

POSTULATO DI KOCH

MOD. DA SOCRANSKY

1. La maggior parte dei batteri patogeni deve essere presente nelle fasi attive della MP
2. La loro eliminazione deve arrestare la progressione della MP
3. Deve essere presente una risposta da parte dell' organismo
4. L' infezione può essere riprodotta su modelli animali dopo isolamento degli agenti patogeni
5. Il meccanismo di patogenicità deve essere unico e dimostrabile



Fattori che influenzano l' INIZIO e la PROGRESSIONE della M.P.

- In molte malattie infettive l' agente patogeno può infettare l' ospite e questo non manifesta segni clinici di malattia per molto tempo.
- Dipende da numerosi fattori:
 1. Suscettibilità sistemica e locale dell' ospite
 2. Fattori di virulenza dei patogeni
 3. Numero dei patogeni
- Fortunatamente la coincidenza di questi fattori è rara.



MICROBIOLOGIA

- La mucosa orale è sterile alla nascita, ma già dopo 6-10 ore compare una flora aerobica; gli anaerobi compaiono verso il decimo giorno e sono comunque presenti al momento dell' eruzione dentaria. Il loro numero si riduce di molto negli edentuli.
- I batteri colonizzano la gengiva , le guance, la lingua e, se presenti, i denti sopra e sotto il margine gengivale. Una bocca può essere normalmente colonizzata da 150 specie batteriche sino ad un massimo di 400.
- La conta dei batteri in un sito sottogengivale sano ammonta a 10^3 sino ad arrivare a 10^8 nelle tasche profonde per mm^3 . Nonostante questo numero elevato di batteri in molti siti di molti individui non vi mai perdita di supporto osseo.



MICROBIOLOGIA

- Tra la flora batterica e l'ospite si viene a creare un equilibrio biologico.
- Occasionalmente questo equilibrio può alterarsi con l'introduzione di nuove specie che evocano perdita di supporto parodontale o lesioni alle mucose.



MICROBIOLOGIA

- INFEZIONE: presenza e moltiplicazione di batteri in un tessuto umano
 1. Endogena
 2. Esogena



1. MECCANISMI DI PATOGENICITA'

Per poter colonizzare un sito subgengivale e provocare malattia una specie batterica deve:

- Aderire ad una o più superfici del sito
- Moltiplicarsi
- Competere con successo con le altre specie batteriche presenti
- Difendersi dai meccanismi di difesa dell'ospite
- Avere la possibilità di invadere i tessuti circostanti



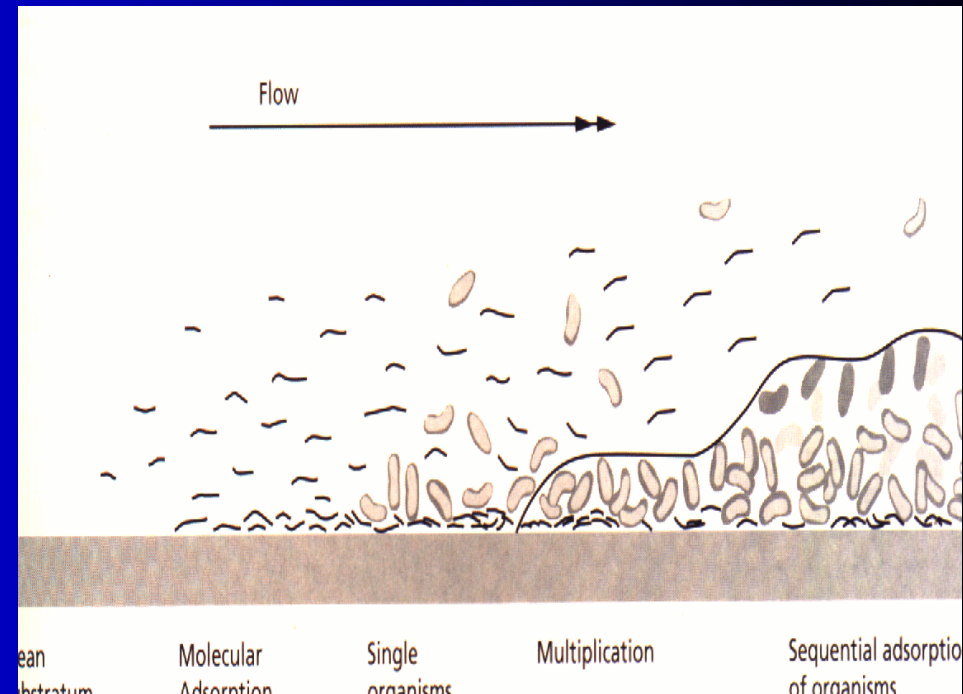
PLACCA BATTERICA

- Indipendentemente dalla ruvidità, dall'energia di superficie e dalla carica i meccanismi che portano alla formazione della placca sono simili sulle superfici dentali (smalto, dentina) od artificiali (metallo, resina acrilica).
- Tutti i batteri hanno la possibilità di aderire, ma alcuni posseggono strutture specifiche (s. polimeriche extracellulari e fimbrie) che rendono l'adesione molto rapida.



PLACCA BATTERICA

1. Pellicola acquisita: glicoproteine salivari (mucina), anticorpi.
2. I batteri aderiscono alla pellicola.
3. Ulteriore aumento della massa batterica per moltiplicazione e nuova adesione.
4. Negli strati più profondi si crea un ambiente anaerobio a causa dell' utilizzo dell' O da parte dei batteri di superficie e della scarsa diffusione.



4. Dental Plaque—Development

Within minutes after completely cleansing the tooth surface, a *pellicle* forms from proteins and glycoproteins in saliva.

A Association: Through purely physical forces, bacteria associate loosely with the pellicle.

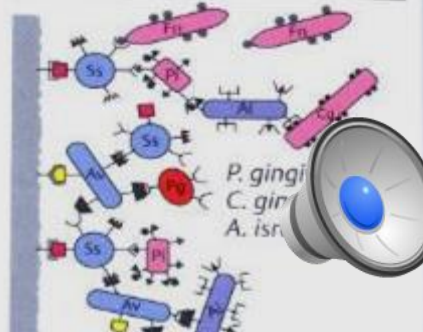
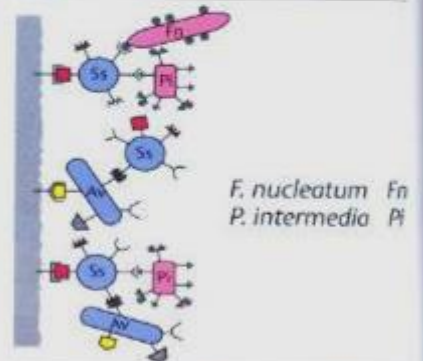
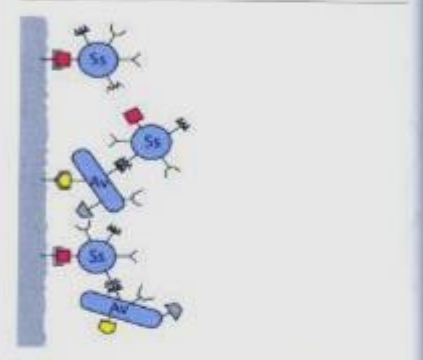
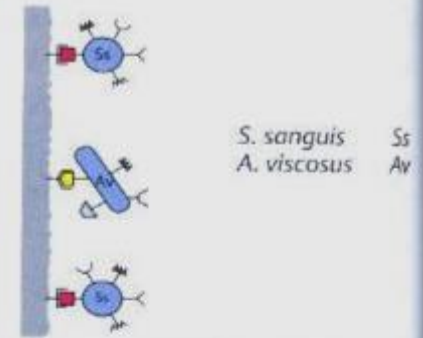
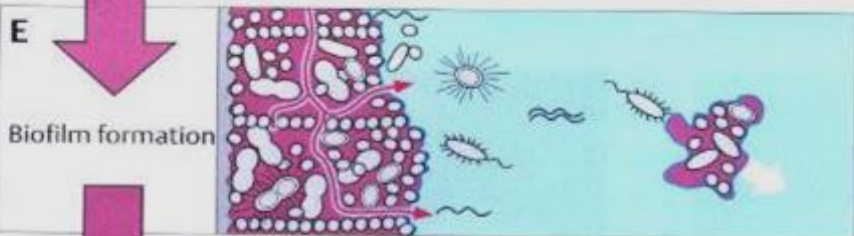
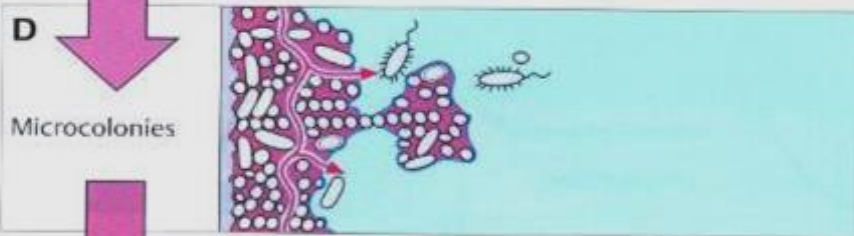
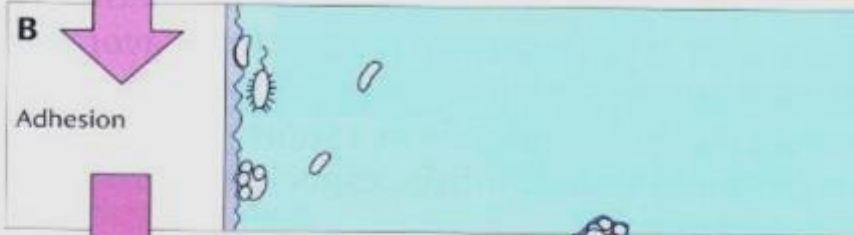
B Adhesion: Because they possess special surface molecules (adhesins) that bind to pellicle receptors, some bacteria become the “primary colonizers,” particularly streptococci and actinomyces. Subsequently, other microorganisms adhere to the primary colonizers.

C Bacterial proliferation ensues.

D Microcolonies are formed. Many streptococci secrete protective extracellular polysaccharides (e.g., dextrans, levans).

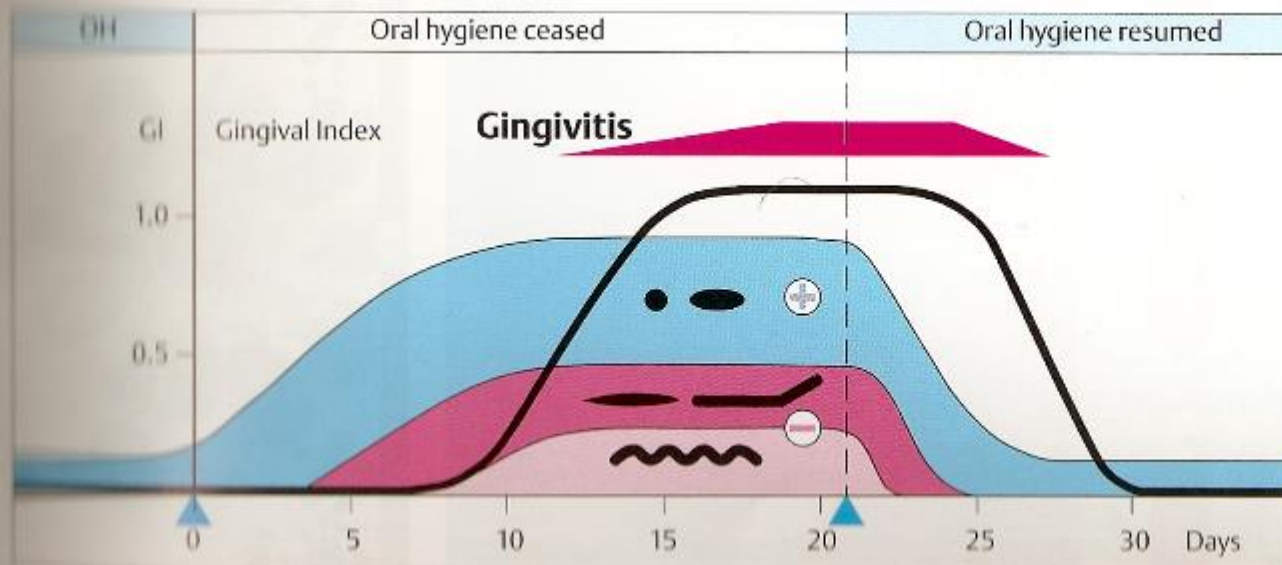
E Biofilm (“attached plaque”): Microcolonies form complex groups with metabolic advantages for the constituents.

F Plaque growth—maturation: The biofilm is characterized by a primitive “circulatory system.” The plaque begins to “behave” as a *complex organism*! Anaerobic organisms increase. Metabolic products and evulsed cell wall constituents (e.g., lipopolysaccharides, vesicles) serve to activate the host immune response (p. 38). Bacteria within the biofilm are protected from phagocytic cells (PMN) and against exogenous bacteriocidal agents.



- X Pellicle
- Y Biofilm—“Attached Plaque”
- Z Planktonic Phase





42 Experimental Gingivitis

In 1965, L oe *et al.* published the classic experimental proof of the *bacterial etiology of gingivitis*. In plaque- and inflammation-free subjects, plaque begins to accumulate if all oral hygiene is ceased. For the first few days, this plaque is composed of gram-positive cocci and rods, then later of filamentous organisms and finally spirochetes (gram-negative). Within a few days, a mild gingivitis ensues. If the plaque is removed, the gingiva quickly returns to a state of health.





Biofilm può essere definito come una comunità di cellule irreversibilmente attaccata ad un substrato immerse in una matrice di sostanza polimerica extracellulare prodotta da se stessa

Numerosi fattori contribuiscono alla resistenza del biofilm batterico:

- La protezione da parte delle sostanze polimeriche extracellulari impedisce alle sostanze antimicrobiche di penetrare
- Le capacità antimicrobiche acquisite o genetiche dei batteri della comunità

Il Biofilms gioca un ruolo importante nella resistenza batterica alla terapia antibiotica



NUTRIMENTO della PLACCA

- I prodotti alimentari disciolti nella saliva rappresentano il maggiore nutrimento della placca sopragengivale.
- Nelle tasche profonde la penetrazione è molto limitata pertanto la maggiore fonte di nutrimento deriva da dai tessuti parodontali e dal sangue. Molti batteri posseggono enzimi idrolitici capaci di scindere molecole complesse in peptidi ed aminoacidi.



PLACCA SOPRAGENGIVALE

- Superfici di smalto o di cemento esposti nel cavo orale sono ricoperti in pochi minuti da una pellicola acquisita di glicoproteine. Il primo strato che aderisce alla pellicola è costituito da: batteri coccoidi, cell. Epiteliali, 1. polimorfonucleati.
- La presenza di Gengivite incrementa la formazione di placca.



PLACCA SOPRAGENGIVALE

- I batteri adesi alla pellicola proliferano formando colonie mentre nuovi tipi di batteri aderiscono. La presenza di batteri lisi provvede nutrimento addizionale.
- Matrice Intermicrobica: materiale presente tra i batteri della placca, deriva dai microorganismi, dalla saliva ,dall' essudato gengivale. Costituito da carboidrati,proteine e scarsi lipidi contribuisce all' ancoraggio ed alla nutrizione.In presenza di b. gram- si rinvencono vescicole contenenti endotossine ed enzimi proteolitici.



PLACCA SOTTOGENGIVALE

- Può essere considerata una continuazione della p. sopragengivale anche se le specie batteriche sono spesso diverse.
- I b. contenuti hanno la capacità di invadere i tubuli dentinali e questo potrebbe spiegare la ricolonizzazione dello spazio in seguito a trattamento.



PLACCA BATTERICA

- TEORIA DELLA PLACCA NON SPECIFICA (THEILAUDE)
- TEORIA DELLA PLACCA SPECIFICA (LOESCHE)



RUOLO DEI BATTERI NELLA EZIOLOGIA DELLA M. P.

- Dati che indicano il ruolo dei batteri nella M.P.
 1. L' utilizzo di Antibiotici migliora l' evoluzione clinica di molte forme di M.P.
 2. Esiste una correlazione positiva tra quantità di placca e gravità della Gengivite (Ash,1964).
 3. Presenza, nel siero del pz., di una risposta immunitaria specifica nei confronti dei batteri sottogengivali.
 4. Studi eseguiti su cani o scimmie hanno dimostrato che la rimozione quotidiana della placca può prevenire l' insorgenza di Gengivite o Parodontite (Lindhe, 1975). L' utilizzo di legature interdentali evoca l' insorgenza di questa malattia nelle scimmie (Ebersole,,1991).



Etiology of Periodontitis— Interaction between Dental Plaque and the Host

Microorganisms

The primary etiologic factor for the existence of periodontitis is pathogenic microorganisms within the subgingival biofilm.

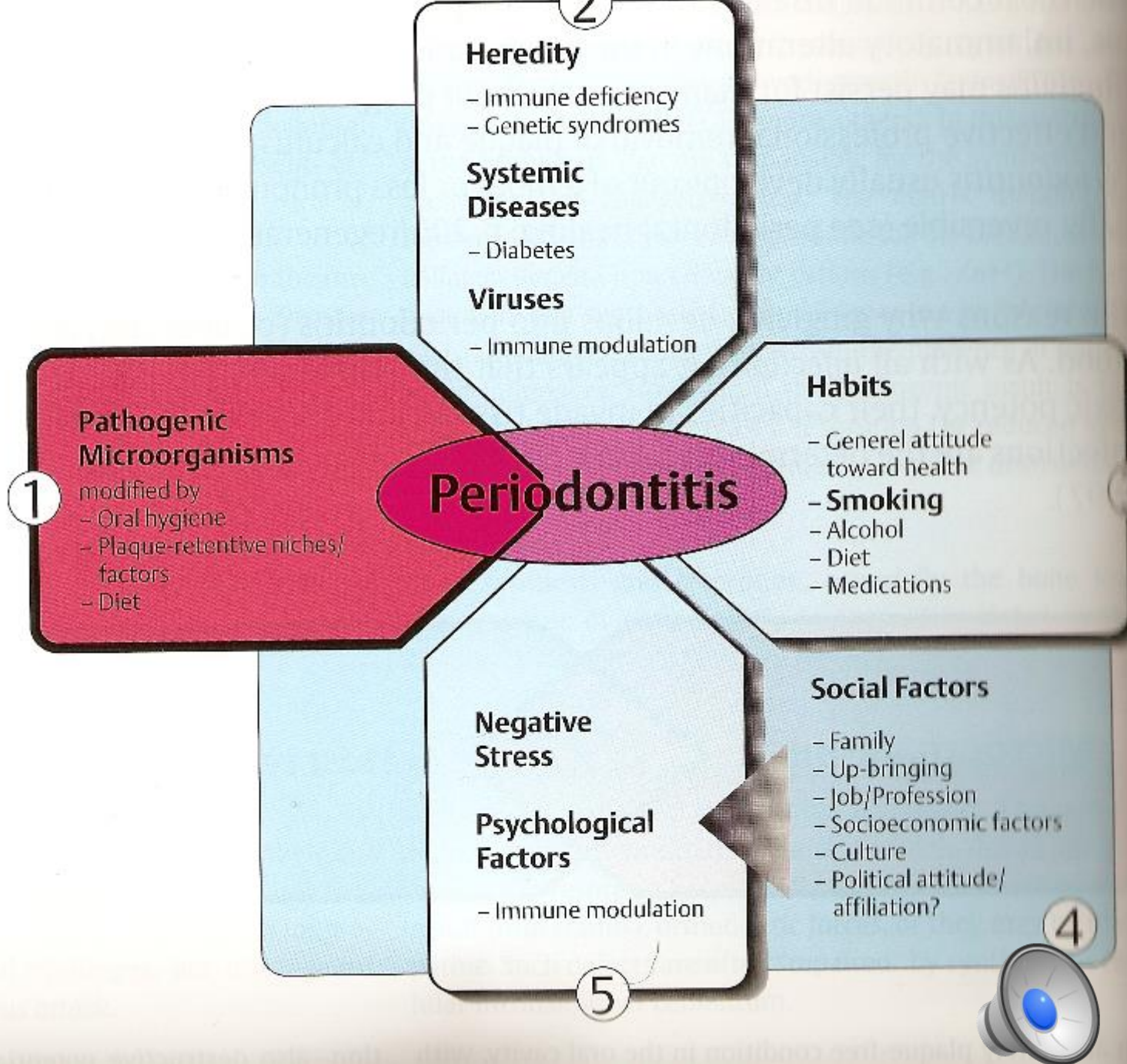
Host

The genetically determined non-specific and specific immune responses, as well as systemic syndromes and diseases influence the existence and the clinical course of periodontitis.

“Habits” and the patient’s own approach to general health will influence plaque formation and host immune response, both systemically and particularly with regard to oral health.

Social circumstances influence the systemic and psychic well being of the patient. Problems in the socioeconomic arena lead to negative stress.

Psychic burdens and stress influence the immune status.



TARTARO

- Mineralizzazione della Placca Batterica.
- La mineralizzazione della placca varia da individuo ad individuo e da zona a zona. In alcuni soggetti la formazione di depositi con almeno l' 80% per cento di materiale inorganico richiede alcuni giorni mentre in altri mesi od anni.
- In ogni caso il Tartaro rappresenta un prodotto secondario all' infezione e non una causa di periodontite.



TARTARO

- La forte adesione del T. ai tessuti dentari è dovuta alla calcificazione della pellicola che si trova al di sotto della placca batterica.
- L'adesione al titanio implantare è meno tenace e questo spiega come la rimozione possa avvenire senza danneggiare la superficie (Matarasso, 1996)



TARTARO (Composizione)

- Materiale inorganico (Minerali) e organico (matrice cellulare ed extracellulare). La componente inorganica varia dal 40 al 60% ed è costituita da fosfato di Calcio, carbonato di Calcio, e fosfato di Magnesio. Nel T. marginale vi è maggiore contenuto di Calcio, mentre in quello profondo di Sodio e Fosfati.



- Le cellule all'interno del T. sono principalmente batteri e funghi mentre la matrice organica extracellulare è costituita da proteine e lipidi.
- E' possibile rinvenire residui alimentari.



TARTARO

- Il T, non rappresenta un fattore causale di malattia parodontale, ma si sviluppa in aree in cui è difficile mantenere una valida igiene orale rendendola più difficile ed amplifica l'efficacia della Placca mantenendola a stretto contatto con i tessuti.



69 Bacterial Virulence Factors

Virulence is multifactorial. It is influenced by the inherent pathogenic potential of a bacterium, its environment, and its interaction with the host. Virulent bacteria require a competitor! In order to elicit periodontitis, microorganisms must

- Establish themselves near the host tissue
- Avoid being eliminated by saliva or exudates
- Find appropriate nutrition
- Avoid the defense mechanisms of the host and other microorganisms
- Be capable of destroying periodontal tissues.

Even though virulent, pathogenic bacteria in the pocket possess a *significant potential for damage*; this potential is small in comparison to that of the host: The clinically detectable destruction of soft and hard tissues is caused mainly by the immune defense mechanisms of the host.

Fact: In order to induce periodontitis, even virulent bacterial strains require partners (complexes: p.37)

Goals	Bacterial Factors
Adhesion to host tissues – Surface structures	– Fimbriae, pili – other adhesins
Colonization, proliferation	– Nutrition chain development – Proteases for foodstuff metabolism (Host proteins, Fe ²⁺) – Inhibition of inhibitors
Host response – Deceiving – Inhibiting – Eliminating	– Capsule, mucous – PMN receptor blocker – Leukotoxins (Aa) – Immunoglobulin-destroying proteases (Pg) – Complement-degrading proteases
Penetration into host tissues, host cells	– Invasins
Tissue damage – direct <i>Enzymes</i> <i>Bone resorption</i> <i>Cellular toxins, poisons</i>	– Collagenases – Hyaluronidase, Chondroitin sulfatase – Trypsin-like proteases (Pg, Tf, Td) – LPS/lipopolysaccharide – LTA/lipoteichoic acids – Capsule-, membrane substances – butyric acid, propionic acid, indoles, amines – ammonia, hydrogen sulfide and other volatile sulfur compounds
Tissue damage – indirect	– Host inflammatory response to microbial plaque antigens – Sensitive regulation of pro-inflammatory mediators such as TNF, IL-1, IL-6, and thus sensitive regulation of the synthesis of prostaglandin E2 (PGE2), matrix metalloproteinases (MMP) etc.



ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS

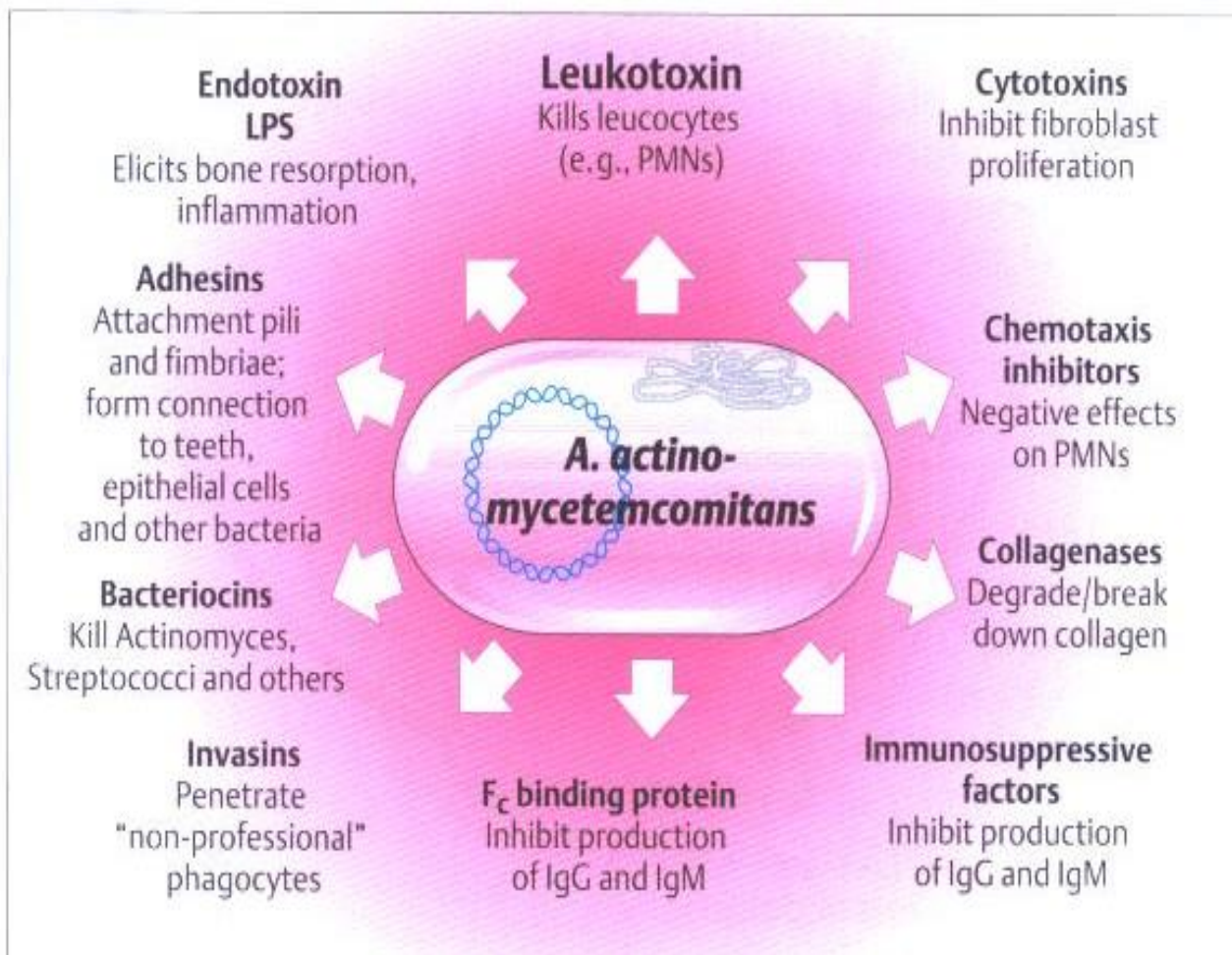
- A.a. gram negativo, anaerobio facoltativo, coccobacillo
 1. Presente in notevole quantità nella LJP (Chung, 1989; Mandell e Socransky, 1981; Slots, 1980)
 2. La maggior parte dei soggetti affetti da LJP presenta elevati titoli di Ac anti-Aa Genco, 1980; Listgarten, 1981).
 3. In soggetti trattati con successo diminuiscono sia il numero di batteri sia il titolo Ac (Haffajee, 1984).
 4. L' A.a presenta una varietà di fattori di virulenza, inclusa una Leucotossina, capaci di danneggiare i tessuti ed inibire le difese dell' ospite.
 5. Presenza di elevate quantità di Aa nei siti "attivi" comparati con siti non attivi. (Haffajee, 1984).



75 Virulence Factors of

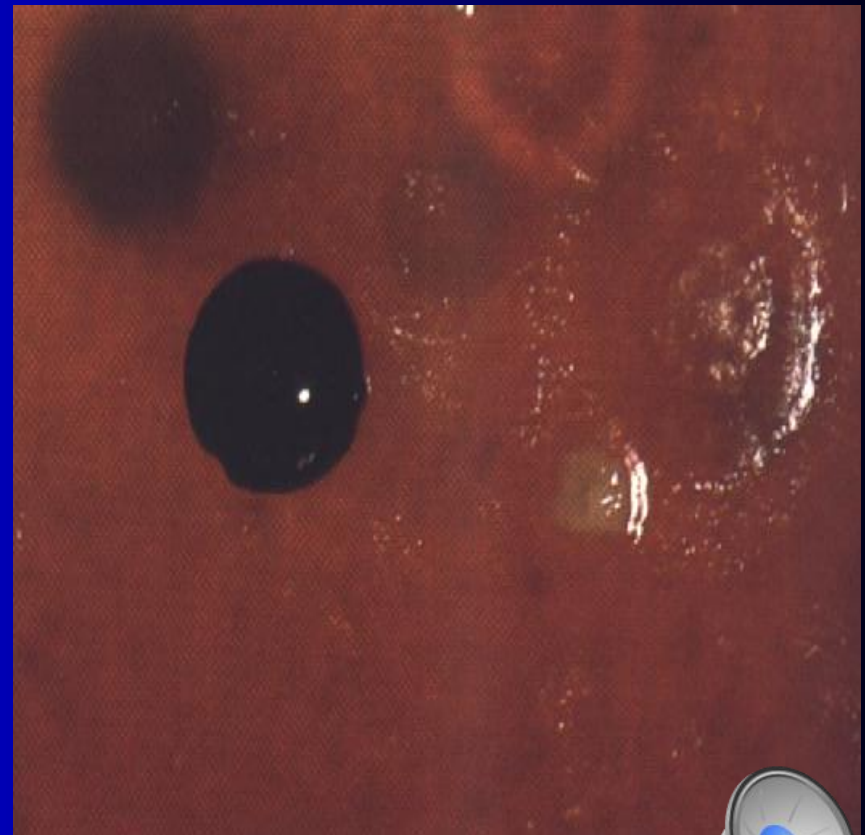
A. actinomycetemcomitans (Aa)

The Aa leukotoxin is one of the most potent toxins. It has the capability to directly inhibit some of the most important components of the human immune system, e. g., PMNs, immunoglobulins and complement activation. Something over 40 Aa-subtypes do not express leukotoxin. One subtype does this in extremely high measure, and it is associated with aggressive periodontitis (LJP). Modified from *J. Lindhe et al.*
Right: Smear of Aa.



PORPHYROMONAS GINGIVALIS

- Gram negativo, anaerobio, non-mobile, appartiene alla famiglia dei “black-pigmented bacteroides”.
- 1. Elevata risposta anticorpale locale e sistemica in soggetti con varie forme di parodontite.
- 2. Produce collagenasi, proteasi, endotossine
- 3. Capace di invadere l' epitelio gengivale in vivo
- 4. Strettamente collegato alla M.P. distruttiva indotta mediante legatura in scimmie e cani.

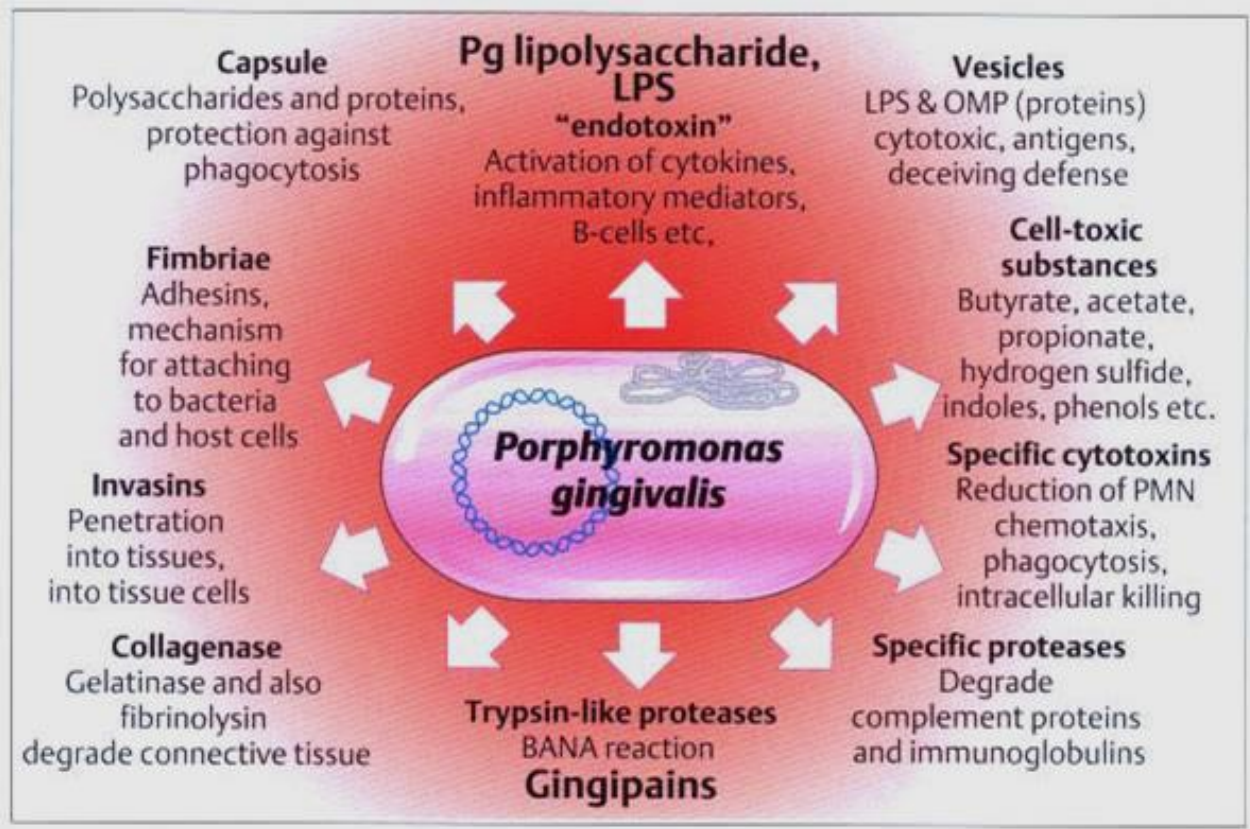


73 Virulence Factors of *Porphyromonas gingivalis* (Pg)

Pg requires many of these factors to exist, i. e., to acquire its nutrition, and to maintain itself within the ecology of the periodontal pocket. Its most significant “weapon” against the host organism is its toxic and antigenically effective LPS (p. 38).

Right: *Pg* smear. Note the numerous vesicles.

TEM Figs. 73 & 75 courtesy B. Guggenheim



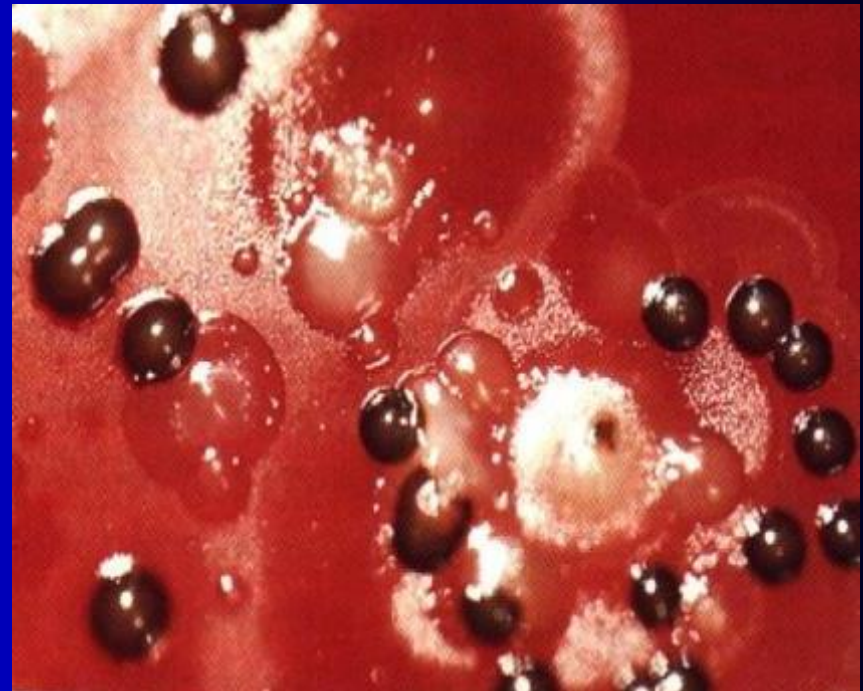
BACTEROIDES FORSYTHUS

- Gram negativo, anaerobio.
- Rinvenuto più frequentemente in lesioni parodontali attive che in inattive (Dzink, 1988).



PREVOTELLA INTERMEDIA

- Gram negativo anaerobio, pigmentato. La sua presenza ed alti titoli anticorpali sono stati rinvenuti nella GUNA (Loeshe, 1982), ed in alcune forme di parodontite (Dzink, 1983).



- *Fusobacterium Nucleatum*: gram negativo, anaerobio
- *Campylobacter Rectus*: Gram -, anaerobio, produttore di Leucotossine.
- *Eikenella Corrodens*: Gram-
- *Streptococcus Intermedius*
- Spirochete: Gram - , Anaerobi, a forma di Elica molto mobili (*Treponema Denticola*).



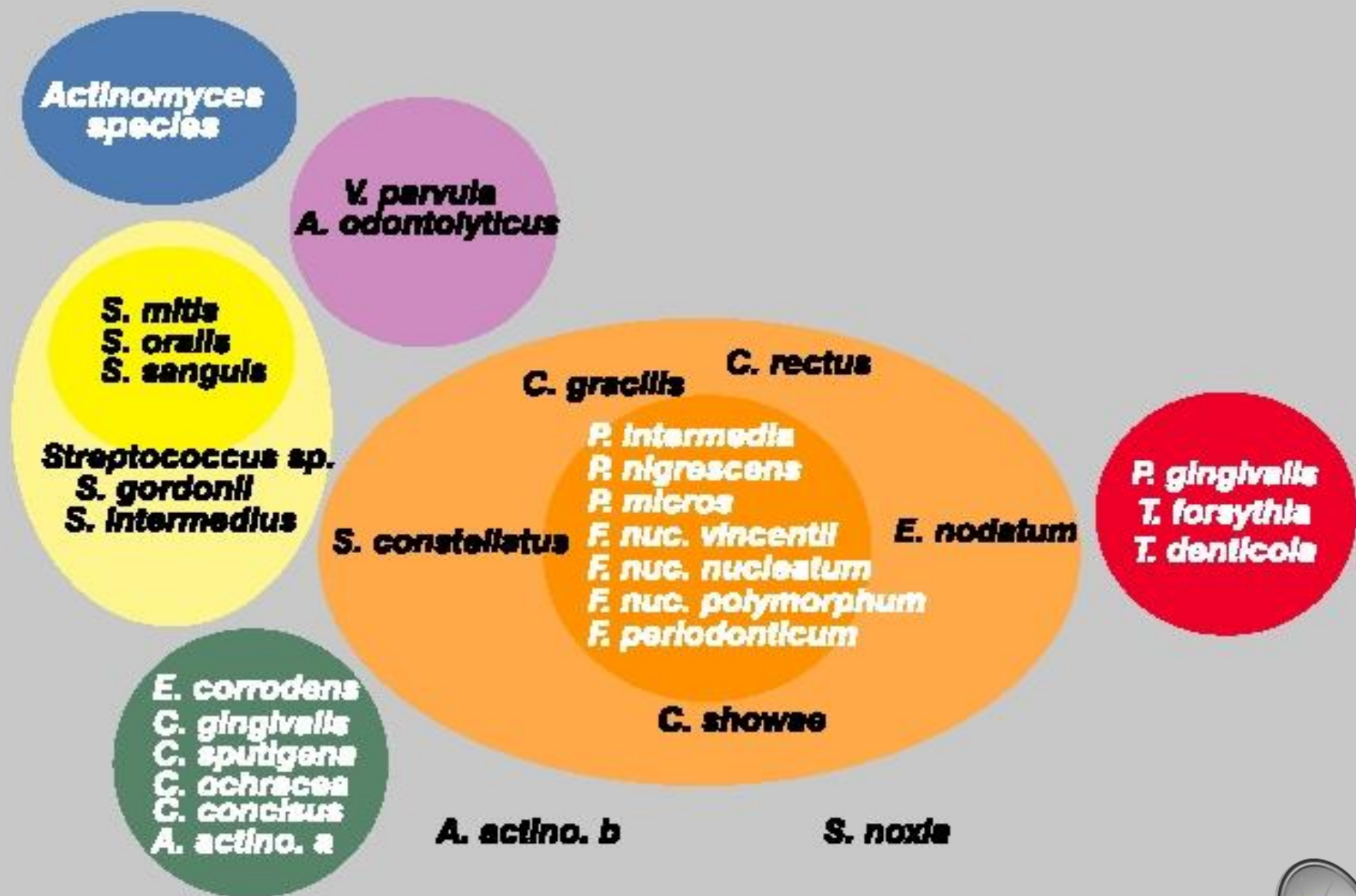
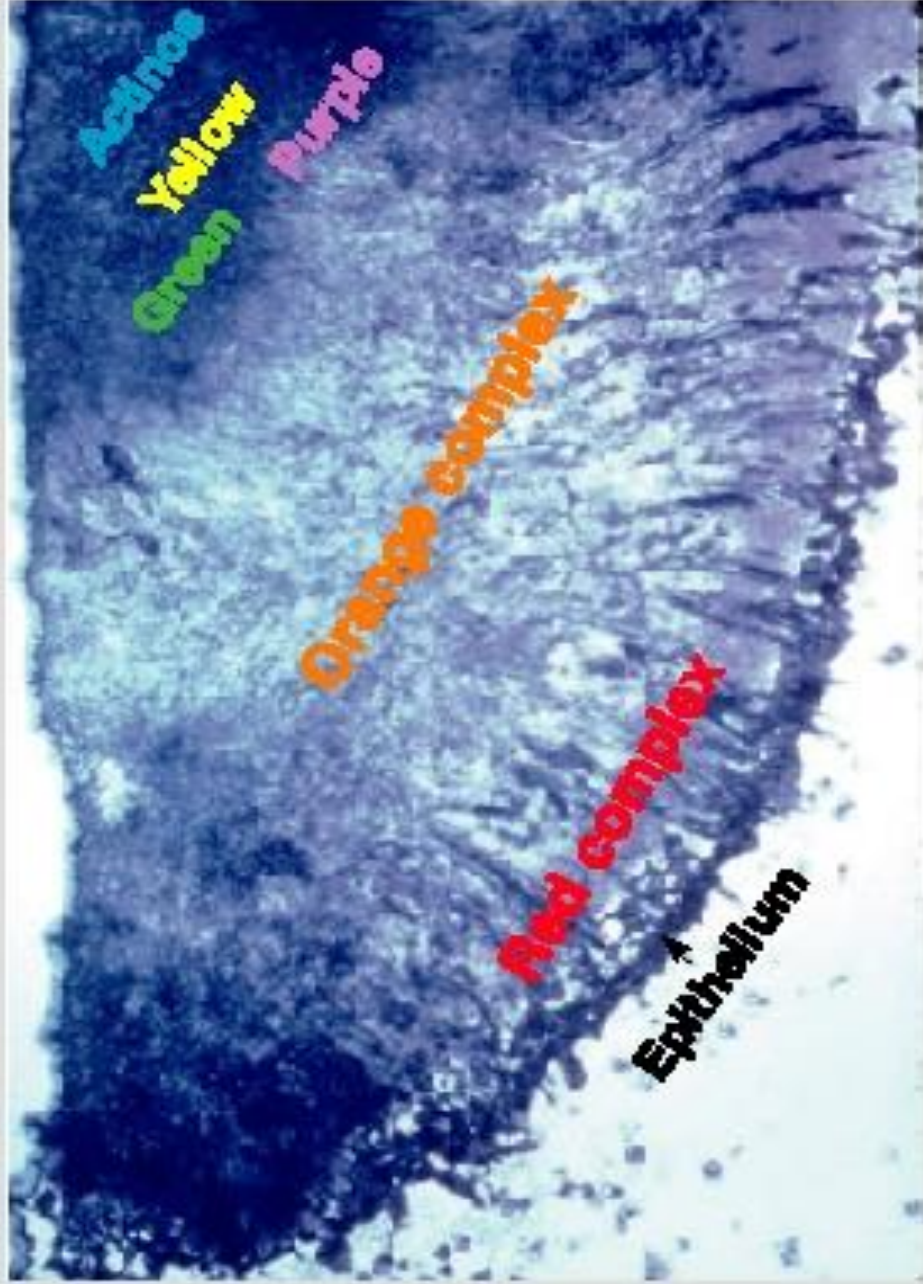


Fig. 9. Diagrammatic representation of the relationships of species within microbial complexes and between the microbial complexes. Updated from (156) with *B. forsythus* changed to *T. forsythia*.

ROOT SURFACE



POCKET WALL



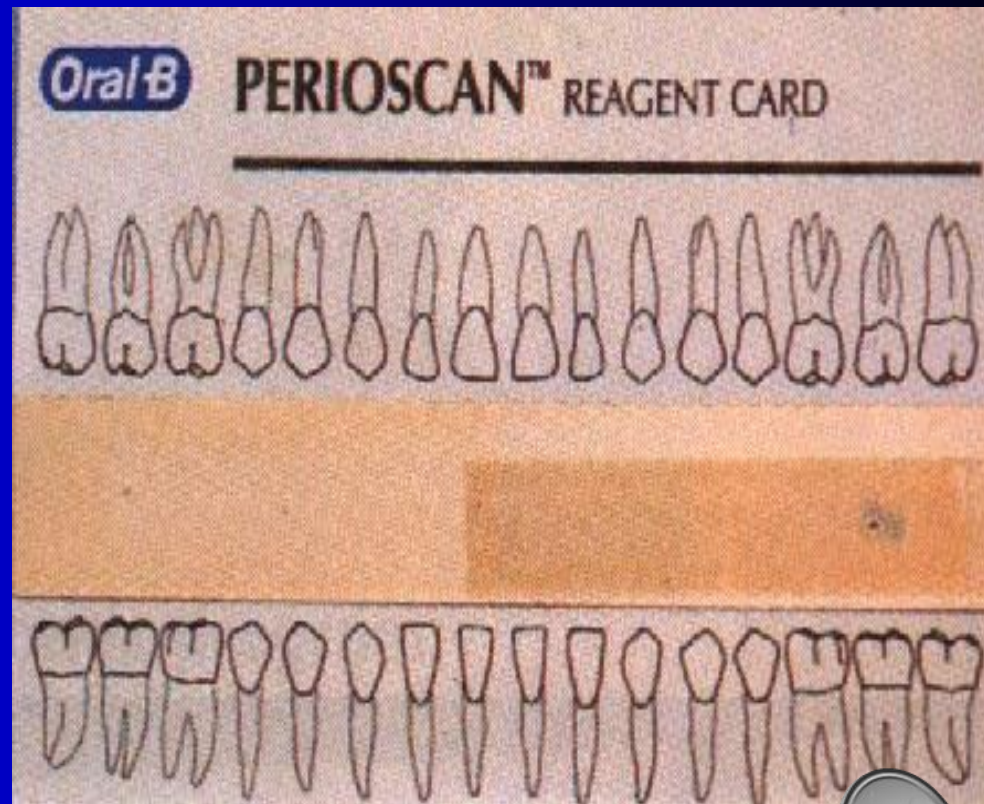
BATTERI NELLA PARODONTITE

Specie	Gram	Forma	Mob	A/An	Tipo di parodontite		
					Giovan.	Cron.	Refratt.
Frequenza di riscontro*							
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-	bast.	-	fac.	+++	++	+++
<i>P. gingivalis</i>	-	bast.	-	an.	±	+++	++
<i>P. intermedia</i>	-	bast.	-	an.	++	+++	+++
<i>B. forsythus</i>	-	bast.	-	an.	±	+++	++
<i>Fusobacterium spp.</i>	-	bast.	-	an.	+	+++	++
<i>Peptostreptococcus micros</i>	+	cocc.	-	an.	±	+++	++
<i>Campylobacter spp.</i>	-	bast.	+	fac.	+	+	+
<i>E. corrodens</i>	-	bast.	±	fac.	-	+	
Spirochete	-	spir.	+	an.	++	+++	



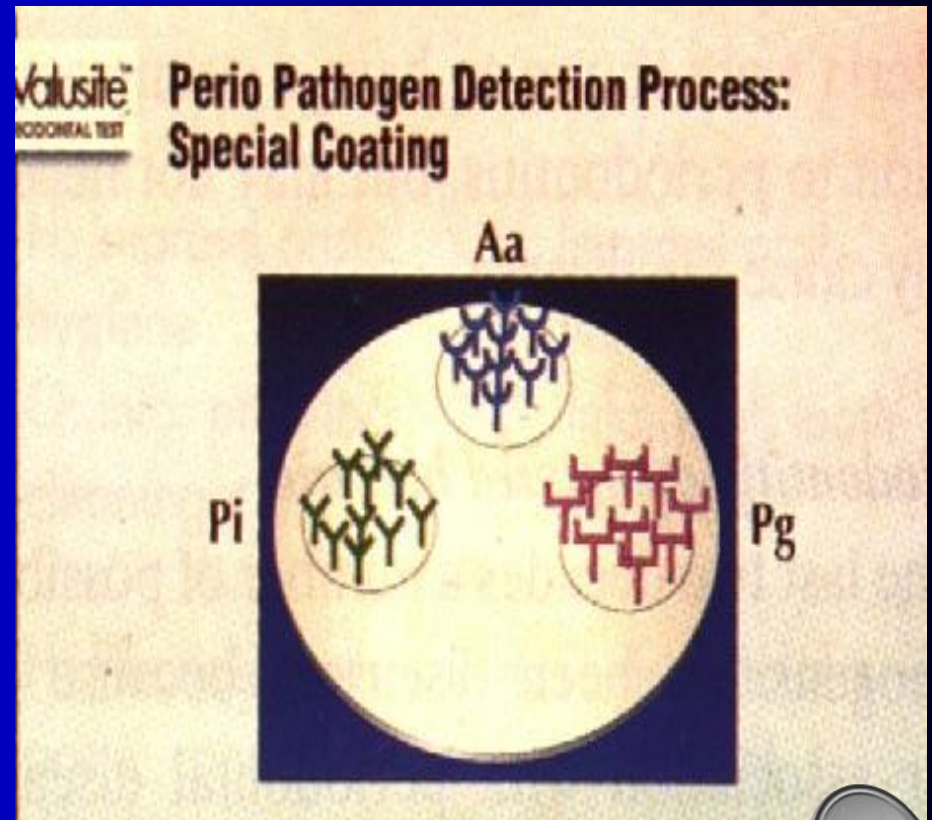
BANA Test

Test biochimico basato sulla capacità di un enzima Trypsin like prodotto esclusivamente da *Treponema Denticola*, *Bacteroides Forsythus* e *Porphyromonas gingivalis* di idrolizzare la benzoyl arginine naphthlamide.



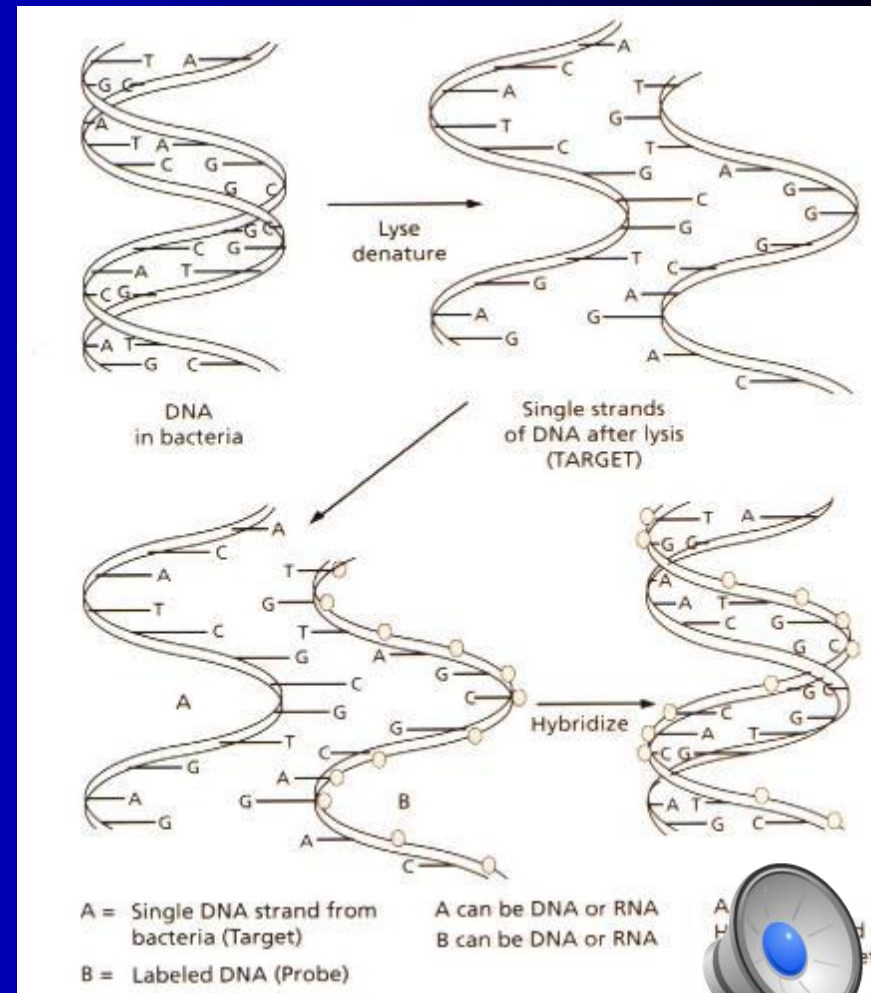
EVALUSITE (ELISA)

Enzyme-linked immunosorbent assay è adoperato per la ricerca di *Actinobacillus actinomycetecomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* attraverso l'uso di Ac specifici verso questi batteri.



DNA PROBE

- Frammenti di DNA batterico ottenuti attraverso la digestione enzimatica di placca sottogengivale vengono messi a contatto con sonde contenenti specifiche sequenze di nucleotidi.
- E' una metodica molto sensibile capace di rilevare colonie batteriche di 10^3 .
- Attualmente attraverso questo test si possono rilevare: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *B. forsythus* e *T. denticola*.



PCR

- **Polymerase chain reaction assays**

Tecnica di biologia molecolare utilizzata per il DNA . Permette di sintetizzare grande numero di copie di piccole zone di DNA allo scopo di facilitare ulteriori analisi.

- PCR real time permette di valutare anche la quantità dei batteri



TECNICHE DI COLTIVAZIONE

- L' utilizzo di nuove tecniche anaerobiche ha permesso di coltivare gran parte delle specie batteriche sottogengivali
- .Questa tecnica richiede parecchio tempo e non tutte le specie sono coltivabili (le spirochete ad es. non sono coltivabili), ma ha il vantaggio di poter testare le resistenze batteriche.



Table 1. Methods to determine microbial composition of oral samples

Method	Strengths	Weaknesses	Application
Predominant cultivable	Can detect unrecognized species; provides cultures for further analysis.	Extremely time consuming and expensive; often difficult to speciate cultures.	Studies of new ecosystems
Selective media	Modest numbers of samples for modest numbers of species.	Few useful selective media available; often media are too selective or not selective enough; expensive.	Studies of limited scope involving 1–10 species in modest numbers of samples.
Immunofluorescence	Specificity; reasonably rapid.	Limited number of useful antisera; small numbers of samples may be run.	Maybe more useful for diagnostic than ecologic or treatment studies.
PCR	Sensitivity; specificity.	Not quantitative (presence/absence); expensive; dependent on amplification.	Detection of species in a subject (prevalence); detection of low numbers of species post therapy.
Real time PCR	Sensitivity; specificity; quantitative.	Comparatively slow; very expensive; limited in numbers of samples/species.	Studies where quantitation of a very limited range of species in low to modest numbers of samples is required.
DNA–DNA hybridization	Sensitivity; specificity; quantitative.	Confined to species for which probes are available; modest number of species for modest numbers of samples.	Seeking a specific set of species in modest numbers of samples.
Checkerboard DNA–DNA hybridization	Sensitivity, specificity, quantitative; can use entire sample; large numbers of species and samples; inexpensive.	Confined to species for which probes are available; possibility of cross-reactions.	Studies of large numbers of species in large numbers of samples, e.g. ecology and treatment studies.
16S rDNA amplification cloning	Detection of cultivable and uncultivable species; phylogenetic positioning of taxa.	Extremely expensive; extremely small numbers of samples.	Survey a range of species may occur in specific h

