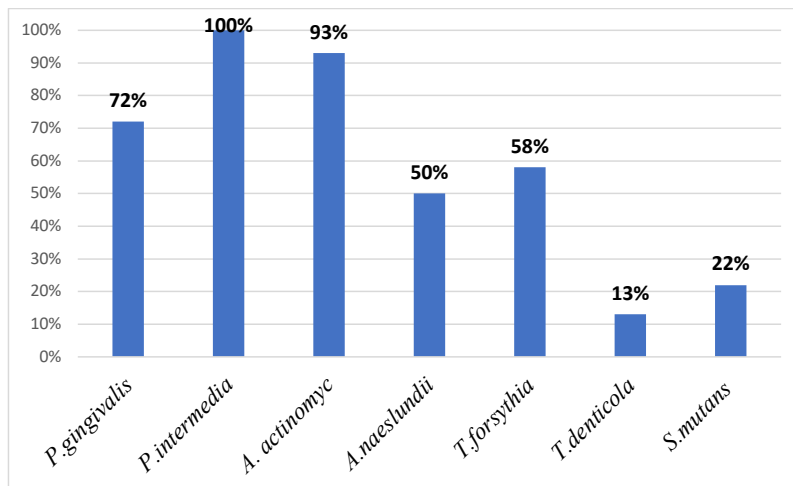


Figura 22: Prevalenza dei batteri parodontopatogeni nel totale dei campioni raccolti (%).

Di seguito si riporta la prevalenza dei batteri parodontopatogeni confrontando i pazienti parodontali e quelli non parodontali (Fig. 23).

Viene anche rappresentata la stessa prevalenza solo nei pazienti edentuli (Fig. 24).

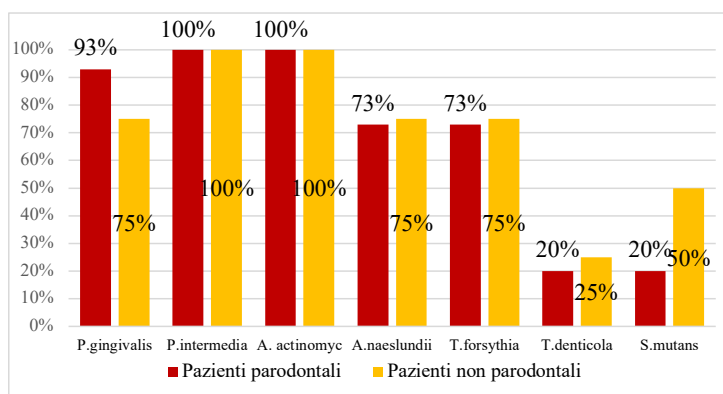


Figura 23: Prevalenza dei batteri parodontopatogeni nel campione placca dei 19 pazienti dentati (%). Perio vs Non-Peri

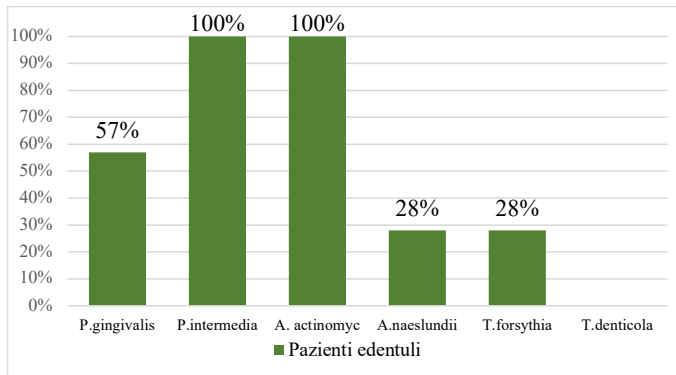


Figura 24: Prevalenza dei batteri parodontopatogeni nel campione di saliva dei 7 pazienti edentuli (%)

Per ulteriore approfondimento, è riportata l'incidenza dell'analisi colturale dei batteri orali e parodontopatogeni nei vari gruppi identificati: pazienti parodontali, non parodontali ed edentuli (Figg. 25-31).

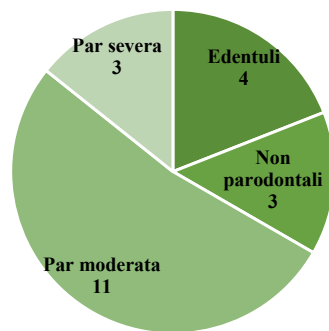


Figura 25: *P. gingivalis* (n = 21).

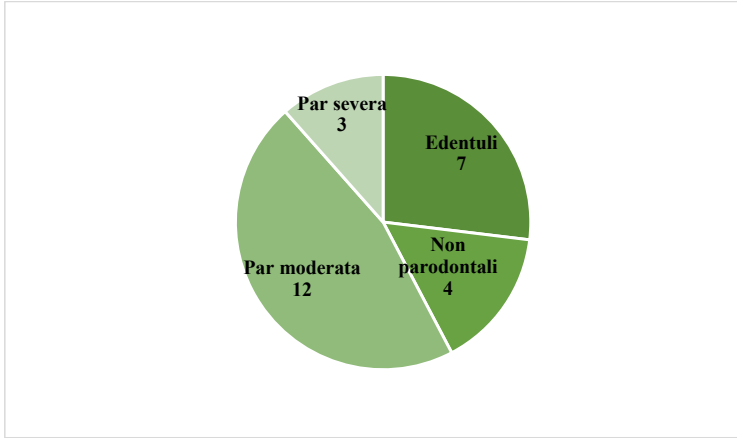


Figura 26: *P. intermedia* (n = 26).

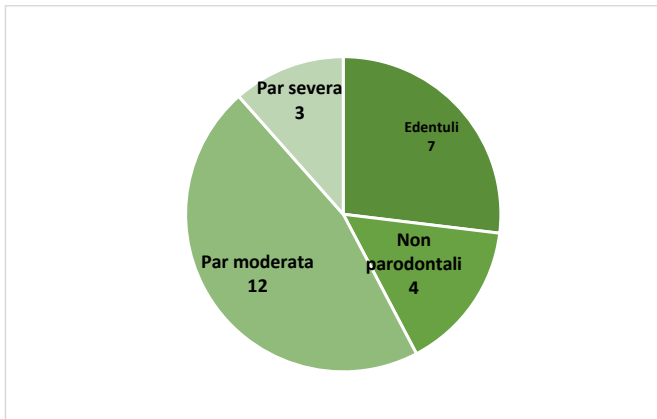


Figura 27: *A. actinomycetemcomitans* (n = 26).

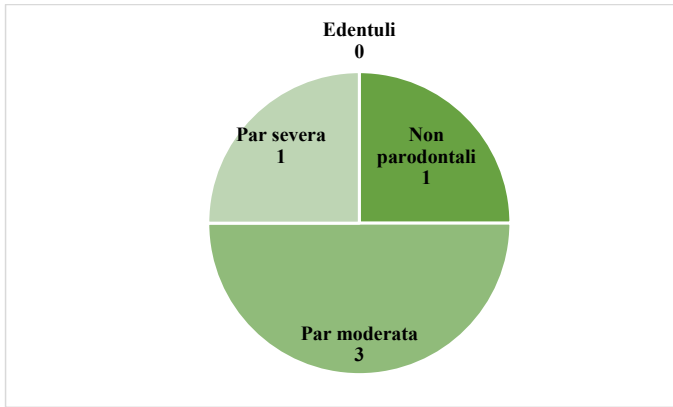


Figura 28: *T. denticola* (n = 5).

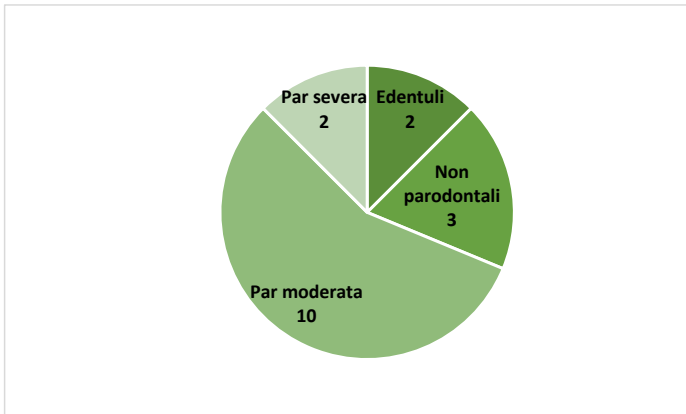


Figura 29: *T. forsythia* (n = 17).

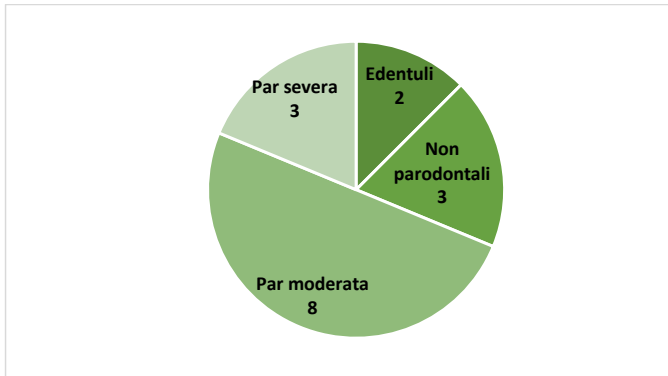


Figura 30: *A. naeslundii* (n = 16).

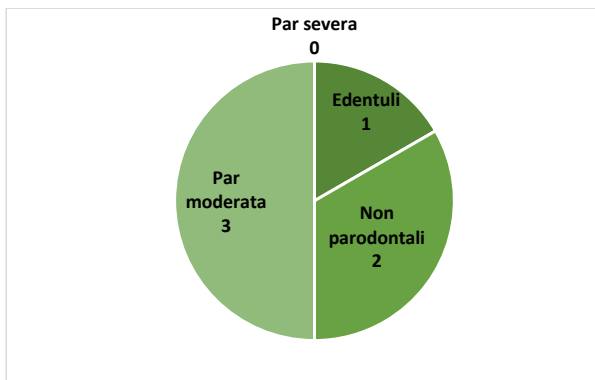


Fig. 31: *S. mutans* (n = 6)

Complessivamente, grazie ai dati ottenuti tramite PCR, è stata riscontrata la presenza di DNA genomico appartenente a batteri parodontali (in particolare *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* e *A. naeslundii*) in tutti i pazienti dei tre gruppi analizzati con una maggior prevalenza nei soggetti con malattia parodontale moderata.

Tutte le specie batteriche si sono dimostrate presenti con prevalenza maggiore nei soggetti parodontali rispetto ai soggetti appartenenti agli altri gruppi, mentre *S.*

mutans è presente in quantità simili nei soggetti con parodontite moderata e nei pazienti non parodontali, e assente in quelli con parodontite severa. Solo tre pazienti, classificati come parodontali, hanno riscontrato la presenza di *T. denticola*, agente di malattia parodontale avanzata.

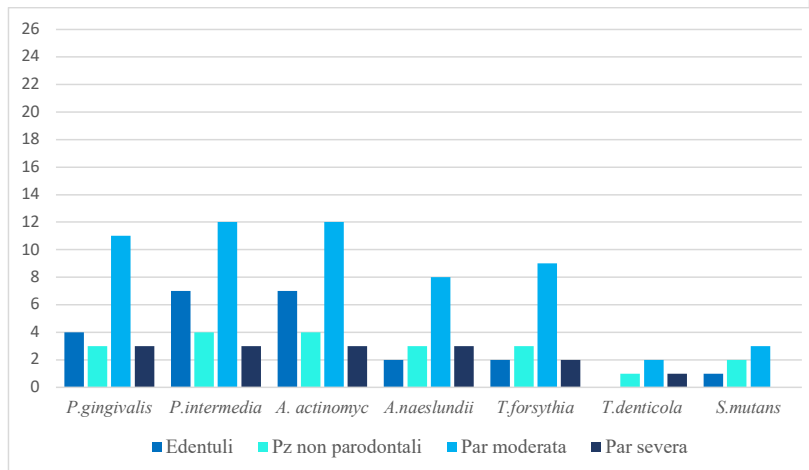


Figura 32: Distribuzione dei parodontopatogeni e non parodontopatogeni nel campione arruolato.

Dal punto di vista statistico, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella distribuzione dei batteri rinvenuti nella placca tra pazienti sani, pazienti con parodontite moderata, pazienti con parodontite grave e pazienti edentuli (Tab. 6).

Oral samples	Overall	Periodontal status				p-value
	n (%)	oral health n (%)	moderate periodontitis n (%)	severe periodontitis n (%)	edentulous n (%)	
<i>P. gingivalis</i>						
no	5 (19.23)	1 (25.00)	1 (8.33)	0 (0.00)	3 (42.86)	0.28
yes	21 (80.77)	3 (75.00)	11 (91.67)	3 (100.00)	4 (57.14)	
<i>P. intermedia</i>						
no	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	/
yes	26 (100.00)	4 (100.00)	12 (100.00)	3 (100.00)	7 (100.00)	
<i>A. actinomycetem comitans</i>						
no	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	/
yes	26 (100.00)	4 (100.00)	12 (100.00)	3 (100.00)	7 (100.00)	
<i>T. denticola</i>						
no	21 (80.77)	3 (75.00)	9 (75.00)	2 (66.67)	7 (100.00)	0.39
yes	5 (19.23)	1 (25.00)	3 (25.00)	1 (33.33)	0 (0.00)	
<i>A. naeslundii</i>						
no	10 (38.46)	1 (25.00)	4 (33.33)	0 (0.00)	5 (71.43)	0.18
yes	16 (61.54)	3 (75.00)	8 (66.67)	3 (100.00)	2 (28.57)	
<i>S. mutans</i>						
no	20 (76.92)	2 (50.00)	9 (75.00)	3 (100.00)	6 (85.71)	0.55
yes	6 (23.08)	2 (50.00)	3 (25.00)	0 (0.00)	1 (14.29)	
<i>T. forsythia</i>						
no	9 (34.62)	1 (25.00)	3 (25.00)	1 (33.33)	4 (57.14)	0.59
yes	17 (65.38)	3 (75.00)	9 (75.00)	2 (66.67)	3 (42.86)	

Tabella 6: Presenza di batteri nei campioni di placca dentale; i valori sono espressi come n (%).

6.4 Risultati microbiologici sui campioni di tessuto cardiaco

Nel corso dello studio sono state campionate le valvole aortiche patologiche di tutti e 26 i pazienti arruolati. I risultati microbiologici riguardanti le valvole positive sono stati eseguiti con la metodologia METABARCODING che prevede il sequenziamento di un frammento del di rRNA 16S. Il limite di questa metodica è la possibilità di non riuscire a distinguere tra due specie diverse appartenenti allo stesso genere. Tuttavia, i risultati ottenuti hanno permesso di avere un'immagine generica della comunità microbica presente nelle valvole campionate, che in situazioni di salute fisiologica non dovrebbe essere presente sulle stesse.

Le valvole negative alla presenza batterica sono state 15 (58%) su 26: di queste 8 (53%) non sono di pazienti parodontali, 5 (33%) sono di pazienti con parodontite moderata, 2 (14%) di pazienti con parodontite severa.

Le valvole positive per microrganismi di origine orale ed extra-orale/ambientale sono risultate essere 11 (42%) su 26; di queste, 9 (82%) sono correlate a batteri di derivazione del cavo orale. Le 9 valvole positive ai batteri del cavo orale appartenevano 7 (78%) a pazienti parodontali, tra cui 6 (86%) con parodontite moderata e 1 (14%) con parodontite severa mentre i restanti 2 (28%) erano pazienti sani (Tab. 6).

Le due valvole positive per la presenza di microrganismi non di derivazione orale appartengono ad un paziente edentulo e ad un paziente con malattia parodontale moderata.

Dalla raccolta anamnestica si è potuto constatare che la totalità dei pazienti non segue i protocolli per la cura della malattia parodontale, nè le cure di prevenzione per le patologie dei tessuti molli e duri.

Nelle valvole positive per la presenza di batteri orali, solo 3 (33%) pazienti eseguono un'igiene orale professionale una volta all'anno; i restanti 6 (67%) la eseguono irregolarmente o per nulla. Nelle valvole negative, 6 pazienti sono risultati essere edentuli, pertanto esenti da cure di prevenzione e igiene orale; dei restanti la maggior parte (47%) non esegue regolari controlli di igiene orale nonostante la parodontite.

Inserendo le due valvole negative per i batteri del cavo orale nel gruppo delle valvole puramente negative ci sono 17 casi totali di cui il 41% non esegue controlli regolari, mentre il 18 % esegue i controlli solo una volta all'anno.

La totalità degli edentuli ha dimostrato di possedere valvole negative per la ricerca di microrganismi del cavo orale. Correlando inoltre la perdita degli elementi dentali alla positività o meno delle valvole alla presenza di batteri orali, nel gruppo di valvole positive i pazienti mostrano una media di 9 elementi persi versus una media di 13 elementi persi nel gruppo di valvole negative.

Le analisi microbiologiche mostrano 11 valvole positive su 26 al marcatore 16sRNA (n. 2, 3, 4, 9, 13, 17, 18, 20, 21, 22, 23); di queste 9 sono risultate essere positive per la ricerca di microrganismi orali.

A seguire sono elencati i batteri riscontrati con la frequenza % nel campione di 9 valvole.

Streptococcus periodonticum (44 %)

Streptococcus mutans (33 %)

Streptococcus sinensis (11 %)

Streptococcus infantis (11 %)

Streptococcus parasanguinis (11 %)

Fusobacterium nucleatum (11 %)

Fusobacterium periodonticum (11 %)

Porphyromonas pasteri (11 %)

Aggregatibacter segnis (11 %)

Nella Tabella 7 si riportano le medie di alcuni dati anamnestici descrittivi per valvole positive e negative.

	Tutte le valvole	Valvole positive alla presenza di batteri	Valvole negative alla presenza di batteri
N. pazienti	26	11	15
Età media, (n ± SD)	72,6 ± 9,9	69 ± 12,5	75,3 ± 6,7
maschi, n (%)	15 (57,7%)	9 (81,8%)	6 (40%)
femmine, n (%)	11 (42,3%)	2 (18%)	9 (60%)
NGS positivo per batteri orali, n (%)	9 (34,6%)	9 (81,8%)	0

Tabella 7: Dati anamnestici descrittivi per valvole positive e negative

Per ulteriore approfondimento si riportano i risultati ottenuti dall'analisi di sequenza dell'rRNA 16S eseguito per ogni valvola risultata positiva alla presenza batterica e gli ulteriori risultati bioinformatici nei casi in cui sia la positività ai batteri del cavo orale.

VALVOLA 2			
AMBIENATALI/UMANI	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>columnare</i>	0.04
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>succinicans</i>	3.18
U	<i>Acinetobacter</i>	<i>guillouiae</i>	0.1
U	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	0.11
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	0.02
A	<i>Polynucleobacter</i>	<i>sinensis</i>	0.22
A	<i>Limnohabitans</i>	<i>curvus</i>	0.05
A	<i>Limnohabitans</i>	<i>parvus</i>	0.11
A	<i>Fluviicola</i>	<i>hefeinensis</i>	0.15
U	<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	0.09
A/U	<i>Pseudomonas</i>	<i>brenneri</i>	0.07
U	<i>Streptococcus</i>	<i>periodonticum</i>	0.06
U	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	0.06
A	<i>Collimonas</i>	<i>pratensis</i>	0.05

Tabella 8: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 2

L'analisi della valvola n.2 mostra una positività allo *Streptococcus periodonticum*, microrganismo di derivazione orale correlato alle lesioni parodontali. Dal punto di vista clinico il paziente ID02 mostra una parodontite moderata con un indice di placca (VPI) del 22% e un indice di sanguinamento (BOP) del 6%. La profondità di tasca media (PPD), parametro fondamentale per la valutazione di malattia parodontale, è di 4,2 mm.

VALVOLA 3			
AMBIENATALI/UMAN I	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
U	<i>Streptococcus</i>	<i>mutans</i>	99.05
U	<i>Paracoccus</i>	<i>laeviglucoovorans</i>	0.12
A	<i>Pseudomonas</i>	<i>veronii</i>	0.09
U	<i>Roseomonas</i>	<i>mucosa</i>	0.08
A	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	0.07
A	<i>Corynebacterium</i>	<i>unclassified</i>	0.03
A	<i>Methylobacterium</i>	<i>adhaesivum</i>	0.01

Tabella 9: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 3

Anche l'analisi della valvola n.3 mostra positività a microrganismi di derivazione orale. Lo *Streptococcus mutans* con un'abbondanza relativa del 99.05% è predominante nella popolazione batterica. Dal punto di vista clinico il paziente ID03 presenta parodontite moderata, con un indice di placca elevato (VPI%) dell'88%, un indice di sanguinamento (BOP) del 23% e profondità di sondaggio (PPD) di 4,1 mm. Il paziente ha una storia di pregressa endocardite batterica.

VALVOLA 4			
AMBIENATALI/UMANI	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
U	<i>Neisseriae</i>	<i>subflava</i>	18.54
U	<i>Neisseriae</i>	<i>unclassified</i>	0.38
U	<i>Neisseriae</i>	<i>bacilliformis</i>	0.06
U	<i>Streptococcus</i>	<i>parasanguinis</i>	5.91
U	<i>Streptococcus</i>	<i>sinensis</i>	0.34
U	<i>Streptococcus</i>	<i>periodonticum</i>	0.37
A	<i>Corynebacterium</i>	<i>unclassified</i>	1.84
U	<i>Haemophilus</i>	<i>parainfluenzae</i>	7.49
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	5.44
A	<i>Rheinheimera</i>	<i>unclassified</i>	4.83
A	<i>Propionibacterium</i>	<i>acnes</i>	4.77
U	<i>Propionibacterium</i>	<i>granulosum</i>	0.03
U	<i>Actinobacillus</i>	<i>oris</i>	4.5
U	<i>Fusobacterium</i>	<i>periodonticum</i>	0.55
U	<i>Porphyromonas</i>	<i>pasteri</i>	0.26
U	<i>Prevotella</i>	<i>nanceiensis</i>	0.11
U	<i>Prevotella</i>	<i>pleuriditis</i>	1.16
U	<i>Achromobacter</i>	<i>agilis</i>	0.4

Tabella 10: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 4

L'analisi della valvola n.4 mostra una maggior diversificazione di microrganismi di derivazione orale, tra i quali *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus periodonticum*, *Fusobacterium periodonticum* e *Porphyromonas pasteri*. Lo *Streptococcus parasanguinis* e *S. sinensis* sono batteri gram-positivi del genere degli streptococchi, lo *S. parasanguinis* è riconosciuto come uno dei maggiori colonizzatori della superficie dentale nella cavità orale. Lo *Streptococcus periodonticum* è stato isolato nella placca sottogengivale di lesioni parodontali. *Fusobacterium periodonticum* è stato riscontrato con un'abbondanza relativa dello 0.55, della famiglia del *Fusobacterium nucleatum* è isolato nelle lesioni

parodontali. *Porphyromonas pasteri* è un batterio Gram-negativo isolato nella saliva umana ed in particolare nei pazienti parodontali.

Dal punto di vista clinico il paziente ID04 presenta parodontite severa, con un indice di placca (PI%) e un indice di sanguinamento (BOP%) non troppo elevati, rispettivamente del 27% e 14%. Invece, la profondità di sondaggio (PPD) è di 4,4 mm.

Porphyromonas pasteri è un batterio gram negativo isolato nella saliva umana ed in particolare nei pazienti parodontali.

Dal punto di vista clinico il paziente ID04 presenta parodontite severa, con un indice di placca (PI%) e un indice di sanguinamento (BOP%) non troppo elevati, rispettivamente del 27% e 14%. Invece, la profondità di sondaggio (PPD) è di 4,4

VALVOLA 9			
AMBIENATALI/UMANI	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
U	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	1.39
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	0.36
A	<i>Rhodferax</i>	<i>unclassified</i>	1.43
A	<i>Novosphingobium</i>	<i>unclassified</i>	1.0
A	<i>Flectobacillus</i>	<i>unclassified</i>	0.9
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>unclassified</i>	0.74
A	<i>Methylobacterium</i>	<i>unclassified</i>	0.29
A	<i>Methylobacterium</i>	<i>adhaesivum</i>	0.26
A	<i>Methylobacterium</i>	<i>organophilum</i>	0.1
A	<i>Zoogloea</i>	<i>unclassified</i>	0.52
U	<i>Clostridium</i>	<i>celatum</i>	0.26
U	<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	0.19
U	<i>Clostridium</i>	<i>unclassified</i>	0.04
A	<i>Polaromonas</i>	<i>unclassified</i>	0.46
A/U	<i>Weeksella</i>	<i>unclassified</i>	0.44
U	<i>Actinobacillus</i>	<i>rubiinfantis</i>	0.18
U	<i>Streptococcus</i>	<i>rubneri</i>	0.14
U	<i>Streptococcus</i>	<i>periodonticum</i>	0.12
U	<i>Treponema</i>	<i>zuelzeriae</i>	0.02

Tabella 11: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 9

L'analisi della valvola n.9 mostra positività allo *Streptococcus periodonticum*, microrganismo associato alle lesioni parodontali, un altro streptococco da segnalare è *Streptococcus rubneri* isolato nella gola umana. Dal punto di vista clinico il paziente ID09 non presenta segni di malattia parodontale, seppur l'indice di placca (PI%) risulti moderatamente elevato: 48%. L'indice di sanguinamento (BOP) invece ha valore basso di 8%, mentre la profondità di sondaggio (PPD) è di 4 mm.

VALVOLA 13			
AMBIENATALI/UMANI	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>unclassified</i>	1.04
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>succinicans</i>	0.06
A	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	0.22
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>unclassified</i>	0.44
A	<i>Acinetobacter</i>	<i>guillouiae</i>	0.02
A	<i>Novosphingobium</i>	<i>unclassified</i>	0.31
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>unclassified</i>	0.26
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>wittichii</i>	0.03
A	<i>Rhodiferax</i>	<i>unclassified</i>	0.27
U	<i>Moraxella</i>	<i>unclassified</i>	0.25
A	<i>Chryseobacterium</i>	<i>unclassified</i>	0.25
U	<i>Staphylococcus</i>	<i>unclassified</i>	0.22
A	<i>Polaromonas</i>	<i>unclassified</i>	0.2
U	<i>Pseudomonas</i>	<i>fragi</i>	0.14
A/U	<i>Pseudomonas</i>	<i>stutzeri</i>	0.03
A/U	<i>Pseudomonas</i>	<i>unclassified</i>	0.01
A	<i>Pseudomonas</i>	<i>viridiflava</i>	0.01
U	<i>Aggregatibacter</i>	<i>segnis</i>	0.03
U	<i>Fusobacterium</i>	<i>nucleatum</i>	0.15
U	<i>Treponema</i>	<i>porcicum</i>	0.01

Tabella 12: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 13

L'analisi della valvola n.13 mostra positività ai microrganismi umani-oralì tra cui *Fusobacterium nucleatum*, tipicamente associati a malattia parodontale, e l'*Aggregatibacter segnis* correlato alla presenza di placca batterica o ritrovato nelle nicchie gengivali. Il paziente dallo studio della cartella clinica presenta una valvulopatia su base reumatica. Dal punto di vista clinico il paziente ID13 mostra parodontite moderata con bassi livelli sia dell'indice di placca (PI%) al 21% che dell'indice di sanguinamento (BOP) al 12%. La profondità di sondaggio (PPD) risulta invece di 4,3 mm.

VALVOLA 17			
AMBIENATALI/UMANI	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
U	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	0.23
U	<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	0.07
A/U	<i>Clostridium</i>	<i>unclassified</i>	0.2
U	<i>Spretococcus</i>	<i>mutans</i>	0.19
A	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	0.07
U	<i>Acinetobacter</i>	<i>guillouiae</i>	0.03
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>unclassified</i>	0.07
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>unclassified</i>	0.12
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>succinicans</i>	0.02
A	<i>Novosphingobium</i>	<i>unclassified</i>	0.09
A	<i>Rhodobacter</i>	<i>unclassified</i>	0.08
A	<i>Kaistobacter</i>	<i>unclassified</i>	0.08
U	<i>Achromobacter</i>	<i>deleyi</i>	0.08
A	<i>Candidatus Rhodoluna</i>	<i>unclassified</i>	0.08

Tabella 13: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 17

L'analisi della valvola n.17 mostra positività al microorganismo *S. mutans* di derivazione del cavo orale. Dal punto di vista clinico il paziente ID17 presenta parodontite moderata, con alto indice di placca (PI%) del 53%. L'indice di sanguinamento (BOP) è invece del 18% e la profondità di sondaggio (PPD) di 4,3 mm.

VALVOLA 18			
AMBIENATALI/UMANI	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
A	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	0.13
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	0.04
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>indicus</i>	0.52
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>unclassified</i>	0.42
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>succinicans</i>	0.08
A	<i>Novosphingobium</i>	<i>taihuense</i>	0.39
A	<i>Novosphingobium</i>	<i>capsulatum</i>	0.02
U	<i>Clostridium</i>	<i>celatum</i>	0.03
U	<i>Clostridium</i>	<i>butyricum</i>	0.04
U	<i>Clostridium</i>	<i>bowmanii</i>	0.03
A	<i>Weeksella</i>	<i>unclassified</i>	0.35
A	<i>Flectobacillus</i>	<i>unclassified</i>	0.34
A	<i>Rhodoferax</i>	<i>unclassified</i>	0.31
A	<i>Polaromonas</i>	<i>unclassified</i>	0.29
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>echinoides</i>	0.24
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>wittichii</i>	0.02
A	<i>Rhodobacter</i>	<i>unclassified</i>	0.25
U	<i>Streptococcus</i>	<i>mutans</i>	0.02
U	<i>Streptococchi</i>	<i>luteciae</i>	0.02
U	<i>Treponema</i>	<i>unclassified</i>	0.03
U	<i>Achromobacter</i>	<i>xylosoxidans</i>	0.02

Tabella 14: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 18

L'analisi della valvola n.18 mostra positività ai microrganismi umani *Streptococcus mutans* e *Treponema* spp. Per quanto riguarda il genere *Treponema* non si è riusciti ad identificarlo a livello di specie; potrebbe comunque essere di derivazione orale relativamente al *treponema denticola* riscontrato nelle lesioni parodontali.

Dal punto di vista clinico il paziente ID18 presenta parodontite moderata con massimo valore al 100% dell'indice di placca (PI%) e basso valore dell'indice di sanguinamento (BOP) del 19%. La profondità di sondaggio (PPD) è di 4 mm.

VALVOLA 20			
AMBIENATALI/UMANI	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
A	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	0.73
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	1.99
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>unclassified</i>	0.79
U	<i>Streptococcus</i>	<i>infantis</i>	0.18
U	<i>Streptococcus</i>	<i>periodonticum</i>	0.71
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>unclassified</i>	0.68
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>succinicans</i>	0.01
A	<i>Novosphingobium</i>	<i>soli</i>	0.36
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>gotjavalisoli</i>	0.32
A	<i>Bdellovibrio</i>	<i>exovorius</i>	0.23
A	<i>Bdellovibrio</i>	<i>bacteriovorius</i>	0.06
A	<i>Macellibacteroides</i>	<i>fermentans</i>	0.3
A	<i>Cellvibrio</i>	<i>unclassified</i>	0.27
A	<i>Polaromonas</i>	<i>naphthalenivorans</i>	0.25
A	<i>Alkanindiges</i>	<i>unclassified</i>	0.24
U	<i>Prevotella</i>	<i>unclassified</i>	0.06

Tabella 15: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 20

L'analisi della valvola n.20 mostra positività ai microrganismi orali quali *Streptococcus periodonticum* e *S. infantis*, nuova specie relativa al gruppo mitis.

La valvola è risultata positiva anche alla presenza della *Prevotella* che potrebbe essere di derivazione del cavo orale, quale ad esempio *Prevotella intermedia*. Dal punto di vista clinico il paziente ID20 è il secondo soggetto in analisi con valvola positiva a non presentare segni di malattia parodontale, con indici di placca (PI) e di sanguinamento (BOP) bassi, relativamente 18% e 3%. L'indice della profondità di sondaggio (PPD) è di 4 mm.

VALVOLA 21			
AMBIENTALI/UMANI	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>crusticola</i>	0.85
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>wittichii</i>	0.75
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>unclassified</i>	1.3
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>succinicans</i>	0.26
A	<i>Novosphingobium</i>	<i>barchaimii</i>	1.43
A	<i>Flectobacillus</i>	<i>unclassified</i>	1.32
A	<i>Weeksella</i>	<i>unclassified</i>	0.94
A	<i>Pseudomonas</i>	<i>fragi</i>	0.62
A	<i>Pseudomonas</i>	<i>viridiflava</i>	0.25
A	<i>Luteolibacter</i>	<i>unclassified</i>	0.86
A	<i>Acinetobacter</i>	<i>unclassified</i>	0.62
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>johnsonii</i>	0.1
U	<i>Acinetobacter</i>	<i>hwoffii</i>	0.03
A	<i>Rhodopherax</i>	<i>unclassified</i>	0.69
U	<i>Clostridium</i>	<i>saudiense</i>	0.25
U	<i>Treponema</i>	<i>unclassified</i>	0.04

Commentato [CS1]: Controlla carattere, è diverso da quello delle altre tabelle

Tabella 16: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 21

L'analisi della valvola 21 non mostra la presenza di batteri di derivazione del cavo orale, anche se positiva alla presenza batterica sia di derivazione umana che ambientale. Dal punto di vista clinico il paziente ID21 è edentulo.

VALVOLA 22			
AMBIENATALI/UMANI	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
U	<i>Streptococcus</i>	<i>sinensis</i>	1.94
A	<i>Acinetobacter</i>	<i>unclassified</i>	1.43
U	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	0.34
U	<i>Acinetobacter</i>	<i>guillouiae</i>	0.07
A/U	<i>Acinetobacter</i>	<i>rhizosphaerae</i>	0.05
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>unclassified</i>	1.51
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>succinicans</i>	0.05
A	<i>Rodopherax</i>	<i>unclassified</i>	1.18
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>unclassified</i>	0.78
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>wittichii</i>	0.09
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>echinoides</i>	0.04
A	<i>Polaromonas</i>	<i>unclassified</i>	0.9
A	<i>Giesbergeria</i>	<i>unclassified</i>	0.83
A	<i>Proteus</i>	<i>unclassified</i>	0.73
A	<i>Arcobacter</i>	<i>cryaerophilus</i>	0.72
A	<i>Weeksella</i>	<i>unclassified</i>	0.61

Tabella 17: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 22

L'analisi della valvola n.22 mostra positività ai microrganismi orali *Streptococcus sinensis*. Dal punto di vista clinico il paziente ID22 presenta parodontite moderata. Anche in questo caso sia l'indice di placca (PI) che quello di sanguinamento (BOP) risultano bassi, rispettivamente 19% e 18%. La profondità di sondaggio (PPD) invece si attesta sempre intorno ai valori riscontrati anche nelle altre valvole: 4,2 mm.

VALVOLA 23			
AMBIENTALI/UMANI	GENERE	SPECIE	ABBONDANZA RELATIVA
A	<i>Flavobacterium</i>	<i>succinicans</i>	0,11
A	<i>Acinetobacter</i>	<i>iwoffii</i>	0,24
A	<i>Stramenopiles</i>	<i>unclassified</i>	3,3
A	<i>Sphingomonas</i>	<i>wittichii</i>	0,13
U	<i>Clostridium</i>	<i>celatum</i>	0,19
U	<i>Legionellaceae</i>	<i>unclassified</i>	0,13
A	<i>Methylobacterium</i>	<i>mobilis</i>	0,06
A	<i>Clostridiales</i>	<i>unclassified</i>	0,67
A	<i>Turicibacter</i>	<i>unclassified</i>	0,34
A	<i>Bacteroides</i>	<i>ovatus</i>	0,03

Commentato [CS2]: Controlla carettiere

Tabella 18: Risultati sequenza rRNA 16S della valvola 23

L'analisi della valvola n.23 non mostra presenza di batteri di derivazione del cavo orale. Dal punto di vista clinico il paziente ID23 presenta parodontite moderata. Anche in questo caso sia l'indice di placca (PI) che quello di sanguinamento (BOP) risultano bassi, rispettivamente 6% e 0%. La profondità di sondaggio (PPD) invece si attesta sempre intorno ai valori riscontrati anche nelle altre valvole: 4,8 mm.

Dall'analisi più approfondita di ciascuna valvola positiva ai batteri orali, sono positive 9 valvole su 11. La famiglia degli Streptococchi predomina con 8 valvole positive su 9, lo *Streptococcus periodonticum* è al primo posto con 4 valvole positive su 9, segue lo *Streptococcus mutans* con 3 valvole su 9, *Streptococcus sinensis* con 2 valvole su 9, e lo *Streptococcus parasanguinis* con 1 valvola su 9. Seguono la famiglia dei *Fusobacterium periodonticum* e *F. ucleatum* in 2 valvole su 9.

Porphyromonas pasteri e *Aggregatibacter segnis* sono stati riscontrati rispettivamente in 1 valvola su 9.

Inoltre, la valvola n.4 è quella risultata positiva a maggior specie batteriche orali differenti tra le 10 riscontrate, infatti presenta lo *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus periodonticum*, *Fusobacterium periodonticum* e *Porphyromonas pasteri*.

Le due valvole negative alla presenza di batteri orali ID23 e 21 provengono da pazienti con parodontite moderata e un paziente edentulo rispettivamente.

Di seguito si riporta un confronto descrittivo (Tab. 19) tra i batteri analizzati a livello del cavo orale, attraverso il prelievo del campione di placca batterica, e i batteri orali analizzati nelle valvole risultate positive alla presenza di microrganismi.

ID PZ	BATTERI CAVO ORALE	BATTERI ORALI – VALVOLE
ID02	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Tannerella forsythia</i>	<i>Streptococcus periodonticum</i>
ID03	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
ID04	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Streptococcus sinensis</i> , <i>Streptococcus periodonticum</i> , <i>Fusobacterium periodonticum</i> , <i>Porphyromonas pasteri</i>
ID09	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Treponema forsythia</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Streptococcus periodonticum</i>

ID13	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Aggregatibacter segnis</i>
ID17	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
ID18	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
ID20	<i>Porphyromonas . gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ., <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Treponema denticola</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Streptococcus infantis</i> , <i>Streptococcus periodonticum</i>
ID22	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Streptococcus sinensis</i>

Tabella 19: Confronto tra batteri del cavo orale e batteri orali delle valvole positive ai batteri orali

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative (Tab. 20) per quanto riguarda le specie orali rinvenute nelle valvole, tra pazienti sani, pazienti con parodontite moderata, pazienti con parodontite grave e pazienti edentuli.

Valve specimens	Overall		periodontal status			p-value
	n (%)	oral health	moderate periodontitis	severe periodontitis	edentulous	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>S.periodonticum</i>						
no	22 (84.62)	2 (50.00)	11 (91.67)	2 (66.67)	7 (100.00)	0.09
yes	4 (15.38)	2 (50.00)	1 (8.33)	1 (33.33)	0 (0.00)	
<i>S.mutans</i>						
no	23 (88.46)	4 (100.00)	9 (75.00)	3 (100.00)	7 (100.00)	0.39
yes	3 (11.54)	0 (0.00)	3 (25.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
<i>S.sinensis</i>						
no	24 (92.31)	4 (100.00)	11 (91.67)	2 (66.67)	7 (100.00)	0.39
yes	2 (7.69)	0 (0.00)	1 (8.33)	1 (33.33)	0 (0.00)	
<i>S.infantis</i>						
no	25 (96.15)	3 (75.00)	12 (100.00)	3 (100.00)	7 (100.00)	0.26
yes	1 (3.85)	1 (25.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
<i>S.parasanguinis</i>						
no	25 (96.15)	4 (100.00)	12 (100.00)	2 (66.67)	7 (100.00)	0.11
yes	1 (3.85)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (33.33)	0 (0.00)	
<i>F.nucleatum</i>						
no	25 (96.15)	4 (100.00)	11 (91.67)	3 (100.00)	7 (100.00)	0.75
yes	1 (3.85)	0 (0.00)	1 (8.33)	0 (0.00)	0 (0.00)	
<i>F.periodonticum</i>						
no	25 (96.15)	4 (100.00)	12 (100.00)	2 (66.67)	7 (100.00)	0.11
yes	1 (3.85)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (33.33)	0 (0.00)	
<i>P.pasteri</i>						
no	25 (96.15)	4 (100.00)	12 (100.00)	2 (66.67)	7 (100.00)	0.11
yes	1 (3.85)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (33.33)	0 (0.00)	
<i>A.segnis</i>						
no	25 (96.15)	4 (100.00)	11 (91.67)	3 (100.00)	7 (100.00)	0.75
yes	1 (3.85)	0 (0.00)	1 (8.33)	0 (0.00)	0 (0.00)	

Tabella 20: Presenza di batteri nei campioni valvolari; i valori sono espressi in percentuale (%). N= numero di pazienti.

Tre delle valvole positive ai batteri orali presentano una corrispondenza ritrovata dall'analisi della placca batterica del cavo orale: *Porphyromonas gingivalis* nella placca e *Porphyromonas pasteri* nella valvola, *Streptococcus mutans* nella placca e *Streptococcus mutans* nelle valvole, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nella placca e *Aggregatibacter segnis* nella valvola. Confrontando le specie presenti sia nei campioni di placca che in quelli con valvole, è stata trovata una correlazione statisticamente significativa tra *Porphyromonas gingivalis* nella placca e *Porphyromonas pasteri* nella valvola ($p < 0,001$), ma non tra *Streptococcus mutans* nella placca e *Streptococcus mutans* nelle valvole ($p = 0,37$). Il confronto con il test di McNemar, tra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nella placca e *Aggregatibacter segnis* nella valvola, non è stato attuabile essendo il primo ubiquitario in tutti i campioni orali. Questi confronti dal punto di vista statistico vanno tuttavia rapportati alla piccola numerosità del campione in esame. I dati clinici delle valvole positive ai batteri orali (Tab. 21) mostrano una prevalenza maggiore del sesso maschile rispetto a quello femminile con rapporto di 9/11 e un range di età maggiore ai 50 anni.

La presenza del fattore fumo è molto ridotta, infatti solo 2 pazienti sono fumatori. Tale dato farebbe presupporre che il fumo non incida sui risultati nel correlare le due patologie, anche se è stato dimostrato essere uno dei principali fattori di rischio.

Per quanto riguarda la patologia cardiaca, motivo del ricovero ospedaliero dei pazienti, c'è una maggiore incidenza di stenosi valvolare aortica, rispetto a pochi casi di insufficienza valvolare aortica e un caso di valvulopatia mitralica-aortica associata a coronaropatia.

Si può inoltre notare come quasi tutti i soggetti siano affetti da parodontite moderata, ad eccezione di un caso di parodontite severa e due di salute parodontale.

Gli indici parodontali presi in considerazione mostrano risultati differenti. Infatti, la profondità di tasca (PPD medio) è poco variabile, avendo come media il valore di 4. Tale valore si alza tra il 4,2 e il 4,3 nei pazienti affetti da parodontite e rimane invece 4 nei due soggetti non parodontali.

L'indice di sanguinamento (BOP%), valore predittivo di infiammazione dei tessuti parodontali, rimane stabile assestandosi al 15%.

Infine, l'ultimo indice, quello di placca (VPI%), è molto variabile, passando da valori tendenti allo 0 fino al 100% nell'ID18. Infatti, questo paziente riscontra anche positività a tutte e sei le specie batteriche orali indagate attraverso l'analisi della placca batterica. I valori medio-alti dell'indice di placca mostrano come l'accumulo dei depositi duri giochi un ruolo fondamentale nell'insorgenza e nella progressione della malattia parodontale.

ID PZ	ETA	SESSO	FUMMO	PATOLOGIA CARDIACA	PERIODONTALI STATUS	PPD MEDIO	VPI %	BOP %
ID02	78	F	No	S.V.A. grave	Parod moderata	4,2	22%	6%
ID03	50	M	Si (5 die)	I.V.A. severa	Parod moderata	4,2	88%	23%
ID04	75	M	No	S.V.A. moderata/severa	Parod severa	4,4	27%	14%
ID09	83	M	No	S.V.A. moderata/severa	No perio	4	48%	8%
ID13	55	M	Si (6/8 die)	I.V.A.	Paord moderata	4,3	21%	12%
ID17	72	M	No	Valv. m.-a. severa + coro	Parod moderata	4,3	53%	18%
ID18	78	M	No	S.V.A. severa	Parod moderata	4	100%	19%
ID20	49	F	No	S.M. severa	No perio	4	18%	3%
ID22	63	M	No	S.V.A. severa	Parod moderata	4,2	19%	18%

Tabella 21: Valvole positive ai batteri del cavo orale e caratteristiche relative al paziente.

F: femmina, M: maschio; S.V.A: stenosi valvolare aortica; S.M.: stenosi mitralica; I.V.A.: insufficienza valvolare aortica; Valv. m.-a.: valvulopatia mitralica-aortica; Coro: coronoaropatia; Parod.: parodontite; No perio: assenza di malattia parodontale.

Questi ulteriori grafici (Figg. 33 e 34) mostrano l'andamento della malattia parodontale e dell'indice di placca nelle valvole positive (tot. 11 su 26) e valvole negative (tot. 15 su 26) ai microrganismi orali.

Sia i batteri orali che i batteri parodontopatogeni si ritrovano con maggior frequenza nei pazienti con valvole positive alla presenza batterica e con malattia parodontale. Si evince come entrambi i parametri siano maggiori nelle valvole positive rispetto a quelle negative. Tali dati sono così un'ulteriore conferma del ruolo che l'accumulo di placca gioca nella possibilità di ritrovare i microrganismi del cavo orale nelle valvole cardiache e che lo sviluppo della malattia parodontale sia un fattore di rischio per un coinvolgimento infettivo nel distretto cardiovascolare.

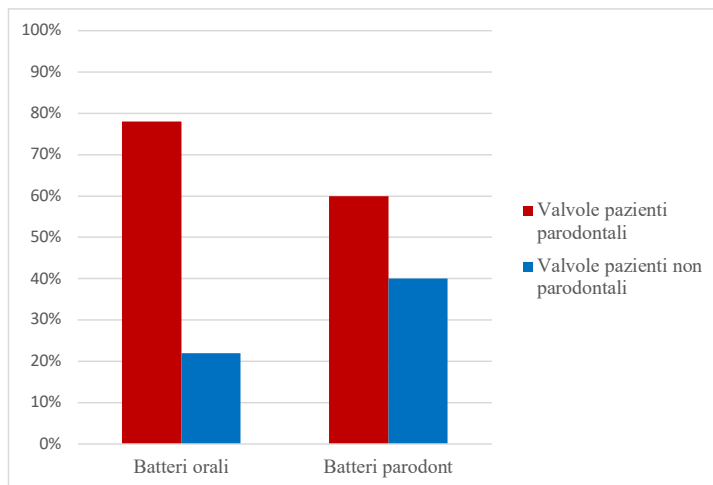


Figura 33: percentuale di batteri parodontopatogeni e non nel campione di pazienti parodontali e in salute.

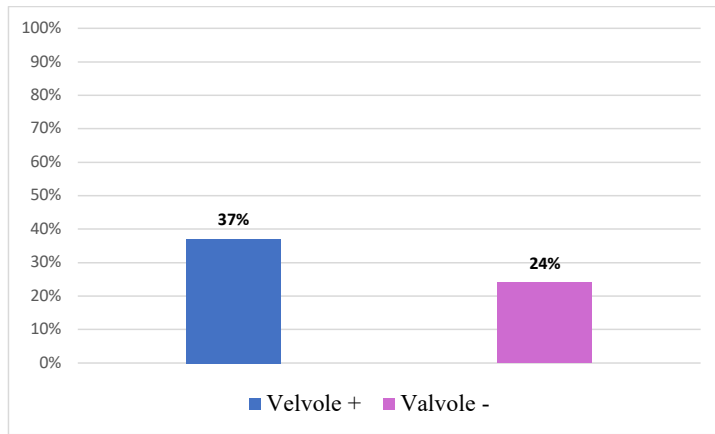


Figura 34: percentuale di placca batterica nelle valvole positive e negative ai batteri

7. DISCUSSIONE

Lo studio effettuato, comprendente 26 pazienti, si è posto come obiettivo la ricerca di una correlazione tra la patologia parodontale e la valvulopatia.

Dai risultati ottenuti, si evidenzia come la cura del cavo orale sia fondamentale per mantenere la salute non solo dello stesso, ma anche di altri organi come il cuore.

I soggetti inseriti nello studio sono stati sottoposti ad una visita comprendente un questionario anamnestico, una cartella parodontale ed un prelievo di due campioni di placca batterica subgingivale dai tre siti con maggior profondità di sondaggio. Per i pazienti edentuli invece è stata campionata solo una provetta di saliva. Infine, in sede di intervento chirurgico è stata prelevata la valvola da sostituire.

Si sono anche indagate, nello specifico, le condizioni orali e le abitudini dei soggetti, attraverso un'anamnesi medica e una odontoiatrica. Questo perché la parodontite, seppur definita come malattia multifattoriale, ha come causa di base l'accumulo di placca batterica. È per tale motivo che le analisi microbiologiche sono state effettuate non solo sulla valvola da sostituire in sede di intervento chirurgico, ma anche su campioni di placca.

Attraverso l'anamnesi odontoiatrica si è potuto osservare come più della metà dei pazienti arruolati, non si sottoponga a sedute di igiene orale professionale e a visite odontoiatriche con regolarità, ma solo al bisogno. Medesimo discorso vale per l'igiene orale domiciliare: il 100% utilizza lo spazzolino, ma non sempre abbinato al dentifricio. Basse percentuali si riscontrano anche per quanto riguarda l'utilizzo di presidi interdentali e presidi aggiuntivi (es. collutorio). Questi risultati sono in linea con un alto indice di placca totale riscontrato che porta a dedurre una scarsa attenzione all'igiene orale domiciliare e al suo mantenimento.

Già in letteratura nel 1989 Mattila et al. riferiva che, rispetto ai controlli sani, i pazienti ricoverati nelle unità di emergenza ospedaliera per sindromi coronariche acute avevano tendenzialmente una scarsa igiene orale^{2/3}.

Una ricerca più recente di Aoyama et al. condotta presso il Tokyo Medical and Dental University Hospital tra il 2012 e il 2015, ha coinvolto 897 soggetti, divisi

poi in sei gruppi in base all'età ed alla presenza/assenza di malattia cardiovascolare.

I risultati evidenziavano come i pazienti affetti da patologia cardiovascolare avessero condizioni orali peggiori rispetto ai soggetti non affetti, suggerendo dunque una plausibile correlazione tra presenza di malattia cardiovascolare e status dento-parodontale sfavorevole¹⁴.

Nel 2017 Sanchez et al. hanno intervistato 12 soggetti, affetti da cardiopatia: 10 affermavano di lavare i denti quotidianamente, ma 2 riferivano di lavarli anche ogni 2 giorni; inoltre il 75% degli intervistati non riteneva fondamentale sottoporsi a visite dentistiche se non in presenza di un problema dentale, dato paragonabile a quanto da noi rilevato (69%)²¹⁵.

Dall'anamnesi si è inoltre riscontrata una prevalenza del sesso maschile nel campione di soggetti arruolati con rapporto 15/26. Anche per quanto riguarda la malattia parodontale, su 15 affetti 9 sono maschi, arrivando così ad un 60%. In letteratura diversi studi indicano una maggiore predisposizione della malattia parodontale negli uomini piuttosto che nelle donne. Il primo di origine norvegese, indagando la prevalenza della parodontite nell'età adulta, ha riscontrato che tale patologia era maggiore negli uomini e differente tra popolazione urbana ed extraurbana²¹⁶.

Il secondo è arrivato al medesimo risultato, studiando la prevalenza di parodontite nella popolazione americana: gli uomini con un basso livello di istruzione, in condizioni di povertà e fumatori sono più soggetti a parodontite²¹⁷.

Una volta analizzate le valvole positive, anche da questi risultati si riscontra una prevalenza di valvole appartenenti al sesso maschile, 78% (7 valvole su 9). Una maggior predisposizione della popolazione maschile alla parodontite potrebbe quindi spiegare la maggiore prevalenza di valvole positive ai batteri orali, appartenenti a uomini, che si è riscontrata nel nostro studio.

Grazie alla compilazione della cartella parodontale ed allo studio dell'OPT, è stato possibile dividere i pazienti affetti da parodontite da quelli non affetti dalla patologia. Inoltre, si è effettuata un'ulteriore distinzione tra parodontite moderata (almeno 4 siti con PPD \geq 4mm) e parodontite severa (PPD > 5mm). Risulta così un 46% di soggetti affetti dal tipo moderato e un 11,5% dal tipo severo. Una bassa

prevalenza del secondo tipo deriva dal fatto che i dati epidemiologici in letteratura suggeriscono l'associazione di malattia parodontale severa in fasce di età più basse, dall'età adolescenziale ai 30/40 anni; risultato in linea con il nostro studio in quanto i pazienti arruolati hanno tutti più di 50 anni^{218,219}.

L'indice di malattia parodontale è importante per andare a capire se esiste e di che tipo è la correlazione con le valvole positive ai microrganismi e più nello specifico ai batteri orali. È risultato che su 11 valvole positive ai batteri, 9 lo sono anche per quelli orali. Di queste nove, 7 appartengono a soggetti parodontali. Il totale delle valvole positive ai batteri orali, sul campione dei pazienti in esame, risulta del 34,6%. I microrganismi maggiormente riscontrati sono stati *S. periodonticum*, *S. mutans*, *S. parasanguinis*, *S. sinensis*; *Fusobacterium periodonticum* e *F. nucleatum*, *Aggregatibacter segnis*; *Porphyromonas gingivalis*.

Tre delle valvole positive ai batteri orali presentano una corrispondenza ritrovata dall'analisi della placca batterica del cavo orale: *P. gingivalis* nella placca e *Porphyromonas pasteri* nella valvola, *Streptococcus mutans* sia nella placca che nelle valvole, *A. actinomycetemcomitans* nella placca e *Aggregatibacter segnis* nella valvola. Confrontando le specie presenti sia nei campioni di placca che in quelli con valvole, è stata trovata una correlazione statisticamente significativa tra *P. gingivalis* nella placca e *Porphyromonas pasteri* nella valvola ($p < 0,001$), ma non tra *Streptococcus mutans* nella placca e *Streptococcus mutans* nelle valvole ($p = 0,37$). Il confronto con il test di McNemar, tra *A. actinomycetemcomitans* nella placca e *A. segnis* nella valvola, non è stato attuabile essendo il primo ubiquitario in tutti i campioni orali. Questi confronti dal punto di vista statistico vanno tuttavia rapportati alla piccola numerosità del campione in esame. Il dato dimostra comunque una correlazione clinica tra la malattia parodontale e la patologia cardio-vascolare.

Questo rapporto associativo, negli ultimi anni, è stato approfondito da numerosi studi in letteratura, indagando la presenza di lesioni parodontali in pazienti affetti da problemi cardiovascolari.

Nel 2010 Raffaelli et al.⁵ hanno sottoposto ad esame dento-parodontale 19 pazienti affetti da stenosi valvolare aortica in attesa di intervento chirurgico. Gli

Autori avevano rilevato nei soggetti arruolati da 2 a 37 siti con PPD \geq 4 mm, dati sovrapponibili con quelli rilevati dal nostro studio (9 pazienti, PPD \geq 4 mm da 2 a 28 siti); inoltre trovarono 9 valvole positive su 19 ma nessuna di queste positive ai batteri parodontopatogeni⁵.

In uno studio pilota di Ziebolz et al. 10 pazienti candidati a chirurgia di sostituzione valvolare sono stati sottoposti ad una valutazione dello status orale pre-intervento: sul totale di 10 pazienti, 9 presentavano segni di parodontite da moderata a severa, mentre uno manifestava solamente le prime avvisaglie di malattia parodontale¹⁸⁵.

Nello stesso anno gli autori Ziebolz et al. monitorando un numero maggiore di campioni (30 pazienti), avevano riportato che il 93% (28) manifestava segni di malattia parodontale; tuttavia, erano stati esclusi dallo studio pazienti in condizioni di edentulia. 17 campioni di tessuto atriale e 9 campioni di tessuto del miocardio sono risultati positivi alla presenza dei batteri parodontopatogeni del complesso rosso, principalmente a *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*¹⁸⁶.

I risultati del nostro studio sono in accordo con quanto riportato da Ziebolz et al.¹⁸⁶ sia per le rilevazioni cliniche, che in parte per i risultati microbiologici relativi ai parodontopatogeni, ma non per gli Streptococchi.

Ad oggi gli studiosi cercano di suffragare ulteriormente l'ipotesi di una associazione positiva tramite indagini comparative sulla presenza di batteri parodontali in campioni di placca subgingivale e in biopsie di tessuto cardiaco.

Se sui campioni di placca subgingivale la prevalenza delle lesioni parodontali pare confermata dagli esiti delle analisi microbiologiche, positive per i target parodontopatogeni indagati^{5,220,185,186}, per quanto concerne i risultati sui campioni di tessuto cardiaco i dati si rivelano contrastanti.

Secondo alcuni Autori la presenza di malattia parodontale in soggetti affetti da cardiopatia troverebbe riscontro a livello microbiologico, come dimostrato dalla colonizzazione da parte di batteri parodontopatogeni di biopsie di tessuto cardiaco^{221,1,220,185,186}. Questi dati sono concordi con quelli del nostro studio.

Grazie all'analisi metagenomica è stato osservato che tra i 10 microrganismi isolati nelle valvole cardiache alcuni appartenevano a specie batteriche di origine orale. In particolare lo *S. mutans*, citato nello studio di Nakano et al. e trovato nelle valvole aortiche con una frequenza del 69% e nelle placche ateromasiche con una frequenza pari al 74%². Un altro batterio ritrovato nello studio di Nakano et al. è lo *S. sanguinis*, isolato nelle valvole e nelle placche ateromasiche con una frequenza rispettivamente del 17% e 26%.

Un altro Streptococco riscontrato con maggior frequenza nel nostro studio è lo *S. periodonticum*; microrganismo di derivazione orale, isolato nella placca sottogengivale nelle lesioni parodontali²²².

Ad oggi nessuno studio in Letteratura ha rilevato lo *S. periodonticum* nei campioni di tessuto cardiovascolare.

Lo *S. parasanguinis* è un batterio Gram-positivo del genere degli streptococchi, classificato come un membro del *viridans* group, è uno dei maggiori colonizzatori della superficie dentale nella cavità orale. In uno studio di Yi-Ywan M et al. è stato associato all'endocardite subacuta²²³. È interessante notare come Woo et al. considerino il cavo orale come una riserva naturale di *S. sinensis*, una specie batterica associata all'endocardite infettiva^{224,225,226}. In uno studio di Stephan J. et al sono state riscontrate le specie di *Streptococcus parasanguinis* e *S. sinensis* nella placca aterosclerotica di 38 pazienti con una frequenza rispettivamente di 2,52% e 0,23%⁴.

Fusobacterium periodonticum è della stessa famiglia del *F. nucleatum*, che è un membro residente della cavità orale umana, e come membro del cosiddetto complesso arancione svolge un ruolo importante nello sviluppo e nella progressione della malattia parodontale⁹⁶.

Tra l'elevato numero di patogeni parodontali, il *F. nucleatum* è la specie orale più frequente trovata in siti di infezioni diverse dal cavo orale²²⁷ e responsabile della polmonite²²⁸, ascesso epatico piogenico²²⁹, sepsi²³⁰, endocardite infettiva²³¹.

Non si riscontrano studi scientifici dove si è rilevato lo *F. periodonticum* associato alla patologia cardiovascolare.

In uno studio di Gaetti-Jardim et al., sono stati rilevati batteri parodontopatogeni nelle placche ateromatose in 44 pazienti. I patogeni parodontali rilevati sono stati

A. actinomycetemcomitans, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, tuttavia non è stato rilevato il *F. nucleatum e periodonticum*²²¹.

P. gingivalis è della stessa famiglia di *P. pasteri* riscontrato nei nostri risultati. Diversi studi hanno riportato la presenza del *P. gingivalis*^{232,233,234}, ma non di *P. pasteri*.

L'Aggergatibacter segnis, riscontrato in una valvola del nostro studio, viene segnalato solo in uno studio che riporta un caso di endocardite²³⁵.

D'altra parte, per Moreno et al. la presenza di biopsie valvolari e campioni subgingivali positivi non dimostra necessariamente un rapporto associativo, in mancanza di prove sulla medesima origine filogenetica delle specie batteriche coinvolte. Questo sicuramente rappresenta un limite anche del nostro studio, insieme alla ridotta numerosità del campione esaminato. Altri studi invece, pur sostenendo una maggiore incidenza di malattia parodontale nel campione di soggetti arruolato, non hanno trovato riscontro di batteri parodontopatogeni specifici sui tessuti cardiaci esaminati²³⁶.

Nel dettaglio, in una ricerca di Aimetti et al. ben 31 campioni di endoarteriectomia su 33 si sono rivelati contaminati da DNA batterico, non corrispondente però a quello di microrganismi parodontopatogeni²³⁷. Per Aquino et al. il 13% delle placche ateromatose analizzate è risultato positivo alla presenza di DNA batterico, ma nessuno dei batteri parodontali *target* (tra cui *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. denticola*) è stato riscontrato negli ateromi²³⁸. Medesima supposizione era già stata proposta anche da Cairo et al.¹⁸⁴.

Numerose ricerche avanzano l'ipotesi circa la presenza di altri batteri orali quali streptococchi, in particolare *S. mutans*, a livello endoteliale^{2,239,139} o ancora, di microrganismi non orali, come *E. faecalis*, il quale pare però giocare un ruolo non secondario nelle infezioni del canale radicolare²⁴⁰.

Sebbene non appartenenti al complesso dei batteri parodontopatogeni, le indagini rivelano come tali microrganismi fossero inaspettatamente presenti, con incidenza maggiore, proprio nei tessuti cardiaci dei soggetti parodontali²⁴⁰.

È già stato sottolineato che uno stato di batteriemia transitorio può verificarsi in seguito a procedure quotidiane di igiene orale domiciliare e soprattutto di igiene orale professionale, in particolar modo in pazienti parodontali^{174,176}, tuttavia come

riportato da Pallasch e Slots, in un ospite sano il sistema immunitario interviene prontamente per eliminare eventuali batteri presenti nel flusso ematico²⁴¹.

I microrganismi orali possono dunque potenzialmente entrare in circolo e colonizzare i tessuti cardiaci. Alla luce di questo, l'eliminazione sistematica del biofilm e di eventuali fattori di ritenzione della placca risulta importante per limitare questo processo²⁴². Inoltre, se è vero che lo stato ossidativo delle placche aterosclerotiche costituisce un ambiente ideale per i batteri anaerobi, come appunto i batteri parodontali²⁴⁰, è vero anche che gli Autori non hanno ancora conoscenze tali per stabilire se eventuali microrganismi presenti a livello degli ateroscleromi li colonizzino in maniera persistente o solo transitoria²⁴³, in quanto l'elevata pressione sanguigna a livello delle valvole cardiache, ad esempio potrebbe essere in grado di prevenire la proliferazione di colonie microbiche⁵.

In Letteratura queste discordanze fra i risultati proposti dai vari studi possono essere ricondotte a diversa caratterizzazione microbica subgingivale, risposte immunitarie dell'ospite, tipologia della popolazione campione, anche in termini di status socio-economico, e alle tecniche di campionamento utilizzate^{237,238,240,244}.

La ridotta numerosità del campione potrebbe costituire una importante limitazione eventualmente affrontabile in studi futuri. Tale indagine offre comunque lo spunto per la sensibilizzazione da una parte dei pazienti affetti da cardiopatia ad una buona igiene orale domiciliare e controlli periodici regolari, dall'altra dei cardiocirurghi a tenere in considerazione l'importanza di un buono status dento-parodontale, ai fini di ridurre ulteriormente il rischio di batteriemia ed endocardite, ed altri eventi cardiovascolari avversi, specialmente in previsione di intervento cardiovascolare.

Associazione negativa	
Cairo <i>et al.</i> , 2004	Su 52 campioni di endoarteriectomia carotidea, nessuna è risultata positiva alla presenza di DNA batterico
Aimetti <i>et al.</i> , 2007	31 campioni di endoarteriectomia carotidea positivi a DNA batterico su 33 totali, ma nessuna a batteri parodontopatogeni
Aquino <i>et al.</i> , 2011	In 30 pazienti con diagnosi di aterosclerosi, 4 sono risultati positivi alla presenza di DNA batterico, ma non appartenente a patogeni parodontali
Raffaelli <i>et al.</i> , 2010	Nessuna delle 19 valvole aortiche esaminate ha manifestato presenza di microrganismi patogeni parodontali
Moreno <i>et al.</i> , 2017	Su 30 campioni di tessuto valvolare nessuno ha manifestato presenza di batteri orali
Associazione positiva	
Nakano <i>et al.</i> , 2009	<i>A. actinomycetemcomitans</i> (46.4%), <i>T. denticola</i> (27.7%) e <i>P. gingivalis</i> (5.6%) rilevati su 82 valvole aortiche esaminate
Gaetti-Jardim <i>et al.</i> , 2009	DNA batterico rilevato su 44 pazienti sottoposti ad endoarteriectomia carotidea: il 47.3% del DNA batterico totale riscontrato apparteneva a patogeni parodontali, in particolare <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i>
Atarbashi-Moghadam <i>et al.</i> , 2018	Prelievi di placche aterosclerotiche da 23 pazienti: 3 positivi a <i>P. gingivalis</i> , 4 a <i>A. actinomycetemcomitans</i>
Ziebolz <i>et al.</i> , 2018a	Tutti i pazienti arruolati (10) hanno manifestato batteri appartenenti a Red, Orange e Yellow Complex su prelievi di tessuto atriale e/o miocardico. Sui prelievi valvolari si è riscontrata solo la presenza di batteri appartenenti al Yellow Complex
Ziebolz <i>et al.</i> , 2018b	22 pazienti su 30 arruolati positivi presenza di batteri parodontopatogeni a livello di tessuto atriale e/o miocardico

Tabella 22: Principali risultati della Letteratura per l'associazione positiva e negativa della malattia parodontale con la malattia cardiovascolare.

8. CONCLUSIONI

Dal nostro studio emerge che i pazienti affetti da patologia cardiovascolare presentano tendenzialmente una scarsa igiene orale e una bassa attenzione alla salute del cavo orale; inoltre il 58% dei pazienti arruolati manifesta segni di malattia parodontale, da moderata a severa. Pertanto, i dati raccolti sono in linea con quanto già riportato in letteratura.

Dalle analisi svolte, è stata confermata la presenza di patogeni parodontali subgingivali e di batteri orali, come lo *S. mutans*, a livello della placca dentale e in alcune valvole cardiache positive.

Si evidenzia una correlazione clinica tra i batteri ritrovati nel cavo orale ed i batteri rinvenuti nelle valvole, con una corrispondenza di specie nello stesso paziente, risultato significativo anche se ulteriori studi sono necessari per consolidare i dati ottenuti.

I risultati suggeriscono, pur con i limiti dello studio tra cui la ristretta numerosità campionaria, che i batteri associati o non associati alla malattia parodontale raggiungono il flusso sanguigno, giocando un ruolo diretto o indiretto nella patogenesi delle malattie cardiovascolari. I risultati qui mostrati rafforzano l'importanza dei batteri orali/parodontali come possibili fattori che contribuiscono allo sviluppo delle malattie cardiovascolari. La conoscenza dei microrganismi presenti nei tessuti delle valvole stenotiche dei pazienti con parodontite cronica potrebbe essere rilevante nella prevenzione e nel trattamento delle infezioni cardiovascolari che sembrano essere prodotte, in parte, da questi batteri parodontopatici orali.

Le discrepanze tra i vari studi attualmente presenti in Letteratura ed il numero limitato di pazienti del nostro studio, impongono la prosecuzione della ricerca in questa direzione al fine di ulteriormente approfondire le modalità di influenza reciproca tra le due patologie, le specifiche implicazioni cliniche e soprattutto come il trattamento dell'una possa migliorare la prognosi dell'altra.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Inaba H, Yoshioka H, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens, *Oral Microbiology Immunology*, 2009, 24: 64-68.
2. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, Matsue H, Takahashi T, Taniguchi K, Amano A, Ooshima T. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *J Clin Microbiol*. 2006 Sep;44(9):3313-7.
3. Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, Taubert KA, Newburger JW, Gornik HL, Gewitz MH, Wilson WR, Smith Jr SC, Baddour LM. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* (2012) May 22;125(20):2520-44.
4. Ott SJ, El Mokhtari NE, Musfeldt M, Hellmig S, Freitag S, Rehman A, Kühbacher T, Nikolaus S, Namsolleck P, Blaut M, Hampe J, Sahly H, Reinecke A, Haake N, Günther R, Krüger D, Lins M, Herrmann G, Fölsch UR, Simon R, Schreiber S. Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation*. 2006 Feb 21;113(7):929-37.
5. Raffaelli L, Santangelo R, Falchetti P, Galluccio F, Luciani N, Anselmi A, Nowzari H, Verdugo F, Fadda G, D'Addona A. Examination of periodontal pathogens in stenotic valve specimens and in whole blood samples in patients affected by aortic valve stenosis and chronic periodontitis. *Int J Immunopathol Pharmacol* (2010);Apr-Jun;23(2):561-6.
6. Geerts SO, Legrand V, Charpentier J et al. Further evidence of the association between periodontal conditions and coronary artery disease. *J Periodontol* (2004);75:1274-80.
7. D'Aiuto F, Graziani F, Tetè S, Gabriele M, Tonetti MS. Periodontitis: from local infection to systemic diseases, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 18 (2005) 1–11.
8. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Oct;13(4):547-58.

9. Kebschull M, Demmer RT, Papapanou PN, “Gum bug, leave my heart alone!”-epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis, *J. Dent. Res.* 89 (2010) 879–902.
10. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiologic agents of destructive periodontal disease. *Periodontol 2000* (1994);5:78-111.
11. Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Dibart S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. *J Clin Periodontol.* 1991 Nov;18(10):766-75.
12. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in Periodontitis. *Periodontol 2000* (1997);14:12-32.
13. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and Prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000* 1997;14:112-143.
14. Lockhart PB. The risk for endocarditis in dental practice. *Periodontol 2000* 2000;23:127-35
15. Rufail ML, Schenkein HA, Barbour SE, et al. Altered lipoprotein subclass distribution and PAF-AH activity in subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Lipid Res* 2005;46:2752–60.
16. Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* (1998);Jul;3(1):108-20.
17. Ebersole JL. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol 2000.* 2003;31:135–166.
18. Lamster IB, Ahlo JK. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1098:216 –229.
19. Kumar PS. From focal sepsis to periodontal medicine: a century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. *J Physiol.* 2017 Jan 15;595(2):465-476.
20. Zhang YM, Zhong LJ, Liang P, Liu H, Mu LT, Ai SK. Relationship between microorganisms in coronary atheromatous plaques and periodontal pathogenic bacteria. *Chin Med J (Engl).* 2008 Aug 20;121(16):1595-7.
21. Silver JG, Martin AW, McBride BC. Experimental transient bacteraemias in human subjects with varying degrees of plaque accumulation and gingival inflammation. *J Clin Periodontol.* 1977 May;4(2):92-9.

22. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation* (2008);117:3118–3125.
23. Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, Ashar J, Barbuto S, Lockhart PB. Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures. *J Clin Microbiol* (2008); 46:2129–2132
24. Damgaard C, Reinholdt J, Enevold C, Fiehn NE, Nielsen CH, Holmstrup P. Immunoglobulin G antibodies against *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in cardiovascular disease and periodontitis. *J Oral Microbiol* (2017); Sep 10;9(1): 1374154.
25. Haraszthy VI, Zambon JJ, Trevisan M, Zeid M, Genco RJ Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol* (2000); Oct;71(10) 1554-60.
26. Boillot A, Demmer RT, Mallat Z, et al. Periodontal microbiota and phospholipases: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Atherosclerosis* (2015);242:418–23.
27. Nakatani S, Mitsutake K, Hozumi T, Yoshikawa J, Akiyama M, Yoshida K, et al. Committee on Guideline for Prevention and Management of Infective Endocarditis. Japanese Circulation Society. Current characteristics of infective endocarditis in Japan: an analysis of 848 cases in 2000 and 2001. *Circ J* (2003); 67:901–5.
28. Nakano K, Nomura R, Matsumoto M, Ooshima T. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases—from molecular mechanisms to clinical cases: Cell-surface structures of novel serotype k *Streptococcus mutans* strains and their correlation to virulence. *J Pharmacol Sci.* 2010;113(2):120-5.
29. Nagata E, Oho T. Invasive *Streptococcus mutans* induces inflammatory cytokine production in human aortic endothelial cells via regulation of intracellular toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain 2. *Mol Oral Microbiol* (2017); Apr 32(2):131-141.
30. Chapulova M, Skalova A, Hajek T, Geigerova L, Kralova D, Liska P, Hecova H, Molacek J, Hrabak J, Bacterial DNA detected on pathologically changed heart valves using 16S rRNA gene amplification, *Folia Microbiologica*, 2018, 63: 707-711.

31. 1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):i, 1-112.
32. Makkar H, Reynolds MA, Wadhawan A, Dagdag A, Merchant AT, Postolache T. Periodontal, metabolic, and cardiovascular disease: Exploring the role of inflammation and mental health. *Pteridines*. 2018;29(1):124-163.
33. Oliver RC, Brown LJ, Loe H. Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol*. 1998;69(2):269-78.
34. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, Flemmig TF, Garcia R, Giannobile WV, Graziani F, Greenwell H, Herrera D, Kao RT, Kebschull M, Kinane DF, Kirkwood KL, Kocher T, Kornman KS, Kumar PS, Loos BG, Machtei E, Meng H, Mombelli A, Needleman I, Offenbacher S, Seymour GJ, Teles R, Tonetti MS. 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 Jun;89 Suppl 1:S173-S182.
35. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Clinical Periodontology*. 2017 World Workshop. 2018; vol. 45, Issue S20.
36. Ministero della Salute. Malattia Parodontale, 2013. Disponibile on line da http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?id=725&area=Sorriso%20salute&menu=patologie
37. AAP Academy report. Epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol*. 2005;76:1406-1419.
38. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017 Apr-Jun; 11(2): 72-80.
39. Progetto Terapia Parodontale. Cortellini P, Chieffi S, Francetti L, Oreglia F, Rotundo R. *SIdP*. 13 Settembre 2003.
40. Jenkins WM, Papapanou PN. Epidemiology of periodontal disease in children and adolescents. *J. Periodontol 2000*; 26: 16-32.
41. Van der Velden U. Effect of age on the periodontium. *J Clin Periodontol* 1984; 11: 281-294.

42. Van der Velden U. The onset age of periodontal destruction. *J Clin Periodontol.* 1991;18(6):380-3.
43. Johnson BD, Mulligan K, Kiyak HA, Marder M. Aging or disease? Periodontal changes and treatment considerations in the older dental patient. *Gerodontology.* 1989;8:109-118.
44. Burt BA. Periodontitis and aging: reviewing recent evidence. *Journal of the American Dental Association.* 1994;125:273-279.
45. Sfyroeras GS, Roussas N, Saleptsis VG, Argyriou C, Giannoukas AD. Association between periodontal disease and stroke. *Journal of vascular surgery.* 2012; 55(4):1178-1184.
46. Ioannidou E. The Sex and Gender Intersection in Chronic Periodontitis. *Front Public Health.* 2017;5:189.
47. Hagenfeld D, Zimmermann H, Korb K, El-Sayed N, Fricke J, Greiser KH, Kühnisch J, Linseisen J, Meisinger C, Schmitter M, Kim TS, Becher H. Periodontal Health and Use of Oral Health Services: A Comparison of Germans and Two Migrant Groups. *Int J Environ Res Public Health.* 2019 Aug;16(16):3000.
48. López NJ, Valenzuela CY, Jara L. Interleukin-1 gene cluster polymorphisms associated with periodontal disease in type 2 diabetes. *J Periodontol.* 2009; 80(10):1590-8.
49. Ozturk A, Vieira AR. TLR4 as a risk factor for periodontal disease: a reappraisal. *J Clin Periodontol.* 2009; Volume 36, issue 4.
50. Wang HF, He FQ, Xu CJ, Li DM, Sun XJ, Chi YT, Guo W. Association between the interleukin-1beta C-511T polymorphism and periodontitis: a meta-analysis in the Chinese population. *Genet Mol Res.* 2017;16(1).
51. Zhang W, Xu P, Chen Z, Cheng Y, Li X, Mao Q. Association between IL-13 -1112 polymorphism and periodontitis susceptibility: a meta-analysis. *BMC Oral Health.* 2018;18:21.
52. Thurnheer T, Karygianni L, Flury M, Belibasakis GN. Fusobacterium Species and Subspecies Differentially Affect the Composition and Architecture of Supra- and Subgingival Biofilms Models. *Front. Microbiol.* 2019;10:1716.
53. Loë H, Theilade E., Jensen S.B. Experimental Gingivitis in Man. *Journal of Periodontology.* May-Jun 1965;36:177-87.
54. Lyons, H., Bernier, H. & Goldman, H. M. Report of the Nomenclature and Classification Committee. *Journal of Periodontology.* 1959; 30, 74—7

55. Greene J.C., D.M.D., M.P.H., F.A.P.H.A. Oral Hygiene and Periodontal Disease. *J Public Health Nations Health*. Jun 1963; 53(6):913-22.
56. Panos N. Papapanou, Cristiano Susin. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? *Periodontology 2000*. 2017 Oct;75(1):45-51.
57. Jørgen S. Periodontitis: facts, fallacies and the future. *Periodontology 2000*, 2017 Oct;75(1):7-23.
58. Page R.C., Schroeder H.E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory investigations*. 1976 Mar;34(3):235-49.
59. Bullon P., Cordero M.D., Quiles J.L., Del Carmen Ramirez-Tortosa M., Gonzales-Alonso A., Alfonsi S., Gracia-Marín R., de Miguel M., Battino M. Autophagy in periodontitis patients and gingival fibroblasts: unraveling the link between chronic diseases and inflammation. *BMC Medicine*, 2012 Oct 17;10:122.
60. Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 2004 Jan 9;313(2):453-8.
61. Yang D, Wang J, Ni J, Shang S, Liu L, Xiang J, Li C. Temporal expression of metalloproteinase-8 and -13 and their relationships with extracellular matrix metalloproteinase inducer in the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of periodontal research*, 2013 Aug;48(4):411-9.
62. Koch C, Staffler G, Hüttinger R, Hilgert I, Prager E, Cerný J, Steinlein P, Majdic O, Horejsí V, Stockinger H. T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density. *International immunology*, 1999 May;11(5):777-86.
63. Listgarten MA. Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. *Journal of periodontal research*, 1987 May;22(3):172-8.
64. Smalley JW. Pathogenic mechanisms in periodontal disease. *Review Advances in dental research*, 1994 Jul;8(2):320-8.
65. Lang NP., Schätzle MA., Loë H. Gingivitis as a risk factor in periodontal disease. *Journal of Clinic Periodontology*, 2009; 36 (Suppl. 10): 3–8.
66. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 1998;9(3):248-66.

67. Nguyen L, Dewhirst FE, Hauschka PV, Stashenko P. Interleukin-1 beta stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. *Lymphokine and cytokine research*, 1991 Apr;10(1-2):15-21.
68. Ohsaki Y, Takahashi S, Scarcez T, Demulder A, Nishihara T, Williams R, Roodman GD. Evidence for an autocrine/paracrine role for interleukin-6 in bone resorption by giant cells from giant cell tumors of bone. *Endocrinology*, 1992 Nov;131(5):2229-34.
69. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*, 1986 Feb 6-12;319(6053):516-8.
70. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *Journal of Periodontology*, 1993 May;64(5 Suppl):432-44.
71. Zachinsky L. Range of histologic variation in clinically normal gingiva. *Journal of Dental Research*, Aug 1954; 33(4):580-9.
72. Oliver RC, Holm-Pederen P, Loë H. The correlation between clinical scoring, exudate measurements and microscopic evaluation of inflammation in the gingiva. *Journal of Periodontology*, Apr 1969;40(4):201-9.
73. Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontology 2000*, Jun 1997;14:144-57.
74. Page RC. Gingivitis. *Journal of clinical periodontology*. 1986 May;13(5):345-59.
75. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, May 1993;64(5 Suppl):474-84.
76. Ryder MI. Histological and ultrastructural characteristics of the periodontal syndrome in the rice rat. I. General light microscopic observations and ultrastructural observations of initial inflammatory changes. *Journal of periodontal research*. 1980 Sep;15(5):502-15.
77. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. *Journal of clinical periodontology*. 1979 Oct;6(5):351-82.
78. Tanner AC, Haffer C, Bratthall GT, Visconti RA, Socransky SS. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *Journal of clinical periodontology*. 1979 Oct;6(5):278-307.
79. Loesche WJ, Syed SA. Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque and gingivitis score. *Infection and immunity*. 1978 Sep;21(3):830-9.

80. Moore W. Microbiology of periodontal disease. *J Periodontol Res.* 1987;22(5):335–41.
81. Tanner A, Maiden M, Macuch P, Murray L, Kent R Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):85–98.
82. Singh VP, Proctor SD, Willing BP. Koch's postulates, microbial dysbiosis and inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(7):594-9.
83. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000.* 1997;14(1):216-248.
84. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 1992;63(4 Suppl):322-31.
85. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Lang NP, Seymour GJ. A longitudinal study of Interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *Journal of clinical Periodontology.* 2001; 28(12):1137-1144.
86. Huynh-Ba G, Lang NP, Tonetti MS, Salvi GE. The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2007;34(4):305-17.
87. Zeng XT, Liu DY, Kwong JS, Leng WD, Xia LY, Mao M. Meta-Analysis of Association Between Interleukin 1-beta C-511T Polimorphism and Chronic Periodontitis Susceptibility. *J Periodontol.* 2015;Volume 86, issue 6.
88. Huang W, He BY, Shao J, Jia XW, Yuan YD. Interleukin 1-beta rs1143627 polymorphism with susceptibility to periodontal disease. *Oncotarget.* 2017; 8(19):31406-31414.
89. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, Norderyd OM, Genco RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol.* 1994;65(3):260–7.
90. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2013;62(1):59–94.
91. Makkar H, Reynolds MA, Wadhawan A, Dagdag A, Merchant AT, Postolache T, Periodontal, metabolic, and cardiovascular disease: Exploring the role of inflammation and mental health. *Pteridines.* 2018;29(1):124-163.
92. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30-44.

93. Chhibber-Goel J, Singhal V, Bhowmik D, Vivek R, Parakh N, Bhargava B, Sharma A. Linkages between oral commensal bacteria and atherosclerotic plaques in coronary artery disease patients. *npj Biofilms and Microbiomes*. 2016;2:7.
94. Konkel JE, O'Boyle C, Krishnan S. Distal Consequences of Oral Inflammation. *Front Immunol*. 2019;10:1403.
95. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001;183(12):3770–83.
96. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134–144.
97. Kolenbrander PE. Intergeneric coaggregation among human oral bacteria and the ecology of dental plaque. *Annu Rev Microbiol* 1988; 42: 627–656.
98. Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogens. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; 2: 177–281.
99. Yun PL, DeCarlo AA, Hunter N. Modulation of major histocompatibility complex protein expression by human α interferon mediated by cysteine proteinase-adhesin polyproteins of Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun* 1999; 67: 2986–2995.
100. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors in Porphyromonas gingivalis. *Periodontol 2000* 1999; 20: 168–238.
101. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(3):486–505.
102. Kuramitsu HK, Ellen RP. Oral bacterial ecology: the molecular basis. Norfolk, UK: Horizon Scientific Press, 2000.
103. Hamada S, Amano A, Kimura S, Nakagawa I, Kawabata S, Morisaki I. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 129–138.
104. Levesque C, Lamothe J, Frenette M. Coaggregation of Streptococcus salivarius with periodontopathogens: evidence for involvement of fimbriae in the interaction with Prevotella intermedia. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18: 333–337.

105. Kamaguchi A, Nakayama K, Ohyama T, Watanabe T, Okamoto M, Baba H. Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Microbiol Immunol* 2001; 45: 649–656.
106. Hinode D, Nagata A, Ichimiya S, Hayashi H, Morioka M, Nakamura R. Generation of plasma kinin by three types of proteases isolated from *Porphyromonas gingivalis* 381. *Arch Oral Biol* 1992; 37: 859–868.
107. Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease. *J Periodontol* 1976; 47: 1–18.
108. Armitage GC, Dickinson WR, Jenderseck RS, Levine SM, Chambers DW. Relationship between the percentage of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. *J Periodontol* 1982; 53: 550–556.
109. Onagawa M, Ishihara K, Okuda K. Coaggregation between *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Bull Tokyo Dent Coll* 1994; 35: 171–181.
110. Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodontol Res* 1995; 30: 332–341.
111. Batista da Silva AP, Lee W, Bajenova E, McCulloch CA, Ellen RP. The major outer sheath protein of *Treponema denticola* inhibits the binding step of collagen phagocytosis in fibroblasts. *Cell Microbiol* 2004; 6: 485–49
112. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, Socransky SS. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 346–353.
113. Yang HW, Huang YF, Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol* 2004; 75: 1077–1083.
114. Suda R, Kabayashi M, Nanba R, Iwamaru M, Hayashi Y, Lai CH, Hasegawa K. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. *J Periodontol* 2004; 75: 1084–1089.
115. Umeda M, Miwa Z, Takeuchi Y, Ishizuka M, Huang Y, Noguchi K, Tanaka M, Takagi Y, Ishikawa I. The distribution of periodontopathic bacteria among Japanese children and their parents. *J Periodontol Res* 2004; 39: 398–404.

116. Scannapieco FA. Position paper of the American Academy of Periodontology: periodontal disease as a potential risk factor for systemic diseases. *J Periodontol* 1988; 69: 841–850.
117. Chung H-J, Chung C-P, Son S-H, Nisengard RJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1989;60:506-511.
118. Christersson LA, Albini B, Zambon JJ, Wikesjo UM, Gen- co RJ. Tissue localization of Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontitis. I. Light, immuno- fluorescence and electron microscopic studies. *J Periodontol* 1987; 58: 529-539.
119. Blix IJ, Hars R, Preus HR, Helgeland K. Entrance of Actinobacillus actinomycetemcomitans into HEp-2 cells in vitro. *J Periodontol* 1992; 63: 723-728.
120. Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM. Evidence for invasion of a human oral cell line by Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect Immun* 1991: 2719-2726.
121. Rodenburg JE, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Goene RJ, Abbas F, de Graaff J. Occurrence of Bacteroidesgingivalis, Bacteroides intermedius a n d Actinobacillus actinomycetemcomitans in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 392-399.
122. Zambon JJ, Christersson LA, Slots J. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol* 1983; 54: 707-71 1.
123. Ministero della salute. Malattie cardiovascolari, 2017. Disponibile on line da <http://www.salute.gov.it/portale/donna/dettaglioContenutiDonna.jsp?id=4490&area=Salute%20donna&menu=patologie>.
124. World Health Organization. Cardiovascular disease (CDVs), 17 Maggio 2017. Disponibile on line da <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/>.
125. Istat. Le principali cause di morte in Italia Anno 2012. *ISTAT*, 3 Dicembre 2014.
126. Carpino G, Gaudio E. Caratteristiche morfologiche e meccanismi di rottura della placca aterosclerotica. *Giornale Italiano dell'Arteriosclerosi*. 2015;6(1):3-14.

127. Bartova I, Sommerova P, Lyuya-Mi Y, Mysak J, Prochazkova J, Duskova J, Janatova T, Podzimek S. Periodontitis as a Risk Factor of Atherosclerosis. *Journal of Immunology Research*. 2014;2014: 636893.
128. Progetto Perio-Medicine. Merli M, Cortellini P, Carrassi A, de Sanctis M, Tonetti M. Malattie parodontali e malattie sistemiche. *SlidP*. 21 maggio 2019.
129. Schoen FJ (2004) The heart. In: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Ed., Kumar V, Fausto N, Abbas a (eds.), Philadelphia, WB Saunders, pp 555–618.
130. Ministero della salute. Malattie delle valvole cardiache, 2013. Disponibile on line http://www.salute.gov.it/portale/salute/p1_5.jsp?id=36&area=Malattie_cardiovascolari.
131. Eweborn GW, Schirmer H, Heggelund G, Lunde P, Rasmussen K. The evolving epidemiology of valvular aortic stenosis. the Tromso study. *Heart (British Cardiac Society)* 2013; 99(6): 396-400.
132. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; 60(19): 1854-63.
133. Carabello BA, Paulus WJ. Aortic stenosis. *Lancet* 2009; 373(9667): 956-66.
134. Demer LL. Cholesterol in vascular and valvular calcification. *Circulation*. 2001;104:1881–1883.
135. O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:523–532.
136. Olsson M, Thyberg J, Nilsson J. Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:1218 –1222.
137. Goldstein JL, Brown MS. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70:2804 –2808.
138. Rajamannan NM, Edwards WD, Spelsberg TC. Hypercholesterolemic aortic-valve disease. *N Engl J Med*. 2003;349:717–718.

139. Oliveira FAF, Fernandes Forte CPF, de Barros Silva PG, Lopes CB, Carvalho Montenegro R, Campos Ribeiro dos Santos AK, Martins Rodrigues Sobrinho CR, Lima Mota MR, Bitu Sousa F, Negreiros Nunes Alves AP. Molecular Analysis of Oral Bacterial in Heart Valve of Patient with Cardiovascular Disease by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Nov;94(47): e2067
140. Nyström-Rosander C, Lindh U, Ilbäck NG, Hjelm E, Lindqvist O, Friman G. Interactions between chlamydia pneumoniae and trace elements: a possible link to aortic valve sclerosis. *Biol Trace Elem Res*. 2003;91:97–110.
141. Turgeman Y, Levahar P, Lavi I, Shneur A, Colodner R, Samra Z, Bloch L, Rosenfeld T. Adult calcific aortic stenosis and chlamydia pneumoniae: the role of chlamydia infection in valvular calcification. *Isr Med Assoc J*. 2006;8:464–468.
142. Murdoch DR, Corey GR, Hoen B, et al, and the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study (ICE-PCS) Investigators. Clinical presentation, etiology, and outcome of infective endocarditis in the 21st century: the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study. *Arch Intern Med* 2009; 169: 463–73.
143. Yew HS, Murdoch DR. Global trends in infective endocarditis epidemiology. *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14: 367–72.
144. Balachandran K, Sucusky P, Jo H, Yoganathan AP. Elevated cyclic stretch alters matrix remodeling in aortic valve cusps: implications for degenerative aortic valve disease. *Am J Physiol*. 2009;296:H756–H764.
145. Seckeler MD, Hoke TR. The worldwide epidemiology of acute rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Clin Epidemiol* 2011; 3: 67–84.
146. Correa de Sa DD, Tleyjeh IM, Anavekar NS, et al. Epidemiological trends of infective endocarditis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 2010; 85: 422–26.
147. Selton-Suty C, Célard M, Le Moing V, et al, and the AEPEI Study Group. Preeminence of Staphylococcus aureus in infective endocarditis: a 1-year population-based survey. *Clin Infect Dis* 2012; 54: 1230–39.
148. Molton JS, Tambyah PA, Ang BSP, Ling ML, Fisher DA. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 1310–18.

ha eliminato: <#>Oliveira FAF, Fernandes Forte CPF, de Barros Silva PG, Lopes CB, Carvalho Montenegro R, Campos Ribeiro dos Santos AK, Martins Rodrigues Sobrinho CR, Lima Mota MR, Bitu Sousa F, Negreiros Nunes Alves AP. Molecular Analysis of Oral Bacterial in Heart Valve of Patient with Cardiovascular Disease by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Nov;94(47): e2067

149. Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 2014; **27**: 870–926.
150. Chu VH, Woods CW, Miro JM, et al, and the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study Group. Emergence of coagulase-negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. *Clin Infect Dis* 2008; **46**: 232–42.
151. Chu VH, Miro JM, Hoen B, et al, and the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study Group. Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis—a contemporary update based on the International Collaboration on Endocarditis: prospective cohort study. *Heart* 2009; **95**: 570–76.
152. Nigo M, Munita JM, Arias CA, Murray BE. What’s new in the treatment of enterococcal endocarditis? *Curr Infect Dis Rep* 2014; **16**: 431.
153. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 177–207.
154. Baddley JW, Benjamin DK Jr, Patel M, et al, and the International Collaboration on Endocarditis-Prospective Cohort Study Group (ICE-PCS). Candida infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; **27**: 519–29.
155. Ramos J, Monteagudo JM, Gonzalez-Alujas T, Fuentes ME, Sitges M, Pena ML, et al. Large-scale assessment of aortic stenosis: facing the next cardiac epidemic? *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2018;19:1142-8.
156. Geerts SO, Legrand V, Charpentier J, Albert A, Rompen EH. Further evidence of the association between periodontal conditions and coronary artery disease. *J Periodontol* 2004; **75**:1274-80
157. Mattila KJ. Dental infections as a risk factor for acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 1993;14(suppl K):51–53.
158. DeStefano F, Anda RF, Kahn HS, Williamson DF, Russell CM. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality. *BMJ* 1993; **306**:688- 91.
159. Small A, Kiss D, Giri J, Anwaruddin S, Siddiqi H, Guerraty M, et al. Biomarkers of calcific aortic valve disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:623-32.
160. Chalupova M, Skalova A, Hajek T, Geigerova L, Kralova D, Liska P, et al. Bacterial DNA detected on pathologically changed heart valves using 16S rRNA gene amplification. *Folia Microbiol*. 2018;63:707-1

161. Bayram A, Erdoğan MB, Ekşi F, Yamak B. Demonstration of Chlamydomphila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in atherosclerotic coronary arteries, nonrheumatic calcific aortic and rheumatic stenotic mitral valves by polymerase chain reaction. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2011 May;11(3):237-43.
162. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994; 90:844-53.
163. Galante A, Pietroiusti A, Vellini M, Piccolo P, Possati G, De Bonis M, Grillo RL, Fontana C, Favalli C. C-reactive protein is increased in patients with degenerative aortic valvular stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:1078-82.
164. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kiliç R, Sarikoç A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK, et al. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 2003; 170:205-11.
165. Jian B, Narula N, Li QY, Mohler ER 3rd, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg* 2003; 75:457-65, discussion 465-6.
166. Toutouzas K, Drakopoulou M, Synetos A, Tsiamis E, Agrogiannis G, Kavantzias N, Patsouris E, Iliopoulos D, Theodoropoulos S, Yacoub M, et al. In vivo aortic valve thermal heterogeneity in patients with nonrheumatic aortic valve stenosis the: first in vivo experience in humans. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:758-63.
167. Beck JD, Offenbacher S, Williams R, Gibbs P, Garcia R. Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease?. *Annals of Periodontology.* 1998;3(1):127-141.
168. Jshipura KJ, Rimm EB, Douglass CW, Trichopoulos D, Ascherio A, Willett WC. Poor oral health and coronary heart disease. *J Dent Res.* 1996 Sep;75(9):1631-6.
169. Meurman J, Sanz M, Janket S. Oral Health, atherosclerosis, and cardiovascular disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine.* 2004;15(6):403-413.
170. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* 2001;25:8-20.

171. Noack B, Genco RJ, Trevisan M, Grossi S, Zambon JJ, De Nardin E. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *J Periodontol* 2001;72:1221-7.
172. Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Papapanou PN, et al. Relationship between periodontal disease, tooth loss, and carotid artery plaque: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Stroke* 2003;34:2120-5.
173. Jansson L, Lavstedt S, Frithiof L, Theobald H. Relationship between oral health and mortality in cardiovascular diseases. *J Clin Periodontol* 2001; 28:762-8.
174. Kinane DF, Riggio MP, Walker KF, MacKenzie D, Shearer B. Bacteraemia following periodontal procedures. *Journal of Clinical Periodontology*. 2005;32:708-713.
175. Fiehn NE, Larsen T, Christiansen N, Holmstrup P, Schroeder TV. Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *Journal of Periodontology*. 2005; 76(5):731-736.
176. Folwaczny M, Wilberg S, Bumm C, Hollatz S, Oberhoffer R, Neidenbach RC, Kaemmerer H, Frasher I. Oral Health in Adults with Congenital Heart Disease. *J Clin Med*. 2019;8(8):1255.
177. Rajasuo A, Perkki K, Nyfors S, Jousimies-Somer H, Meurman JH. Bacteremia following surgical dental extractions with an emphasis on anaerobic strains. *J Dent Res*. 2004;83:170–174.
178. Strom BL, Abrutyn E, Berlin JA, Kinman JL, Feldman RS, Stolley PD, Levison ME, Korzeniowski OM, Kaye D. Dental and cardiac risk factors for infective endocarditis: a population-based case-control study. *Ann Intern Med*. 1998;129:761–769.
179. Herzberg MC, Weyer MW. Dental Plaque, platelets, and cardiovascular diseases. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1): 151-60.
180. Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 1998;66(11):5337-43.
181. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE- deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*. 1994;14:133–140.
182. Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, Lu Y, Papapanou PN, Schmidt AM. Oral infection with a periodontal pathogen

- accelerates early atherosclerosis in alipoprotein E-null mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2003;23:1405-1411.
183. Stelzel M, Conrads G, Pankuweit S, Maisch B, Vogt S, Moosdorf R, Flores-de-Jacoby L. Detection of *Porphyromonas gingivalis* DNA in aortica tissue by PCR. *Journal of Periodontology*. 2002;73:868-870.
184. Cairo F, Gaeta C, Dorigo W, Oggioni MR, Pratesi C, Pini Prato GP, Pozzi G. Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial. *J Periodontol Res*. 2004;39(6):442-6.
185. Ziebolz D, Jahn C, Pegel J, Semper-Pinnecke E, Mausberg RF, Waldmann-Beushausen R, Schöndube FA, Danner BC. Periodontal bacteria DNA findings in human cardiac tissues - Is there a link of periodontitis to heart valve disease?. *International Journal of Cardiology*. 2018b;251:74-89.
186. Ziebolz D, Rost C, Schmidt J, Waldmann-Beushausen R, Schöndube FA, Mausberg RF, Danner BC. Periodontal Bacterial DNA and Their Link to Human Cardiac Tissue: Findings of a Pilot Study. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2018a;66(1):83-90.
187. Finlay BB, Falkow S: Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:136–139.
188. Saglie FR, Marfany A, Camargo P: Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. *J Periodontol* 1988;59:259–265.
189. Meyer DH, Lippmann JL, Fives-Taylor PM (1996). Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun* 64:2988-2997.
190. Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H: Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun* 1993;61:2260–2265.
191. Njoroge T, Genco RJ, Sojar HT, Hamada N, Genco CA: A role for fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelial cells. *Infect Immun* 1997;65:1980–1984.
192. Abranches J, Miller JH, Martinez AR, Simpson-Haidaris PJ, Burne RA, Lemos JA. The collagen-binding protein Cnm is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun* 2011;79:2277-2284.
193. Que YA, Moreillon P. Infective endocarditis. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:322- 336.

194. Pant S, Patel NJ, Deshmukh A, Golwala H, Patel N, Badheka A, et al. Trends in infective endocarditis incidence, microbiology, and valve replacement in the United States from 2000 to 2011. *J Am Coll Cardiol* 2015;65(19):2070–6.
195. Murdoch DA, Shah HN. Reclassification of *Peptostreptococcus magnus* (Prevot 1933) Holdeman and Moore 1972 as *Finegoldia magna* comb. nov. and *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) Smith 1957 as *Micromonas micros* comb. nov. *Anaerobe* 1999;5(5):555–9.
196. Kim SL, Gordon SM, Shrestha NK. Distribution of streptococcal groups causing infective endocarditis: a descriptive study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 91 (2018) 269–272.
197. Bale BF, Doneen AL, Vigerust DJ. High-risk periodontal pathogens contribute to pathogenesis of atherosclerosis. *Postgrad Med J*. 2017;93:215-220.
198. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *American Journal of Cardiology*. 1990a;65:297-302.
199. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. *American Journal of Periodontology*. 1990b;137:503-509.
200. Galea J, Armstrong J, Gadsdon P, Holden H, Francis SE, Holt CM. Interleukin-1 beta in coronary arteries of patients with ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1000-1006.
201. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92:657– 671.
202. Tonetti MS. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *J Clin Periodontol*. 2009;36(suppl 10):15–19.
203. Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, Pepys MB, Thompson SG, Collins R, Danesh J; Emerging Risk Factors Collaboration. C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet*. 2010;375: 132–140.
204. Ridker PM. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation*. 2003;107:363–369.
205. Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol*. 2000;71:1528 –1534.

206. Chun YH, Chun KR, Olguin D, Wang HL. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis. *J Periodontol Res.* 2005;40:87–95.
207. Offenbacher S, Elter JR, Lin D, Beck JD. Evidence for periodontitis as a tertiary vascular infection. *J Int Acad Periodontol.* 2005;7:39–48.
208. Maekawa T, Tabeta K, Kajita-Okui K, Nakajima T, Yamazaki K. Increased expression of C-reactive protein gene in inflamed gingival tissues could be derived from endothelial cells stimulated with interleukin-6. *Arch Oral Biol.* 2011;56:1312–1318.
209. Reynolds MA., Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. *Periodontol 2000.* 2014 Feb;64(1):7-19.
210. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, Bolger A, Cabell CH, Takahashi M, Baltimore RS, Newburger JW, Strom BL, Tani LY, Gerber M, Bonow RO, Pallasch T, Shulman ST, Rowley AH, Burns Jc, Ferrieri P, Gardner T, Goff D, Durack DT. Prevention of infective endocarditis, guidelines from the American Heart Association. *Circulation.* 2007;116:1736-1754.
211. Lang N, Tonetti MS, Periodontal risk assessment (PRA) for patients in supportive periodontal therapy (SPT). *Oral health and preventive dentistry,* 2003 (1): 7-16.
212. Salipante SJ, Sengupta DJ, Rosenthal C, Costa G, Spangler J, Sims EH, et al. Rapid 16S rRNA next-generation sequencing of polymicrobial clinical samples for diagnosis of complex bacterial infections. *PLoS One* 2013;8(5), e65226.
213. Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesaniemi YA, Syrjala SL, Jungell PS, Isoluoma M, Hietaniemi K, Jokinenet MJ. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ.* 1989;298(6676):779-81.
214. Aoyama N, Kobayashi N, Hanatanii T, Ashigaki N, Yoshida A, Shiheido Y, Sato H, Takamura C, Yoshikawa S, Matsuo K, Izumi Y, Isobe M. Periodontal condition in Japanese coronary heart disease patients: A comparison between coronary and non-coronary heart disease. *J Periodont Res.* 2018;1-7.
215. Sanchez P, Everett B, SalamonsonY, Ajwani S, Bhole S, Bishop J, et al. (2017) Oral health and cardiovascular care: Perceptions of people with cardiovascular disease. *PLoS One* 12 (7): e0181189.
216. Holde GE, Oscarson N, Trovik TA, Tillberg A, Jönsson B. Periodontitis Prevalence and Severity in Adults: A Cross-Sectional Study in Norwegian

- Circumpolar Communities. *Journal of Periodontology*, 2017 Oct;88(10):1012-1022.
217. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ, CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: Beck J (University of North Carolina, Chapel Hill, USA), Douglass G (Past President, American Academy of Periodontology), Page R (University of Washin. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *Journal of dental research*, 2012 Oct;91(10):914-20.
218. Albandar JM. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Review of Periodontol 2000*, 2014 Jun;65(1):13-26.
219. Ministero della salute. Linee guida nazionali per la promozione della salute orale e la prevenzione delle patologie orali in età adulta, 2009. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1176_allegato.pdf.
220. Atarbashi-Moghadam F, Havaei SR, Havaei SA, Hosseini NS, Behdadmehr G, Atarbashi-Moghadam S. Periopathogens in atherosclerotic plaques of patients with both cardiovascular disease and chronic periodontitis. *ARYA Atheroscler*. 2018; Volume 14, Issue 2:53-57.
221. Gaetti-Jardim E, Marcelino SL, Feitosa ACR, Romito GA, Avila-Campos MJ. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *Journal of Medical Microbiology*. 2009;58:1568–1575.
222. Lim YK, Park SN, Shin JH, Chang YH, Shin Y, Paek J, Kim H, Kook JK. *Streptococcus periodonticum* sp. nov., Isolated from Human Subgingival Dental Plaque of Periodontitis Lesion. *Curr Microbiol*. 2019 Jul;76(7):835-841.
223. Chen YM, Tsai PH, Ye ZS, Huang YW, Shieh HR, Wu CH, Lin YJ, Miller JH, Abranches J, Chiu CH. Functional Analysis of the Collagen Binding Proteins of *Streptococcus parasanguinis* FW213. *mSphere*. 2020 Oct 14;5(5):e00863-20.
224. Woo PC, Teng JL, Tsang SN, Tse CW, Lau SK, Yuen KY. The oral cavity as a natural reservoir for *Streptococcus sinensis*. *Clin Microbiol Infect*. 2008 Nov;14(11):1075-9.
225. Goret J, Baudinet T, Camou F, Issa N, Gaillard P, Wirth G, Greib C, Barandon L, Mégraud F, Bébéar C, Peuchant O, Ménard A.. Identification of *Streptococcus sinensis* from a patient with endocarditis using MALDI-TOF mass spectrometry, 16S rDNA- and sodA-based phylogeny. *J Microbiol Immunol Infect* 2019;52:507–509.

226. Seta V, Teicher E, Fortineau N, Ladouceur M, Lambotte O. Infective endocarditis caused by *Streptococcus sinensis*. *Med Mal Infect* 2015;45:56e7.
227. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9:55–71.
228. Nagaoka K, Yanagihara K, Harada Y, Yamada K, Migiyama Y, Morinaga Y, Izumikawa K, Kohno S. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in lower respiratory tract specimens by real-time PCR. *J Infect Chemother*. 2017;23:69–73.
229. Kajiya T, Uemura T, Kajiya M, Kaname H, Hirano R, Uemura N, Tei C. Pyogenic liver abscess related to dental disease in an immunocompetent host. *Intern Med*. 2008;47:675–8.
230. Goldstein EJ, Summanen PH, Citron DM, Rosove MH, Finegold SM. Fatal sepsis due to a beta-lactamase-producing strain of *Fusobacterium nucleatum* subspecies polymorphum. *Clin Infect Dis*. 1995;20:797–800.
231. Shammass NW, Murphy GW, Eichelberger J, Klee D, Schwartz R, Bachman W. Infective endocarditis due to *Fusobacterium nucleatum*: case report and review of the literature. *Clin Cardiol*. 1993;16:72–5.
232. Kozarov EV. Human atherosclerotic plaque contains viable invasive actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(3):e17–e18.
233. Kurihara N, Inoue Y, Iwai T, et al. Detection and localization of periodontopathic bacteria in abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;28(5):553–558.
234. Figuero E, Sánchez-Beltrán M, Cuesta-Frechoso S, et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol*. 2011;82(10):1469–1477.
235. Hirunagi T, Kawanishi H, Mitsuma N, Goto Y, Mano K. [Aggregatibacter segnis endocarditis mimicking antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis presenting with cerebral hemorrhage: a case report]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2015;55(8):589-92. Japanese.
236. Moreno S, Botero J, Vásquez DF, Alba S, Castillo G, Beatriz P, Moreno F, Fernández H, Gallego S, Contreras A. Periodontal microbiota and microorganisms isolated from heart valves in patients undergoing valve replacement surgery in a clinic in Cali, Colombia. *Biomédica*. 2017;37(4):516-525.

237. Aimetti M, Romano F, Nessi F. Microbiologic Analysis of Periodontal Pockets and Carotid Atheromatous Plaques in Advanced Chronic Periodontitis Patients. *J Periodontol.* 2007;78:1718-1723.
238. Aquino AR, Lima KC, Paiva MS, Rocas IN, Siqueira JF Jr. Molecular survey of atheromatous plaques for the presence of DNA from periodontal bacterial pathogens, archaea and fungi. *J Periodontal Res.* 2011; 46(3): 303-9.
239. Abranches J, Zeng L, Bélanger M, Rodrigues PH, Simpson-Haidaris PJ, Akin D, Dunn WA Jr, Progulske-Fox A, Burne RA. Invasion of human coronary artery endothelial cells by *Streptococcus mutans* OMZ175. *Oral Microbiol Immunol.* 2009 Apr;24(2):141-5.
240. Marcelino SL, Gaetti-Jardim E Jr, Nakano V, Canônico LA, Nunes FD, Lotufo RF, Pustiglioni FE, Romito GA, Avila-Campos MJ. Presence of periodontopathic bacteria in coronary arteries from patients with chronic periodontitis. *Anaerobe.* 2010 Dec;16(6):629-32.
241. Pallasch TJ, Slots J. Antibiotic prophylaxis and the medically compromised patient. *Periodontol 2000* 1996;10:107-138.
242. Zaremba M, Górska R, Suwalski P, Kowalski J. Evaluation of the incidence of periodontitis-associated bacteria in the atherosclerotic plaque of coronary blood vessels. *J Periodontol.* 2007 Feb;78(2):322-7.
243. Pucar A, Milasin J, Lekovic V, Vukadinovic M, Ristic M, Putnik S, Kenney EB. Correlation between atherosclerosis and periodontal putative pathogenic bacterial infections in coronary and internal mammary arteries. *J Periodontol.* 2007 Apr;78(4):677-82.
244. Szule M, Kustrzycki W, Janczak D, Michalowska D, Baczynska D, Radwan-Oczko M. Presence of Periodontopathic Bacteria DNA in Atheromatous Plaques from Coronary and Carotid Arteries. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 825397.