



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102017000131513
Data Deposito	17/11/2017
Data Pubblicazione	17/05/2019

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	12	Q	1	689

Titolo

Metodo e kit per la diagnosi e la prognosi di parodontite e/o perimplantite

Metodo e kit per la diagnosi e la prognosi di parodontite e/o perimplantite

SETTORE DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce ad un metodo per la diagnosi di parodontite e/o perimplantite o per monitorare l'efficacia di una terapia di una parodontite e/o perimplantite rilevando in un campione biologico ottenuto da un soggetto la presenza di organismi specifici, relativo supporto e kit.

TECNICA ANTERIORE

La parodontite è una malattia multifattoriale che induce un'inflammazione gengivale, perdita di tessuto connettivo dell'osso alveolare, e in definitiva, la caduta del dente (1). La crescita del biofilm batterico sopra e subgengivale svolge un ruolo essenziale nello sviluppo e nella progressione della malattia.

Segno caratteristico della parodontite è la perdita di attacco connettivale. La distruzione dei tessuti di sostegno dei denti causata da una parodontite, nella maggior parte dei casi irreversibile, è classificata, secondo l'American Academy of Periodontology (1999), in aggressiva, cronica e necrotizzante.

In presenza di impianti, qualora il processo infiammatorio colpisca i tessuti perimplantari di sostegno si manifesta una perimplantite con perdita progressiva di tessuto osseo di supporto.

Le malattie parodontali, così come quelle perimplantari, sono provocate da alcune specie batteriche e sono influenzate nel loro decorso e gravità da numerosi fattori locali e sistemici, strettamente legati anche a lo stile di vita. Esistono, altresì, correlazioni tra la parodontite ed importanti patologie sistemiche quali le malattie cardiovascolari e le malattie dimetaboliche. Esistono anche correlazioni con la nascita di bambini pretermine e/o sottopeso.

La parodontite colpisce circa il 7-15% degli adulti del mondo occidentale, rendendola una delle malattie più comuni. Si tratta di una malattia multifattoriale in cui la presenza di batteri patogeni in una tasca tra dente e gengiva è un criterio necessario ma non sufficiente. Il sistema infiammatorio e il sistema immunitario ospitano anche un ruolo cruciale nello sviluppo della malattia. La progressione della parodontite è considerata una risposta infiammatoria cronica ai batteri subgengivali, con conseguente distruzione dei tessuti di supporto del dente. È ciclico nel suo comportamento e può rimanere inosservato nella sua fase iniziale.

Il processo distruttivo è considerato il risultato di una complessa interazione tra il sistema di difesa dell'ospite e specie batteriche specifiche nella tasca parodontale. I batteri patogeni coinvolti nell'apparenza e nella progressione della malattia parodontale includono, ma non sono limitati a *Porphyromonas gingivalis* (*Bacteroides gingivalis*), *Bacteroides forsythus* (ora chiamato anche *Tannerella forsythensis*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Triponema denticola* e *Prevotella intermedia*.

Le manifestazioni cliniche delle infezioni parodontali con eziologie e risposte immunitarie distinte possono essere molto simili (2,3) questo rende molto difficile la diagnosi clinica delle suddette patologie. Queste patologie sono associate ad un microbiota molto complesso e dinamico, e la ricerca di ceppi microbici specifici potrebbe essere utilizzata come un'importante strumento di diagnosi parodontale. L'habitat subgingivale è colonizzato da una grande varietà di microrganismi tra cui: nuove specie e specie ancora non coltivabili o difficili da coltivare (4,5). Molte di queste specie sono colonizzatori comuni del normale microbiota umano orofaringeo e in soggetti immunocompromessi possono essere associati a batteriemia / setticemia e/o endocardite (6,7,8,9,10).

Sui dati della letteratura il *C. hominis* è conosciuto come un batterio commensale della cavità orale. In un recente studio, l'analisi di biofilm subgingivali di pazienti con parodontite aggressiva, ha rilevato la presenza de *C. hominis* in assenza di altri batteri orali (11). *F. alocis* è uno dei pochi batteri associati a molteplici patologie orali tra cui la parodontite, la parodontite aggressiva localizzata, l'endodontite e la periimplantite. La relativa abbondanza nella tasca parodontale dei pazienti con parodontite può sostenere l'ipotesi di includere *F. alocis* come marcatore diagnostico (12).

Oggi i dentisti valutano la periodontite sondando la profondità della tasca parodontale, esaminando le immagini a raggi X dell'attacco del dente all'osso alveolare e si riferiscono al sanguinamento sulla sonda. I fattori di rischio includono le abitudini di fumo, lo stress e una storia familiare di parodontite. Il metodo si basa fortemente sull'esperienza soggettiva del dentista. La profondità di sondaggio è solo una misura della perdita dell'attaccamento, nel tempo, dando così poco informazione sull'eventuale presenza di parodontite o nella sua futura progressione. Il sanguinamento sulla sonda potrebbe indicare un processo di guarigione invece di uno distruttivo.

Occasionalmente viene prelevato un campione microbiologico e inviato ad un laboratorio per l'analisi mediante coltura o tecniche di DNA (tecnica di ibridazione DNA-DNA).

Tuttavia, la risposta viene ottenuta in circa una settimana e mostra solo la presenza di alcuni batteri, che non indica necessariamente la parodontite.

Sono stati effettuate diverse ricerche per trovare un composto chimico, principalmente una proteina, come un enzima o una citochina, nei liquidi dalla cavità orale di un paziente, come
5 il fluido crevicolare gengivale (GCF), che può diagnosticare o prevedere la progressione della parodontite.

Fino ad ora sono stati sviluppati diversi test dedicati all'identificazione di batteri, prodotti di virulenza di batteri o proteine dell'ospite.

Le proteine derivate dagli ospiti che sono state studiate per il loro valore diagnostico o
10 prognostico nella parodontite includono principalmente prodotti del sistema infiammatorio umano. Il ruolo di queste proteine è quello di orchestrare la risposta infiammatoria e immunitaria, il rimodellamento del tessuto o aiutare l'uccisione dei batteri invadenti.

Le proteine derivate dall'esterno, studiate per la diagnosi di parodontite, comprendono le proteine della serina naturale (catepsina G, azurocidina, proteinasi 3, elastasi), collagenasi,
15 aminotransferasi (brevetti statunitensi 4,981,787, 5,834,226 e 4,801,535), fosfatasi alcalina, β -glucuronidasi (brevetti statunitensi n. 5,736,341 e 6,280,687) e citochine come interleuchine (in particolare IL-1 β (brevetto statunitense n. 5,328,829), IL-6 e IL-8) e mediatori infiammatori come la prostaglandina E2 e fattore di necrosi tumorale (TNF- α).

Il brevetto statunitense n. 5.248.595 descrive un metodo per analizzare contemporaneamente
20 fino a tre diversi patogeni parodontali.

Inoltre, Yu et al. (13) riportano la distribuzione di Synergistetes in nicchie sane o nicchie parodontali o per-implantali patologiche. Carrouel et al. (14), riportano la rivelazione quantitativa di 19 patogeni nel biofilm periodontale di giovani adulti sani. Da Silva et al.,
(15), hanno esaminato la diversità associata agli impianti con o senza periimplantitis ed
25 identificato le differenze di comunità batteriche in queste condizioni cliniche.

Fino ad oggi sono stati sviluppati molti metodi per valutare l'attività della malattia parodontale. Tuttavia, nessuno di questi metodi sopra descritti è sufficiente e preciso per diagnosticare la parodontite e il suo schema distruttivo. Una conseguenza di metodi non specifici è che molti pazienti sono trattati senza essere affetti dalla parodontite. Le
30 osservazioni cliniche come la profondità di sondaggio non sono abbastanza affidabili perché le tasche profonde non necessariamente portano ad una infiammazione continua, le valutazioni radiografiche devono essere combinate con osservazioni cliniche dettagliate per dare una diagnosi accurata. Inoltre le diagnosi finora sviluppate basate su metodi enzimatici

per proteine derivate da ospite o batteri non sono state sufficientemente specifiche a causa del fatto che un substrato enzimatico può essere tagliato da una moltitudine di enzimi diversi. Così il dentista ha bisogno di un kit di diagnosi che preferibilmente sia rapido, che produca risultati entro pochi minuti, che richieda una quantità minima di tempo e di lavoro e che sia sicuro da poter utilizzare in clinica. Il kit deve fornire risultati facilmente interpretabili, deve avere una lunga durata di vita a temperatura ambiente o in frigorifero.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Un oggetto della presente invenzione è quello di superare gli inconvenienti della tecnica nota e di fornire un metodo e relativo kit che soddisfi le attuali esigenze dei dentisti. Più in particolare, la presente invenzione mira a fornire un kit e un metodo per rilevare malattie parodontali specifiche, sensibili e facili da usare. In particolare il kit e il metodo stesso consentono di non ottenere risultati “falsi negativi”.

Nella presente invenzione è stato caratterizzato il microbioma delle tasche parodontali e dei siti affetti da perimplantite e sono state messe in evidenza differenze a livello delle comunità batteriche che contraddistinguono la parodontite e la perimplantite.

L'individuazione di queste specie batteriche consente di implementare la gamma dei patogeni tradizionalmente analizzati nei test parodontali, per fornire un nuovo prodotto diagnostico che delinea in modo più specifico il quadro microbiologico parodontale nella totalità dei pazienti. I patogeni che caratterizzano la malattia perimplantare e parodontale, consentendo lo sviluppo di nuovi e specifici test microbiologici da utilizzare nella prevenzione e nel trattamento della perimplantite e/o della parodontite.

La presente invenzione può essere utilizzata per aiutare i dentisti e gli igienisti dentali per una diagnosi ed un trattamento più efficace della malattia parodontale e/o perimplantite. Il kit e il metodo secondo l'invenzione possono essere utilizzati per seguire l'andamento di un trattamento, per decidere la forma più appropriata di trattamento, per scegliere il giusto tipo di antibiotici e per comunicare al paziente l'importanza del bene l'igiene quotidiana dei denti.

Forma pertanto oggetto della presente invenzione un metodo per la diagnosi di parodontite e/o perimplantite o per monitorare l'efficacia di una terapia di una parodontite e/o perimplantite comprendente rilevare in un campione biologico la presenza delle seguenti specie batteriche: *Filifactor Alocis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Synergistetes*, *Leptotrichia buccalis*, *Rothia dentocariosa*, *Cardiobacterium hominis* e *Capnocytophaga sputigena*.

Preferibilmente la presenza contemporanea delle seguenti specie batteriche: *Filifactor Alocis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Synergistetes*, *Leptotrichia buccalis*, *Rothia dentocariosa*, *Cardiobacterium hominis* e *Capnocytophaga sputigena* è rilevata.

Preferibilmente la quantità delle specie batteriche: *Filifactor Alocis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Synergistetes*, *Leptotrichia buccalis*, *Rothia dentocariosa*, *Cardiobacterium hominis* e *Capnocytophaga sputigena* è misurata.

Preferibilmente detto campione biologico è un fluido orale o un campione di placca, preferibilmente il fluido orale si intende saliva o liquido crevicolare gengivale (GCF).

Preferibilmente, detto soggetto è un mammifero, preferibilmente un umano.

10 Preferibilmente il rilevamento della presenza di *Filifactor Alocis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Synergistetes* e *Leptotrichia buccalis* avviene tramite una sonda in grado di ibridare con un frammento di SEQ ID No. 2 di *Filifactor Alocis*, con un frammento di SEQ ID No. 1 di *Porphyromonas endodontalis*, con un frammento di SEQ ID No. 3 di *Synergistetes* e con un frammento di SEQ ID No. 5 di *Leptotrichia buccalis*, preferibilmente
15 il rilevamento della presenza di *Rothia dentocariosa*, *Cardiobacterium hominis* e *Capnocytophaga sputigena* avviene tramite almeno una sonda in grado di ibridare con un frammento di SEQ ID No. 7 di *Rothia dentocariosa*, con un frammento di SEQ ID No. 4 di *Cardiobacterium hominis*, con un frammento di SEQ ID No. 6 di *Capnocytophaga sputigena*.

20 Preferibilmente il metodo comprende ulteriormente il rilevamento nello stesso campione di *P.gingivalis*, *T.denticola*, *T.forsythia*, *P.micros*, *F.nucleatum ssp.*, *P.intermedia*, *C.rectus*, *E.corrodens*, *A.actinomycetemcomitans*.

Forma ulteriore oggetto dell'invenzione un supporto comprendente una sonda di acido nucleico in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 2 di *Filifactor Alocis*, una
25 sonda di acido nucleico in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 1 di *Porphyromonas endodontalis*, una sonda di acido nucleico in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 3 di *Synergistetes* e una sonda di acido nucleico in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 5 di *Leptotrichia buccalis*, una sonda in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 7 di *Rothia dentocariosa*, una sonda in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 4 di *Cardiobacterium hominis* e una sonda
30 in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 6 di *Capnocytophaga sputigena*.

Forma ulteriore oggetto dell'invenzione un kit comprende il supporto come descritto sopra e il suo utilizzo per la diagnosi di parodontite e/o perimplantite o per monitorare l'efficacia di una terapia di una parodontite e/o perimplantite.

5 Tale kit comprende un contenitore con dei coni di carta sterile, per effettuare il campionamento e una provetta in cui il clinico, una volta effettuato il prelievo, li riponga. Il kit contiene le istruzioni per l'utilizzo. Il kit si può presentare sotto forma di scatola.

I termini "malattia parodontale" e la parodontite sono definiti nel Workshop internazionale per la classificazione delle malattie e delle condizioni periodontali del 1999.

10 Con il termine perimplantite si riconosce un'infezione caratterizzata da cambiamenti infiammatori localizzati nei tessuti che circondano gli impianti. Si instaurano processi infiammatori che, inizialmente interessano la gengiva adesa all'impianto e successivamente si spingono in profondità: si assiste ad un riassorbimento dell'osso che si concretizza in una progressiva mobilità dell'impianto che, in tempi variabili da caso a caso, porta alla perdita dello stesso.

15 L'inserimento degli impianti dentali è una procedura che nasce dall'esigenza di ripristinare la funzionalità degli elementi dentali persi a causa di patologie cariose o parodontali. La vite dell'impianto, in titanio, viene inserita all'interno dell'osso attraverso un intervento chirurgico di carattere microinvasivo; successivamente si assiste ad un processo di guarigione dei tessuti che prende il nome di osteointegrazione. I tessuti dell'organismo si devono, infatti, adattare a questa nuova situazione e 'far propria' la vite che è stata inserita.

20 Tuttavia, un certo numero di impianti va incontro a fallimento a distanza di anni dall'avvenuta osteointegrazione, a causa della malattia perimplantare clinicamente suddivisibile in mucosite perimplantare e perimplantite. La mucosite perimplantare viene definita come una lesione di tipo infiammatorio limitata ai tessuti mucosi che circondano

25 l'impianto e che può essere reversibile, mentre la perimplantite è caratterizzata da lesioni infiammatorie causate dall'accumulo di placca batterica intorno alle superfici implantari che producono una progressiva perdita di supporto osseo perimplantare, sino alla perdita dell'impianto. Mentre la diagnosi di mucosite si basa sulla presenza esclusiva di sanguinamento al sondaggio a carico della mucosa perimplantare, per la diagnosi di malattia

30 perimplantare è necessario un aumento della profondità di sondaggio superiore a 4mm, la presenza di sanguinamento al sondaggio e perdita ossea perimplantare. Dati della SIDP del 2014 stimano una prevalenza della perimplantite pari al 10% degli impianti durante i primi

5-10 anni successivi al posizionamento degli impianti stessi. Nel Consensus Report of the

Sixth European Workshop in Periodontology del 2008, viene riportata un'incidenza mondiale della perimplantite tra il 28% e il 56% dei soggetti e 12-46% dei siti di impianto. Inoltre, i pazienti parodontali mostrano un'incidenza di perimplantite almeno sei volte superiore rispetto ai non parodontali con percentuali di perimplantite che vanno dal 10 al 50% entro 10 anni dal posizionamento. In considerazione del fatto che solo in Italia vengono posizionati circa un milione e mezzo di impianti all'anno, contro 1.6 milioni degli Stati Uniti e 70 mila in Gran Bretagna, è evidente che la perimplantite rappresenta un problema di emergente attualità. Una profonda conoscenza dell'eziologia microbica della malattia perimplantare è pertanto di enorme importanza per poter eseguire una specifica prevenzione e un'adeguata diagnosi anche nelle fasi più precoci orientando il clinico ad una terapia e ad un follow-up più mirato per evitare o ridurre l'impatto della perimplantite. La progressione di perimplantite può risolversi non solo nella perdita degli impianti ma può dar luogo anche a sinusite mascellare, frattura mandibolare, o l'infezione di altri impianti o denti naturali. La diagnosi di eventuali fattori di rischio e il loro controllo prima di posizionare gli impianti, evitano in larga misura, l'insorgenza di malattie del per impianto.

Terapia parodontale e/o perimplantare

Per redigere un piano di cura personalizzato dei pazienti parodontali, occorre valutare sia la situazione clinica orale, che gli aspetti microbiologici e la suscettibilità individuale alla malattia parodontale.

E' stato messo a punto un protocollo di terapia parodontale standard, con un range di sedute minime e massime di trattamento, sia meccanico che laser, da osservare al fine di ottenere un risultato stabile sia clinico che microbiologico. Essendo la malattia parodontale multifattoriale, nel corso del trattamento, a seconda della risposta immunitaria del paziente e della sua disponibilità, viene valutato se modificare e personalizzare la terapia.

Le sedute di terapia meccanica (ablazione del tartaro), volte a rendere le superfici radicolari lisce, possono oscillare da un minimo di 2 sedute, se il paziente presenta solo tartaro sopragengiva e placca batterica, ad un massimo di 10 (essendo richiesto molto più lavoro da parte dell'operatore clinico), nei casi in cui il paziente presenta grossi accumuli di tartaro sia sopra che sottogengiva.

Durante tutta la fase di trattamento meccanico, il paziente viene costantemente istruito e motivato all'igiene orale domiciliare, poiché, al fine di ottenere una buona risposta alla terapia, è importante mantenere un indice di placca inferiore al 20 %. Quindi, prima di ogni

seduta di ablazione del tartaro, l'operatore individua i siti parodontali con placca e, se questa percentuale dovesse essere alta, illustra al paziente tutti i presidi per ridurla. Anche durante la terapia fotodinamica l'igienista rivaluta la compliance del paziente.

5 Motivare il paziente a mettere in atto un controllo della placca efficace è uno degli elementi più critici per il successo a lungo termine della terapia parodontale e il processo di responsabilizzazione del paziente spesso richiede diverse visite per dare risultati.

Terminata la fase meccanica, la terapia fotodinamica laser assistita è volta a decontaminare, i tessuti parodontali dalla presenza dei batteri patogeni, causa primaria dell'infezione.

10 Il numero minimo di trattamenti laser completi è di 4 sedute per i pazienti che presentano un'alta carica batterica totale, ma bassa concentrazione di batteri appartenenti al complesso rosso, assetto microbiologico che correla con una parodontite moderata. Il numero di sedute può essere portato ad un massimo di 7, quando la diagnosi di parodontite è severa e, oltre ad essere alta la carica batterica totale, è anche alta la percentuale di batteri appartenenti al complesso rosso, con presenza dei batteri *A. Actinomycetemcomitans* e *P. Gingivalis*.

15 Una volta terminata la terapia fotodinamica completa, viene eseguita quella parziale (rientri laser), che è concentrata solo sulle tasche parodontali che presentano ancora sondaggi patologici e infiammazione, con un numero di sedute che varia da un minimo di 4 ad un massimo di 8. Una volta portato a termine il protocollo di cura, con sedute complete e rientri, viene valutata la situazione, facendo riferimento al numero di siti patologici individuati
20 durante la compilazione della cartella parodontale all'inizio della terapia, e quanto il paziente abbia risposto clinicamente ai trattamenti completi. Anche in occasione dei rientri laser, l'operatore ricontrolla la compliance del paziente e rimuove meccanicamente la placca riformatasi, prima di effettuare il passaggio laser. Inoltre, alla fine di ogni seduta, fornisce nuovamente le istruzioni di igiene orale domiciliare, attraverso l'utilizzo dello spazzolino
25 elettrico o sonico, scovolini e filo interdentale e, in caso di necessità, anche l'utilizzo dell'idropulsore.

Oltre a quelle iniziali eseguite dopo la visita medico specialistica, le analisi microbiologiche vengono ripetute dopo il trattamento laser completo e durante la terapia di mantenimento, per monitorare la carica batterica nei mesi successivi alla terapia attiva ed intercettare in
30 tempo possibili recidive.

La presente invenzione verrà descritta in esempi non limitativi, facendo riferimento alle seguenti figure:

Figura 1. Grafico di rarefazione in cui la media delle specie (observed otus) è riportata per ogni trattamento per ogni livello di sub-campionamento delle sequenze.

Figura 2. Rappresentazione delle classifiche dei complessi “rossi”: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Peptostreptococcus micros* (la presenza di questi batteri è prevalentemente associata alla parodontite avanzata (tasche profonde) ed alla perimplantite) poi quelli del complesso “arancione”: *Fusobacterium nucleatum ssp.*, *campylobacter rectus* e *Prevotella intermedia* (la presenza di questi batteri è prevalentemente associata alle forme iniziali o moderate di malattia parodontale, oppure nelle fasi di guarigione e quello appartenente allo complesso “verdi”: *Eikenella corrodens* la presenza di questi batteri sono associati alla salute del cavo orale. Fu evidenziato che l’associazione di questi batteri all’interno delle biopellicole non è casuale: sono stati fino ad ora riconosciuti sei gruppi di specie batteriche strettamente associate e definiti come complessi di vario colore in base agli aspetti clinici derivanti dalla loro colonizzazione (Socransky et al 1998), (16).

15

SEQUENZE

>GU409163.1 **Porphyromonas endodontalis** clone WWP_SS9_C14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

OLIGO	start	len	tm	gc%	any th	3' th	hairpin
<u>seq</u>							
2 LEFT PRIMER	588	20	58.93	55.00	0.00	0.00	0.00
GCTCAACTGTAGTCTTGCCG							
RIGHT PRIMER	755	20	58.76	50.00	0.00	0.00	0.00
TGTTTGATCCCCACGCTTTC							
INTERNAL OLIGO	620	20	60.02	55.00	0.00	0.00	0.00
TGCTAGAGAGGAGACGAGGT							

PRODUCT SIZE: 168, PAIR ANY_TH COMPL: 0.00, PAIR 3'_TH COMPL: 0.00

30 SEQ ID NO. 1

1 GATGAACGCTAGCGATAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCATTATTTTAGCTTG

35 61 CTAAGATAGATGGCGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAACCTGCCTGTAATTA

121 GGAATAAACCCTGGTAAAGTCGACTAATACCCTATATTCTTTTTTTTCCGCATGGAGAA

40

181 GGACGGAAAGATTTATTGATTACAGATGGGCATGCGTCCCATTAGCTCGTTGGTAAGGTA

45

241 ACGGCTTACCAAGGCAACGATGGGTAGGGGGACTGAGAGGTTGACCCCCACACTGGTAT

Studio della popolazione

Sono stati analizzati complessivamente 247 campioni suddivisi nei seguenti gruppi distinti:

- 5 **-Pazienti “falsi negativi”:** pazienti con un quadro clinico di parodontite moderata o severa, presenza di tasche parodontali superiori ai 4 mm di profondità, sanguinamento gengivale in più siti e/o presenza di suppurazione, ma con un quadro microbiologico negativo, che non correlava con i segni clinici della malattia in fase attiva ed in particolar modo caratterizzati da assenza dei principali patogeni parodontali analizzati (*A.actinomycetencomitans* e *P. gingivalis*) e conta dei batteri appartenenti al complesso rosso inferiore a quella che caratterizza i soggetti malati.
- 10 **-Pazienti con parodontite prima di iniziare una terapia (nominato anche gruppo “parodontite PRE”):** sono stati inclusi pazienti con quadro clinico di malattia parodontale in fase attiva (dallo stadio iniziale a quello severo) con presenza di sanguinamento gengivale e/o suppurazione in più siti, presenza di tartaro ematico, profondità di sondaggio superiore ai 4 mm, riassorbimento osseo in più siti e con un quadro microbiologico che correlasse con
- 15 i segni clinici presenti ed in particolar modo presenza dei batteri appartenenti al complesso rosso, considerati i principali patogeni parodontali, carica batterica totale alta.
- E’ stato messo a punto un protocollo di terapia parodontale standard, con un range di sedute minime e massime di trattamento, sia meccanico che laser, da osservare al fine di ottenere un risultato stabile sia clinico che microbiologico. Essendo la malattia parodontale
- 20 multifattoriale, nel corso del trattamento, a seconda della risposta immunitaria del paziente e della sua disponibilità, viene valutato se modificare e personalizzare la terapia.
- Le sedute di terapia meccanica (ablazione del tartaro), volte a rendere le superfici radicolari lisce, possono oscillare da un minimo di 2 sedute, se il paziente presenta solo tartaro sopragengiva e placca batterica, ad un massimo di 10 (essendo richiesto molto più lavoro da
- 25 parte dell’operatore clinico), nei casi in cui il paziente presenta grossi accumuli di tartaro sia sopra che sottogengiva.
- Durante tutta la fase di trattamento meccanico, il paziente viene costantemente istruito e motivato all’igiene orale domiciliare, poiché, al fine di ottenere una buona risposta alla terapia, è importante mantenere un indice di placca inferiore al 20 %. Quindi, prima di ogni
- 30 seduta di ablazione del tartaro, l’operatore individua i siti parodontali con placca e, se questa percentuale dovesse essere alta, illustra al paziente tutti i presidi per ridurla. Anche durante la terapia fotodinamica l’igienista rivaluta la compliance del paziente.

Motivare il paziente a mettere in atto un controllo della placca efficace è uno degli elementi più critici per il successo a lungo termine della terapia parodontale e il processo di responsabilizzazione del paziente spesso richiede diverse visite per dare risultati.

5 Terminata la fase meccanica, la terapia fotodinamica laser assistita è volta a decontaminare, i tessuti parodontali dalla presenza dei batteri patogeni, causa primaria dell'infezione.

Il numero minimo di trattamenti laser completi è di 4 sedute per i pazienti che presentano un'alta carica batterica totale, ma bassa concentrazione di batteri appartenenti al complesso rosso, assetto microbiologico che correla con una parodontite moderata. Il numero di sedute può essere portato ad un massimo di 7, quando la diagnosi di parodontite è severa e, oltre ad
10 essere alta la carica batterica totale, è anche alta la percentuale di batteri appartenenti al complesso rosso, con presenza dei batteri *A. Actinomycetemcomitans* e *P. Gingivalis*. Ogni paziente parodontale è stato sottoposto ai diversi trattamenti di ablazione del tartaro e Nd:YAG laser su tutti gli elementi dentali, intervallati con ulteriori sedute di igiene professionale. Sono state inoltre effettuati cicli di trattamento Nd:YAG laser parziali solo a
15 carico degli elementi dentali maggiormente compromessi.

-Pazienti con parodontite che arrivano a guarigione dopo la terapia parodontale (nominato anche gruppo "parodontite POST"): una volta portato a termine il protocollo di cura, con sedute complete e rientri, viene valutata la situazione, facendo riferimento al numero di siti patologici individuati durante la compilazione della cartella parodontale
20 all'inizio della terapia, e quanto il paziente abbia risposto clinicamente ai trattamenti completi. Anche in occasione dei rientri laser, l'operatore ricontrolla la compliance del paziente e rimuove meccanicamente la placca riformatasi, prima di effettuare il passaggio laser. Inoltre, alla fine di ogni seduta, fornisce nuovamente le istruzioni di igiene orale domiciliare, attraverso l'utilizzo dello spazzolino elettrico o sonico, scovolini e filo
25 interdentale e, in caso di necessità, anche l'utilizzo dell'idropulsore.

Oltre a quelle iniziali eseguite dopo la visita medico specialistica, le analisi microbiologiche vengono ripetute dopo il trattamento laser completo e durante la terapia di mantenimento, per monitorare la carica batterica nei mesi successivi alla terapia attiva ed intercettare in tempo possibili recidive

30 **-Pazienti affetti da perimplantite prima di iniziare una terapia (nominato anche gruppo "perimplantite PRE"):** sono stati inclusi pazienti come definiti nel gruppo 2 ad eccezione del fatto che i segni della malattia fossero presenti in corrispondenza di impianti.

Sono stati inseriti in questo gruppo pazienti che presentavano due tipi di infiammazione a carico degli impianti:

- Mucosite: infiammazione che interessa solo le mucose che rivestono gli impianti
 - Perimplantite: infiammazione che interessa sia le mucose sia l'osso che accoglie l'impianto. I
- 5 soggetti affetti da perimplantite sono stati invece trattati con laser a diodo limitatamente agli impianti interessati o in alternativa con laser Nd:YAG DMT.

-Pazienti affetti da perimplantite dopo la terapia perimplantare (nominato anche gruppo "perimplantite POST"): considerando che nel 93% dei casi la cura si è dimostrata pienamente efficace e che, anche nel 7% dei casi in cui non si è registrata una perfetta

10 guarigione, si è comunque avuto un importante miglioramento, si può concludere che il protocollo dimostra di essere notevolmente efficace nel trattamento della malattia parodontale. Dal confronto dei risultati microbiologici pre e post trattamento parodontale/perimplantare e dal confronto clinico, sono stati individuati i pazienti che hanno presentato uno stato di guarigione clinica correlata con un assetto microbiologico con una

15 bassa percentuale di patogeni e l'assenza dei batteri responsabili della malattia, dei danni parodontali e che sono associati all'insorgenza di importanti malattie sistemiche.

E' stato raccolto il consenso informato di tutti i pazienti.

Attrezzatura utilizzata per la terapia parodontale e/o perimplantare:

- 20 - Riunito (completo di accessori)
- Microscopio operatorio (completo di accessori)
- Ablatore ultrasonico Satelec ed inserti parodontali
- Manipolo per airpolishing NSK o EMS per rimozione biofilm batterico
- Laser Neodimio: YAG Deka per trattamento parodontale
- 25 - Laser Neodimio: YAG DMT per trattamento parodontale e/o perimplantare
- Laser a diodo per trattamento perimplantare
- Macchina fotografica reflex per foto post-trattamento
- Kit multimediale (schermi, telecamera PC, accessori vari)
- Strumenti e macchinari per sterilizzazione
- 30 - Strumenti e macchinari per compressione e aspirazione

Analisi microbiologica

Il campionamento è stato effettuato applicando le procedure riportate nel kit BPA (Bacterial Periodontal Assessment, Biomolecular Diagnostic, Firenze Italia), dopo l'essiccazione dell'area subgingivale isolare dalla saliva i siti con un rullo di cotone ed asciugare il solco, inserire in modo deciso i coni di carta sterili (incluso nel kit) fino al fondo della tasca parodontale e lasciarli per almeno un minuto). (sono state scelte almeno una tasca per ogni quadrante, e conservati a 4 ° C in una provetta sterile (inclusa nel kit).

La tasca parodontale o gengivale è una formazione patologica, manifestazione dello stato infiammatorio parodontale.

Placca batterica e tartaro tendono ad accumularsi all'interno del solco gengivale, ovvero il piccolo incavo, normalmente profondo dai 2 ai 3 millimetri, presente fra la superficie dentale e il margine gengivale.

Qualora placca e tartaro non vengano rimossi in modo corretto ed efficace dal solco gengivale, si produce una progressiva distruzione del tessuto epiteliale situato alla giunzione fra corona e radice del dente (giunzione amelo-cementizia o smalto-dentinale). Il ritrarsi di questo tessuto molle connettivo, provoca il graduale approfondimento del solco gengivale, e conseguentemente, la formazione di tasche parodontali.

Le tasche parodontali sono responsabili dell'annidamento e della proliferazione di batteri anaerobi (batteri in grado di svilupparsi in assenza di ossigeno): questi ultimi producono tossine che aggrediscono e danneggiano gradualmente i tessuti parodontali, ovvero i tessuti che sostengono l'elemento dentario (legamento parodontale, alveolo, osso e gengiva). Le gengive tendono a sanguinare e a ritirarsi esponendo le radici dentarie, mentre l'osso di sostegno si riassorbe progressivamente fino a compromettere la stabilità stessa del dente.

Ogni arcata, superiore e inferiore è suddivisa in due quadrante ciascuna, realizzato dall'OMS è largamente utilizzato in tutto il mondo dai professionisti del dentale. Questo sistema ISO utilizza un codice di due cifre, la prima delle quali indica il quadrante e la seconda la posizione dell'elemento dentario cominciando a numerare a livello della linea mediana del volto. Per i denti permanenti si comincia quindi a numerare dall'incisivo centrale superiore destro a cui è assegnato il numero 11. Il secondo quadrante è rappresentato dal mascellare sinistro contraddistinto dal numero 2 seguito da numeri che vanno da 1 a 8. Il terzo quadrante vede coinvolto l'area mandibolare sinistra, il conteggio anche in questo caso inizia dalla linea mediana e si diparte in zona distale. A conclusione della numerazione c'è il quadrante di destra mandibolare contraddistinto dal numero 4 seguito da numeri dall'1 all'8)



L'estrazione del DNA è stata effettuata utilizzando lo strumento QIACUBE HT ® (QIAGEN®, GMBH, Germania Cat No./ID: 9001793). Il protocollo raccomandato dal
 5 produttore del kit per il DNA di estrazione è stato rigorosamente rispettato. Dopo l'estrazione, il DNA è stato eluito in 150 µl di tampone di eluizione e successivamente misurata la quantità del DNA con lo spettrofotometro (Eppendorf BioSpectrometer® Cat No./ID 613500009). E' stato utilizzato circa 40 ng di DNA bersaglio per il rilevamento di ogni singolo batterio con la metodologia Real-Time PCR, per valutare in tempo reale la
 10 quantità di DNA a doppio filamento presente dopo ogni ciclo di sintesi. Nelle miscele di reazione è presente il SYBR Green, un composto fluorescente intercalante del DNA, tali miscele insieme a coppie di primers specifici per ogni target, sono state seminate in ogni singola provetta con il dispensatore automatico QiAgility (QIAGEN®, GMBH, Germania Cat No./ID: 9001532).

15 Per l'amplificazione e il rilevamento del DNA è stata eseguita una PCR Real Time (Rotor-Gene Q, Qiagen) con primers specie-specifici riportati in Tab. 1 per la ricerca dei seguenti patogeni tradizionalmente associati con la malattia parodontale/perimplantare: *P.gingivalis*, *T.denticola*, *T.forsythia*, *P.micros*, *F.nucleatum ssp.*, *P.intermedia*, *C.rectus*, *E.corrodens*, *A.actinomycetemcomitans*.

20

25

Tabella 1: Primers e sonde utilizzati per rilevare i suddetti batteri

Batteri	Sequenze nucleotidica
porphyromonas gingivalis Fw	5'GCG CTC AAC GGT TCA GCC 3' SEQ ID No. 8
porphyromonas gingivalis sonda	5' CACTGAACTCAAGCCGGCAGTTTC3' SEQ ID No. 9
porphyromonas gingivalis Rv	5' CAC GAA TTC CGC CTG C3' SEQ ID No. 10
aggregatibacter actinomyce FW	5' GAACCT TACCTACTCTTGACATCC GAA3' SEQ ID No. 11
aggregatibacter actinomyce sonda	5' AGACTCAGAGATGGGTTTGTGCCTTA GGG 3' SEQ ID No. 12
aggregatibacter actinomyce RW	5' TGCAGCACCTGTCTCAAAGC3' SEQ ID No. 13
tannerella forsythia FW	5'ACATCGTGCAGGAAGGTGTA 3' SEQ ID No. 14
tannerella forsythia sonda	5' ACTCGGCAATGACAGGAAGT 3' SEQ ID No. 15
tannerella forsythia RW	5' ACAGGGCGGAGTTGATTACA3' SEQ ID No. 16
peptostreptococcus micros FW	5'agccattgaagacactttggt 3' SEQ ID No. 17
peptostreptococcus micros sonda	5'agtgcagatgtaaaagtc 3' SEQ ID No. 18
peptostreptococcus micros RW	5' tgccgaagtttctagccaaa 3' SEQ ID No. 19
fusobacterium nucleatum FW	5 CAACCATTACTTTAACTCTACCATGTTCA 3' SEQ ID No. 20
fusobacterium nucleatum RW	5' GTTGACTTTACAGAAGGAGATTATGTAAAAATC 3' SEQ ID No. 21
prevotella intermedia FW	5 CCTGAGGTCTTCGATGCGTG' 3' SEQ ID No. 22
prevotella intermedia RW	5' TGGGCAAGCATAGACCAAGA3' SEQ ID No. 23
campylobacter rectus FW	5 AGCGCAACCCACGTG'3' SEQ ID No. 24
campylobacter rectus RW	5' CGCCATTGTAGCACG 3' SEQ ID No. 25
eikenella corrodens FW	5 ATGTGAAATCCCCGGGCTTA3' SEQ ID No. 26
eikenella corrodens sonda	5' CCCTGGGATAACACTGAC 3' SEQ ID No. 27
eikenella corrodens RW	5' CTGTTTGCTACCCACGCTTT3' SEQ ID No. 28

treponema denticola FW	5 ATTTGACTTTTATGCGGGCC 3 SEQ ID No. 29
treponema denticola RW	5' TCGGCAACAGAAGCATTGTC 3' SEQ ID No. 30
treponema denticolaRW	5' AGGGGATAATTATGGGGCGG3' SEQ ID No. 31

Analisi statistica e bioinformatica

Successivamente il DNA dei campioni sottoposto all'analisi microbiologica riportata sopra è stato amplificato e sequenziato per le regioni V3 e V4 (sequenze note in grado di individuare le specie batteriche presenti nel campione) del gene 16S rRNA batterico mediante tecnica Next Generation Sequencing su piattaforma Illumina (MiSeq illumina Cat No./ID SY-401-9002DOC). È stata inoltre eseguita l'analisi bioinformatica dei dati ottenuti dal sequenziamento per identificare e definire le specie batteriche che caratterizzano la malattia parodontale e perimplantare e ottenere un pattern di specie microbiche che identifichino e caratterizzino il gruppo dei "falsi negativi".

Analisi delle specie batteriche della presente invenzione

Nella tabella 1 sono riportati i batteri che possono essere utilizzati come biomarker specifici a fronte del confronto tra i risultati ottenuti col sequenziamento massivo sui prelievi microbiologici dei vari gruppi di pazienti. Il sequenziamento massivo riesce a identificare tutti i geni riconosciuti con il 16S.

Tabella 2: Batteri biomarcatori dell'invenzione

Batteri	Sequenze (FAM)	size
Rothia dentocariosa Fw	5' ATGATGCAGAACCCCGTACA 3' SEQ ID No. 32	215pb
Rothia dentocariosa sonda	5' ACACCGAAAAATCGCCCTTC 3' SEQ ID No. 33	
Rothia dentocariosa Rv	5' TGGGCCTGATGACCTTTTCT 3' SEQ ID No. 34	
Synergistetes FW	5' TTGAGACTGAGGTGCTGGAG 3' SEQ ID No. 35	156pb
Synergistetes sonda	5' TCCCAGTGTAGCGGTGAAAT 3' SEQ ID No. 36	
Synergistetes RW	5' TCTAATCCCGTTCGCTACCC 3'	

	SEQ ID No. 37	
Filifactor Alocis FW	5' ATACAGTCCGTTTCCACCGT 3'	172pb
Filifactor Alocis sonda	SEQ ID No. 38 5' ACTCGGCAATGACAGGAAGT 3'	
Filifactor Alocis RW	SEQ ID No. 39 5' ACTGATCCTGACCGTTCCTC 3'	
	SEQ ID No. 40	
Porphyromonas endodontalis FW	5' GCTCAACTGTAGTCTTGCCG 3'	168pb
Porphyromonas endodontalis sonda	SEQ ID No. 41 5' TGCTAGAGAGGAGACGAGGT 3'	
Porphyromonas endodontalis RW	SEQ ID No. 42 5' TGTTTGATCCCCACGCTTTC 3'	
	SEQ ID No. 43	
Cardiobacterium hominis FW	5 GAGCCAATCTGAGAAAGCCG 3' SEQ	187pb
Cardiobacterium hominis sonda	ID No. 44 5' TACGTTCCCGGTCTTGAC 3'	
Cardiobacterium hominis RW	SEQ ID No. 45 5' GCGCCCTCCTAAGTTAAGCT 3'	
	SEQ ID No. 46	
leptotrichia buccalis FW	5 TTGTAAAGGGGATGGCGACT'	248pb
leptotrichia buccalis RW	3' SEQ ID No. 47 5' GTCCCGCTCCAACAACAATT3'	
	SEQ ID No. 48	
capnocytophaga sputigena FW	5' GCAAGTCGAGGGAGAGGTTA 3'	208pb
capnocytophaga sputigena RW	SEQ ID No. 49 5' GAGCCGTTACCTCTCCAAC 3'	
	SEQ ID No. 50	

Profilo termico utilizzato nella reazione di PCR per il rilevamento del DNA dei suddetti patogeni:

5
1 ciclo x { 5 min à 95°C , seguito da 40 cicli x { 15 sec à 95°C
1 min à 60°C

Sequenziamento di Sanger

Per confermare la presenza di ogni singolo batterio analizzato, abbiamo eseguito la analisi di sequenziamento di “Sanger”, utilizzando il seguente protocollo per campioni:

- ✓ 1µl di Thermo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase
- ✓ 0,5 µl Exonuclease I (Exo I)

5

Profilo termico:

37°C x 15 min

85°C x 15 min

10

4°C x 10 min

Marcatura per la reazione di sequenziamento:

11,5 µl H₂O

3,5 µl Buffer 2x

1 µl BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit

15

1 µl primer 3,2µM (micromolare di concentrazione)

3 µl DNA purificato

1 ciclo x { 5 min à 95°C , seguito da 30 cicli x { 30 sec à 95°C
10 sec à 50°C
4 min à 60°C

20

Risultati

Nella fig. 1 si nota che il numero di specie è maggiore per i trattamenti PRE che per i trattamenti POST. I “Falsi.negativi” tendono ad avere un numero di specie intermedio, più simile ai trattamenti PRE.

25

Di seguito vengono riportati i batteri presenti in modo significativo (fisherAdjP inferiore a 0.005) nei vari gruppi. **fisherAdjP:** Le analisi di tipo MANOVA e NPMANOVA utilizzano la statistica di Fisher e considerano il valore di F per decidere se accettare l’ipotesi nulla H₀ o l’ipotesi alternativa; la prima afferma che le medie di tutti i gruppi in esame sono uguali, e dunque non sussistono differenze significative tra i gruppi; mentre con l’ipotesi alternativa si conclude che le medie non sono tutte uguali (o almeno una è diversa dalle altre). Fissata una soglia di significatività, se il valore di F è inferiore ad essa, allora viene accettata l’ipotesi nulla; se il valore è invece superiore alla soglia si opta per l’ipotesi alternativa.

30

Gruppo “Falsi negativi”

35

Tabella 3: rappresenta le tassonomia delle specie batteriche più frequente nel gruppo falso negativi.

Otu ¹	taxonomy
4296858	k__Bacteria; p__Proteobacteria; c__Gammaproteobacteria; o__Cardiobacteriales; f__Cardiobacteriaceae; g__Cardiobacterium; s__
4443207	k__Bacteria; p__Fusobacteria; c__Fusobacteriia; o__Fusobacteriales; f__Leptotrichiaceae; g__ Leptotrichia; __
4297838	k__Bacteria; p__Actinobacteria; c__Actinobacteria; o__Actinomycetales; f__Micrococcaceae; g__ Rothia; __
664697	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Flavobacteriia; o__Flavobacteriales; f__Flavobacteriaceae; g__ Capnocytophaga; s__

L'analisi dei campioni "Falsi negativi" ha rivelato che le specie maggiormente presenti in questo gruppo sono *cardiobacterium hominis*, *leptotrichia buccalis*, *capnocytophaga sputigena* e *Rothia dentocariosa*.

5

Parodontite pre trattamento vs parodontite post trattamento

Tabella 4: rappresenta le tassonomie delle specie batteriche più frequente nel gruppo parodontite prè e post trattamento

10

Otu ¹	Taxonomy
754684	k__Bacteria; p__ Synergistetes ; c__Synergistia; o__Synergistales; f__Dethiosulfovibrionaceae; g__TG5; s__
430375 9	k__Bacteria; p__Bacteroidetes; c__Bacteroidia; o__Bacteroidales; f__Porphyromonadaceae; g__ Porphyromonas; s__endodontalis

I due batteri che permettono di distinguere il gruppo parodontite PRE dal gruppo parodontite POST sono *Synergistetes* e *Porphyromonas endodontalis*,

15

Perimplantite PRE trattamento vs. perimplantite POST trattamento

Tabella 5: rappresenta le tassonomia delle specie batteriche più frequente nel gruppo perimplantite prè e post trattamento

otu ¹	Taxonomy
4303759	k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Porphyrromonadaceae; g_ Porphyromonas ; s_ endodontalis
754684	k_Bacteria; p_ Synergistetes ; c_Synergistia; o_Synergistales; f_Dethiosulfovibrionaceae; g_TG5; s_
4398594	k_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Peptostreptococcaceae; g_ Filifactor ; s_

5

I batteri che permettono di distinguere il gruppo perimplantite PRE dal gruppo perimplantite POST sono *Filifactor alocis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Synergistetes*.

Perimplantiti contro tutte le parodontiti

10

Tabella 6: rappresenta le tassonomia delle specie batteriche più frequente nel gruppo perimplantite contro tutte le parodontiti

otu ¹	Taxonomy
4417749	k_Bacteria; p_Bacteroidetes; c_Flavobacteriia; o_Flavobacteriales; f_Flavobacteriaceae; g_ Capnocytophaga ; s_

15

OTU¹: Operational Taxonomic Unit, numero di sequenze ottenute con similarità > al 97%

Sono stati confrontati tutti campioni di soggetti affetti da perimplantiti con quelli di soggetti affetti da parodontiti e la specie che differenzia i due gruppi è *capnocytophaga sputigena*.

I risultati ottenuti con i primers (tab.1) sono sovrapponibili con quelli ottenuti dal sequenziamento della Next Generation Sequence (NGS) Illumina.

20

Sono stati analizzati 40 campioni appartenenti al gruppo dei “falsi negativi”, e 34 (85%) sono risultati positivi per *cardiobacterium hominis*, 22 (55%) per *leptotrichia buccalis*, 20 (50%) *capnocytophaga sputigena* ed infine 5 (12,5%) *Rothia dentocariosa* (Tabella 2).

Sono stati anche analizzati 70 pazienti, prima e dopo la terapia parodontale e 65 (93%) risultavano positivi per synergistetes, mentre per *Porphyromonas endodontalis* erano più frequente nel pre che nel post trattamento, rispettivamente 32 (45,7%) e 10 (14%) (Tabella 3).

- 5 I risultati di 27 campioni con perimplantite PRE sono: 26 (96%) per *Filifactor alocis*, 18 (66,6%) *Synergistetes* e 10 (37%) *Porphyromonas endodontalis*. Mentre nei perimplantite POST abbiamo trovato 12 (44%) *Synergistetes*, 2 (7,4%) *Porphyromonas endodontalis* e soltanto 1(3,7%) per *Filifactor alocis* (Tabella 4).

10 Infine è stato realizzato un confronto tra pazienti affetti da perimplantite e pazienti affetti da parodontite (prima della terapia), la specie più prevalentemente trovata prevalente *capnocytophaga sputigena* era presente (75%) 45 di 60 campioni analizzati (Tabella 5).

Infine, i risultati sui soggetti affetti da perimplantite prima e dopo trattamento con un trattamento laser come descritto sopra sono stati confermati.

Tabella 7: risultati dei campioni perimplantite prè e post trattamento

15

Nome	Tipologia campioni	<i>Filifactor Alocis</i>	<i>Porphyromonas Endodontalis</i>
1	PRE IMP	6,9 x 10 ²	3,90 x 10 ³
	POST IMP	Negativo	1,2 x 10 ¹
2	PRE IMP	Negativo	5,57 x 10 ⁴
	POST IMP	Negativo	Negativo
3	PRE IMP	1,6 x 10 ²	8,36 x 10 ³
	POST IMP	Negativo	Negativo
4	PRE IMP	9,7 x 10 ³	Negativo
	POST IMP	Negativo	Negativo
5	PRE IMP	1,7 x 10 ²	5,8 x 10 ³
	POST IMP	Negativo	Negativo
6	PRE IMP	1,76 x 10 ²	1,9 x 10 ⁴
	POST IMP	Negativo	Negativo
7	PRE IMP	7,2 x 10 ²	4,5 x 10 ³
	POST IMP	Negativo	Negativo
8	PRE IMP	6,5 x 10 ²	1,03 x 10 ³
	POST IMP	Negativo	Negativo
9	PRE IMP	Negativo	2,3 x 10 ³
	POST IMP	Negativo	Negativo
10	PRE IMP	1,2 x 10 ⁴	2,5 x 10 ⁴
	POST IMP	Negativo	Negativo

25

30

Nella tabella 7, vengono riportati i risultati ottenuto con i primers che è stato creato nel nostro laboratorio dopo i risultati ottenuto con la Next Generation Sequencing (NGS).

Sono stati utilizzati gli stessi campioni di DNA sottoposti allo sequenziamento di massa. Come si osserva, i risultati riportati sulla tabella, dimostrano che 9 pazienti su 10, risultavano positivo nel pre trattamento per il batterio *filifactor alocis*, mentre nel post trattamento i pazienti sono risultati tutti negativo dopo la terapia.

- 5 Nel caso del *Porphyromonas Endodontalis* 9 pazienti su 10 risultavano positivo nel pre trattamento, invece nel post trattamento un paziente su 10 è risultato debolmente positivo.

BIBLIOGRAFIA

- 1-van Winkelhoff AJ., et al., *Microb Pathog.* 2016 94:117-22.
- 10 2- Pocolos, D.K., et al., *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 1055–1061
- 3- Page, R.C. and Eke, P.I. *J Periodontol.* 2007; 78: 1387–1399
- 4- Socransky SS, et al., *J Clin Periodontol.* 1998;25:134–14
- 5- Paster BJ, et al., *J Bacteriol.* 2001;183:3770–3783
- 6- Kumar PS, et al., *J Clin Microbiol.* 2005;43:3944–3955
- 15 7- Aas JA, et al., *J Clin Microbiol.* 2005;43:5721–5732
- 8- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, et al. *J Bacteriol.* 2001;183:3770–3783
- 9-Kumar PS, et al., *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):3944-55
- 10- Tanner A, et al., *J Clin Periodontol.* 1998;25:85–98
- 11-Lourenço T.G., et al., *J. Clin. Periodontol.* 2014;41(11):1027–1036
- 20 12-Aruni W. et al., *Microbes and infection* (2015) 1-14
- 13-Yu X-L et al., *Microbial Pathogenesis*, (2015), 1-14
- 14-Carrouel F et al., *Frontiers in microbiology*, June 2016, (7):article 840
- 15-da Silva et al., *Clin. Oral Impl. Res.* 25, 2014, 1192-1199
- 16-Socransky SS, et al., *J Clin Periodontol.* 1998 Feb;25(2):134-44.

RIVENDICAZIONI

- 1- Metodo per la diagnosi di parodontite e/o perimplantite o per monitorare l'efficacia di una terapia di una parodontite e/o perimplantite comprendente rilevare in un campione biologico
5 la presenza contemporanea delle seguenti specie batteriche: *Filifactor Alocis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Synergistetes*, *Leptotrichia buccalis*, *Rothia dentocariosa*, *Cardiobacterium hominis* e *Capnocytophaga sputigena*.
- 2- Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto campione biologico è un fluido orale o
10 un campione di placca, preferibilmente detto fluido orale è saliva o liquido crevicolare gengivale (GCF).
- 3- Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui il rilevamento della presenza di *Filifactor Alocis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Synergistetes* e *Leptotrichia buccalis* avviene tramite
15 almeno una sonda in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 2 di *Filifactor Alocis*, con un frammento di SEQ ID No. 1 di *Porphyromonas endodontalis*, con un frammento di SEQ ID No. 3 di *Synergistetes* e con un frammento di SEQ ID No. 5 di *Leptotrichia buccalis* e il rilevamento della presenza di *Rothia dentocariosa*, *Cardiobacterium hominis* e *Capnocytophaga sputigena* avviene tramite almeno una sonda
20 in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 7 di *Rothia dentocariosa*, con un frammento di SEQ ID No. 4 di *Cardiobacterium hominis*, con un frammento di SEQ ID No. 6 di *Capnocytophaga sputigena*.
- 4- Metodo secondo una qualsiasi rivendicazione da 1 a 3 comprendente ulteriormente
25 rilevare in detto campione *P.gingivalis*, *T.denticola*, *T.forsythia*, *P.micros*, *F.nucleatum ssp.*, *P.intermedia*, *C.rectus*, *E.corrodens*, *A.actinomycetemcomitans*.
- 5- Supporto comprendente una sonda di acido nucleico in grado di ibridizzare con un
30 frammento di SEQ ID No. 2 di *Filifactor Alocis*, una sonda di acido nucleico in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 1 di *Porphyromonas endodontalis*, una sonda di acido nucleico in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 3 di *Synergistetes* e una sonda di acido nucleico in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 5 di *Leptotrichia buccalis*, una sonda in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 7

di *Rothia dentocariosa*, una sonda in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 4 di *Cardiobacterium hominis* e una sonda in grado di ibridizzare con un frammento di SEQ ID No. 6 di *Capnocytophaga sputigena*.

5 6- Kit comprendente il supporto secondo la rivendicazione 5.

7- Uso del supporto secondo la rivendicazione 5 o del kit secondo la rivendicazione 6 per la diagnosi di parodontite e/o perimplantite o per monitorare l'efficacia di una terapia di una parodontite e/o perimplantite.

1/2

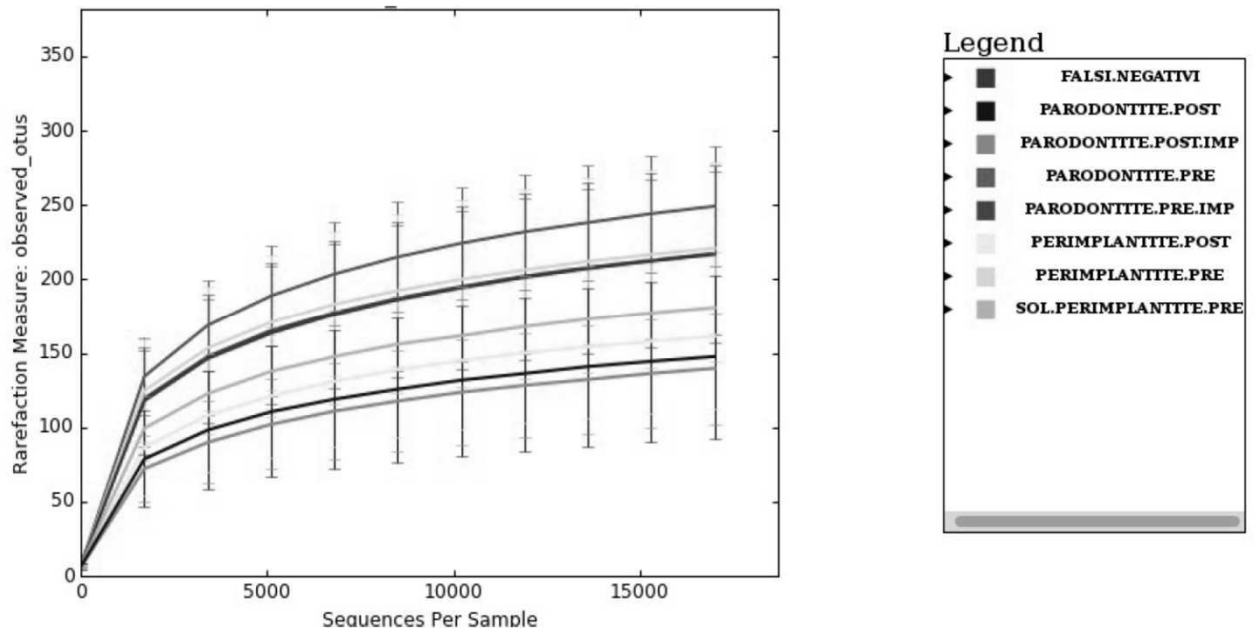


Fig. 1

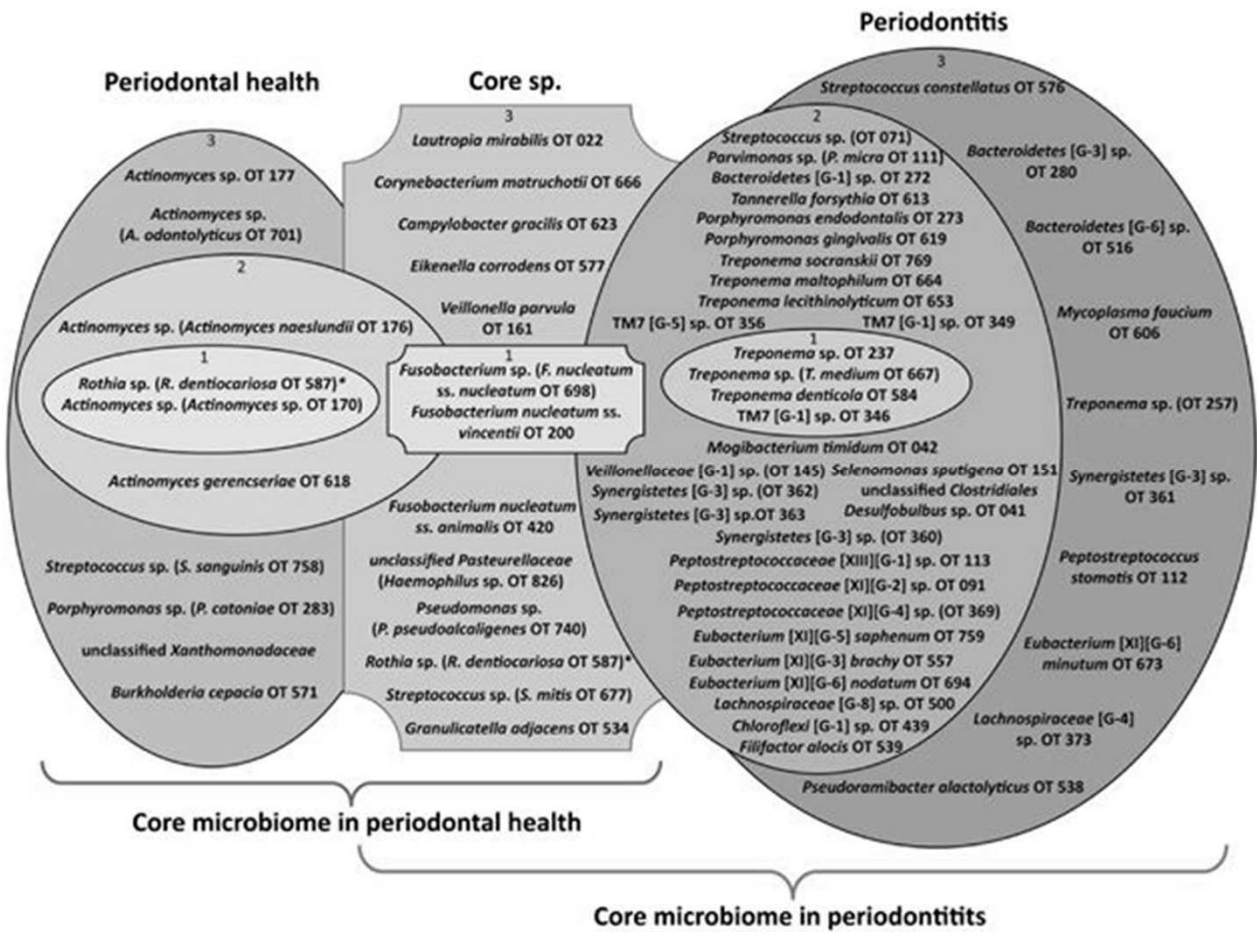


Fig. 2